



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVIII CICLO)

**MONITORAGGIO E SALVAGUARDIA DELLE RAZZE
ASININE AUTOCTONE DELLA SARDEGNA
ATTRAVERSO L'IMPIEGO DI
MARCATORI MOLECOLARI**

Docente Guida

Prof. Marco Zedda

Correlatore

Dott. Raffaele Cherchi

Dott. Gian Luca Dedola

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dott. Giovanni Paolo Biggio

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

INDICE

| | |
|--|-------|
| Premessa | p. 3 |
| Scopo della tesi | p. 4 |
| Introduzione | p. 5 |
| <ul style="list-style-type: none">• Origine e domesticazione dell'asino• Diffusione nel mondo e in Italia• Asini in Sardegna : reperti archeologici e fonti letterarie• Asini dell'Asinara• Asini in Sardegna oggi• Aspetti Morfologici e Biometrici• Conoscenze scientifiche sull'Asino Sardo e sull'Asino dell'Asinara• Gli F-ISSR e il DNA mitocondriale | |
| Materiali e Metodi | p. 45 |
| Risultati e Discussione | p. 57 |
| Conclusioni | p. 80 |
| Note finali e Ringraziamenti. | p.82 |
| Bibliografia consultata | p. 83 |
| Allegati | p.96 |

PREMESSA

Fin dall'antichità la Sardegna è sempre stata una terra ricca di specie animali e vegetali tipici e ancora oggi conserva questa peculiarità, tanto da essere considerata una delle regioni mediterranee più ricche di biodiversità. L'importanza della biodiversità animale della Sardegna è principalmente da mettere in relazione con la condizione di insularità che ha isolato da un punto di vista genetico le popolazioni animali.

Tra le specie animali che compongono il ricco patrimonio faunistico isolano, negli ultimi decenni, hanno ricevuto maggiori attenzioni le specie selvatiche quali il muflone (*Ovis musimon*), il cervo (*Cervus elaphus corsicanus*), la pernice (*Alectoris barbara barbara*), etc. Tuttavia, quasi tutte le considerazioni che possono essere fatte sulle specie animali selvatiche si possono estendere anche a quelle domestiche, in quanto anch'esse hanno condiviso le stesse condizioni zoogeografiche.

Tra gli animali domestici, per esempio, si può affermare che tutte le razze presenti in Sardegna hanno caratteristiche tipiche, delle quali solo alcune sono riconosciute ufficialmente e iscritte in appositi Registri. Ad esempio tra le razze riconosciute di ruminanti troviamo la razza bovina sarda, la capra sarda, la pecora nera di Arbus, oltre che la rinomata e diffusissima pecora sarda. Per la specie suina è stata riconosciuta nel 2006 la razza suina sarda. Infine, tra i cani è da segnalare il recente riconoscimento ufficiale della razza fonnese (cane di Fonni), ma sono tante altre le razze non ancora riconosciute, se pur esistenti, come il levriero sardo, il dogo sardo, l'alano di Urzulei, il segugio di Carloforte, etc.

Per quanto riguarda gli equidi, la Sardegna possiede quattro razze, due razze equine e due asinine, riconosciute e tutelate a livello nazionale e internazionale: il Cavallo del Sarcidano, il Cavallino della Giara, l'Asino Sardo e l'Asino dell'Asinara. Queste razze sono iscritte nel Registro Anagrafico delle Razze Equine ed Asinine a limitata diffusione dell'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.), e nelle liste FAO delle specie a rischio di estinzione (Risk Status Classification, FAO 2007).

L'interesse nei confronti delle etnie asinine isolate nasce anzitutto dalla necessità di accrescere le conoscenze scientifiche su queste due razze a rischio di estinzione e minacciate di abbandono, nonché dalla sempre più urgente esigenza di nuovi e più accurati strumenti a servizio della valorizzazione, della tutela e della salvaguardia della biodiversità animale della Sardegna.

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo generale di questa tesi è quello di accrescere le conoscenze sulle due razze asinine della Sardegna, ossia l'Asino Sardo e l'Asino dell'Asinara, mediante un approccio biomolecolare. Le conoscenze attualmente disponibili su queste due razze sono, infatti, spesso frammentarie e addirittura discordanti. Se è vero che ancora non si conosce con esattezza quale sia l'origine storica degli asini della Sardegna, risulta altresì controverso il rapporto esistente tra le due razze in questione.

Nello specifico, con il fingerprinting molecolare si cercherà di caratterizzare geneticamente le due razze asinine per capire se vi sia strutturazione o erosione genetica ed eventualmente mettere in evidenza possibili differenze genetiche tra le popolazioni diffuse nel territorio regionale.

Inoltre, l'inclusione di altre principali razze italiane nel nostro piano di campionamento consentirà un confronto tra i pattern genetici ottenuti nelle differenti razze e quindi permetterà di indagare la variabilità genetica della specie nell'ambito Italiano. L'analisi del DNA mitocondriale, infine, consentirà di individuare e valutare i rapporti filogenetici tra le razze esaminate.

Tutto ciò fornirà utili indicazioni scientifiche e nuovi strumenti al servizio della salvaguardia e valorizzazione delle etnie asinine sarde.

INTRODUZIONE

Origine e domesticazione dell'asino

L'asino domestico, *Equus asinus*, appartiene alla classe *Mammalia*, ordine *Perissodactyla*, famiglia *Equidae*, genere *Equus*.

La domesticazione dell'asino è stato un momento determinante nello sviluppo delle società umane, trasformando in maniera decisiva i sistemi di trasporto delle società pastorali e aprendo le porte alla nascita delle prime città in Africa e in Asia. Tutte le evidenze archeozoologiche riguardanti lo studio dei primi equidi domestici, convergono nel ritenere che l'asino sia stato addomesticato prima del cavallo ma sicuramente dopo la maggior parte degli animali di interesse zootecnico come il bovino, la capra, la pecora e il maiale. Se questi ultimi infatti sono stati addomesticati e diffusi in tutto il Mediterraneo a partire dal Neolitico antico (8.000 anni a.C.) e il cane alla fine del Paleolitico (12.000 anni a.C.), per gli equidi bisogna aspettare ancora qualche migliaio di anni.

Studi archeozoologici condotti nell'Alto Egitto, identificano questa regione (la Nubia) come la culla della domesticazione dell'asino. In particolare, nel sito di Abydos, risalente a 4.000-3.000 anni a.C., sono stati evidenziati resti di asino attribuibili a forme domestiche (*Equus asinus*) leggermente diverse rispetto all'asino selvatico africano (*Equus africanus*). Infatti, l'analisi ha mostrato che le ossa metacarpali avevano le stesse proporzioni di quelle dell'asino selvatico africano, mentre i valori relativi alle altre ossa lunghe degli arti sono apparsi intermedi fra quelli dell'asino selvatico e dell'asino domestico moderno (Rossel et al., 2008).



Fig. 1. Sepoltura di due asini domestici nella località Abydos, datati 4.000-3.000 anni a.C.
(da Rossel et al., 2008).

Le somiglianze morfologiche con la specie selvatica e l'impiego degli esemplari esaminati come animali da soma ha suggerito che il processo di domesticazione sia stato lento e complesso, più di quanto finora ritenuto.

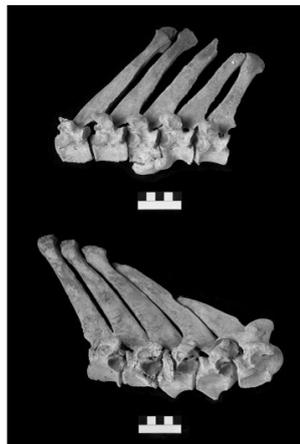


Fig. 2 . Vertebre toraciche degli asini della figura precedente mostranti chiari segni di patologie ossee e articolari, importanti indizi di esposizione a ripetuti stress meccanici come quelli procurati nel trasporto di carichi pesanti. In questi casi viene testimoniata la condizione di domesticità degli animali.
(da Rossel et al., 2008)

Si suppone che verso la fine del quarto millennio a.C., l'asino sia stato esportato dalla Nubia verso l'Asia (Siria e Mesopotamia) e, nel secondo millennio a.C., sia giunto in Europa grazie ai Greci. I Romani, successivamente, diffusero gli asini in tutto l'impero.

Si ritiene che dell'asino selvatico africano (*Equus africanus*) esistessero in passato tre sottospecie: *E.africanus africanus* (Nubia), *E.africanus somaliensis* (Somalia-Eritrea-Etiopia) e *E.africanus atlanticus* (Maghreb). L'unica sottospecie non estinta sarebbe *Equus africanus somaliensis* (denominato anche *E. asinus somalicus*), che vive nella regione del Corno d'Africa.

L' *Equus africanus africanus* (denominato anche *Equus asinus africanus*) era presente nel deserto Nubiano (tra Egitto e Sudan) e probabilmente anche nel nord-ovest dell' Etiopia e in alcune zone dell'Eritrea. L'assenza di recenti avvistamenti di esemplari di questo asino selvatico, assieme alla mancanza di soggetti allevati in cattività, fanno ritenere che tale sottospecie si sia estinta già dal 1950 circa.



Fig. 3. Esemplari di *Equus africanus somaliensis*.

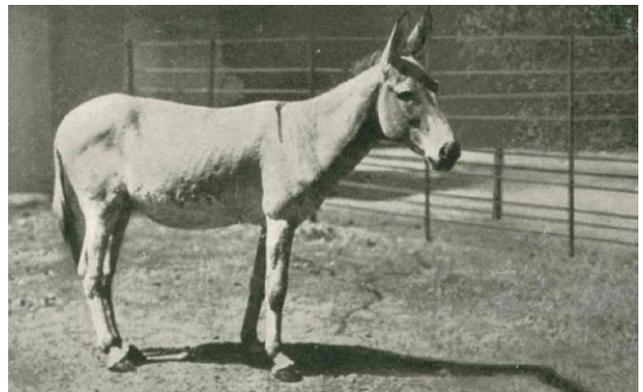


Fig. 4. Esemplare di *Equus africanus africanus*.

L'asino selvatico atlantico (*Equus africanus atlanticus*) è considerato estinto approssimativamente dal 300 a.C. probabilmente a causa della caccia sportiva ad opera dei romani. E' possibile ritrovare raffigurazioni di questo asino proprio in affreschi e mosaici del periodo romano.



Fig. 5. Mosaico romano nel Museo del Bardo (Tunisi) raffigurante una scena di caccia (III-IV secolo a.C.)

Anche in Asia esistono popolazioni di asini selvatici. Si ricordano due principali specie: *Equus hemionus* (detto comunemente Onagro) e *Equus Kiang* (detto comunemente Kiang) che, a loro volta, si dividono in varie sottospecie, spesso di difficile classificazione tassonomica: *Equus hemionus hemionus* (nord Mongolia e Kazakistan), *Equus hemionus onager* (onagro di Persia), *Equus hemionus kulan* (Turkmenistan), *Equus hemionus khur* (Belucistan e India), *Equus hemionus luteus* (sud Mongolia e Cina), *Equus hemionus hemippus* (Siria-estinto), *Equus kiang kiang* (ovest Tibet), *Equus kiang polyodon* (sud Tibet), *Equus kiang holdereri* (est Tibet), *Equus kiang chu* (India e Pakistan) (Geigl et al., 2012).



Fig. 6. Esempi di *Equus kiang*.



Fig. 7. Esempio di *Equus kiang holdereri*.



Fig. 8. Esempi di *Equus hemionus*.



Fig. 9. Gruppo di individui di *Equus hemionus*.

Le ipotesi elaborate dagli archeozoologi sulla domesticazione “africana” dell’asino, sono avvalorate anche da recenti studi genetici. In uno studio sul DNA mitocondriale di asini domestici e selvatici, condotto nel 2004 da Beja-Pereira et al., è stato messo in evidenza come tutti gli asini domestici avrebbero una derivazione esclusivamente africana e non asiatica come taluni avevano ipotizzato in passato.

Come si evince dall’albero filogenetico elaborato in quello studio, e qui di seguito riportato (Fig. 10), esisterebbero due *clade* di aplotipi, uno (Clade I) strettamente correlato a *Equus africanus africanus* (asino africano nubiano), e l’altro più affine a *Equus africanus somaliensis* (asino africano somalo): ciò suggerirebbe che la domesticazione dell’asino sarebbe avvenuta a partire da due diverse popolazioni selvatiche di asino africano, secondo due differenti “linee” di domesticazione.

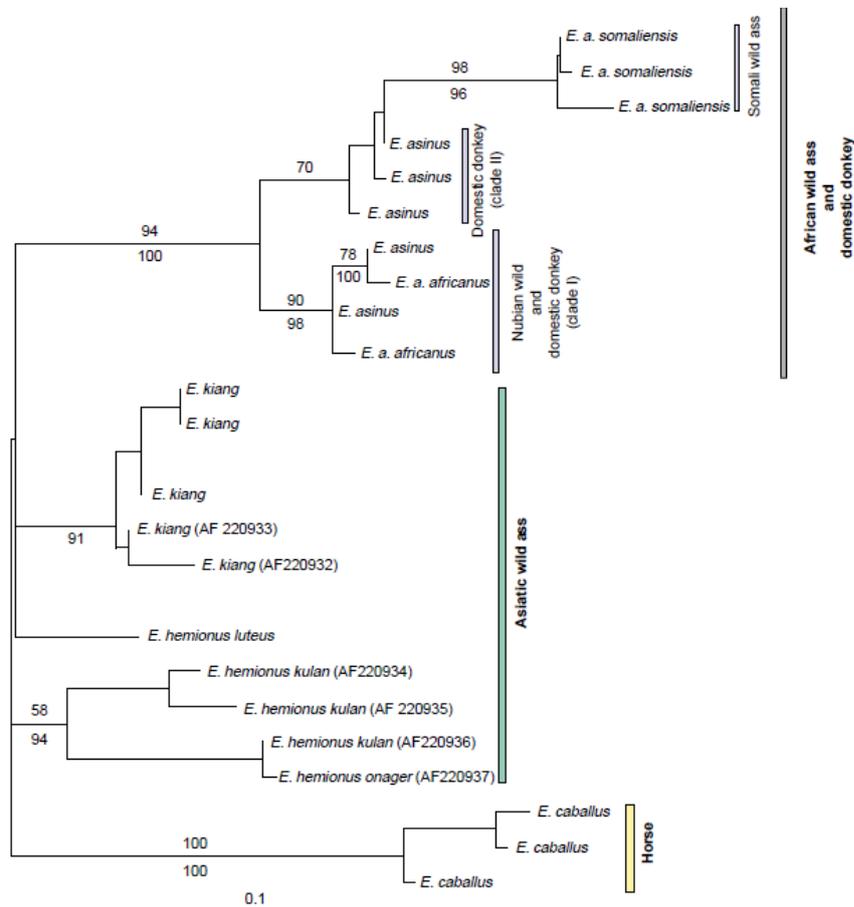


Fig. 10. Albero filogenetico di asini domestici e selvatici (da Beja-Pereira et al., 2004).

Dall'analisi della sequenza della regione ipervariabile del DNA mitocondriale Kimura et al., 2011 è stata confermata l'origine africana dell'asino domestico, ridimensionando il ruolo di *Equus africanus somaliensis* come possibile progenitore. Infatti, mentre sembra certo che *Equus africanus africanus* (nubiano) sia un sicuro progenitore dell'asino domestico, *Equus africanus somaliensis* (somalo) diverge considerevolmente dall'asino domestico, facendo supporre quindi che il progenitore somalo non sia l'attuale *Equus africanus somaliensis*, ma un suo affine ormai estinto.

Anche recenti studi condotti su razze asinine cinesi (Lei et al., 2007; Chen et al., 2010) hanno dimostrato che gli asini domestici della Cina hanno origine africana, sia nubiana che somala.

In un recente studio, i ricercatori della Texas A&M University hanno eseguito un confronto filogenetico tra le sequenze di DNA mitocondriale di asini prelevati nell'isola di Bonaire (nel Mar dei Caraibi) e sequenze note di DNA mitocondriale di asino Nubiano. Ciò avrebbe evidenziato una discendenza diretta dell'asino dell'isola di Bonaire dall'asino Nubiano, ormai estinto.

Alcuni scavi archeologici nella penisola arabica e nel Medioriente hanno portato alla luce resti ossei di *Equus africanus*. A tal proposito Rosenbom et al., nel 2015, hanno condotto uno studio volto a valutare, mediante microsatelliti, la diversità genetica tra asini prelevati in tre presunti centri di domesticazione dell'antichità: nordest Africa (Etiopia, Sudan, Egitto), penisola arabica (Oman, Yemen) e Medioriente (Turchia, Siria, Giordania). I risultati hanno confermato che il nordest Africa è stato sicuramente un centro di domesticazione, ma anche lo Yemen potrebbe essere stato un altro centro di domesticazione.

Riguardo, invece, gli asini selvatici asiatici, le analisi del DNA mitocondriale mostrano una certa distanza genetica rispetto a quelli africani (Geigl et al., 2012; Vilstrup et al., 2013), ma sono comunque necessarie ulteriori indagini, soprattutto per comprendere meglio le relazioni filogenetiche tra le varie sottospecie asiatiche.

Diffusione dell'asino nel mondo e in Italia

Dalla sua culla di domesticazione, l'Africa, l'asino è stato progressivamente introdotto in tutti i continenti del mondo ed ha assunto ruoli differenti prevalentemente in ambito agricolo. In Europa, per questioni climatiche, l'allevamento asinino si è inizialmente diffuso e concentrato quasi esclusivamente nelle regioni centro-meridionali, ossia quelle mediterranee. Tra i principali paesi europei che fin dall'antichità hanno allevato asini si ricordano la Spagna, l'Italia, la Francia e il Portogallo. Nel Nord Europa, invece, l'introduzione dell'asino è avvenuta molto più di recente: in Inghilterra e Irlanda, ad esempio, l'asino è stato introdotto solo dopo l'ultimo conflitto mondiale. Nel continente Americano, l'asino è stato introdotto nell'Ottocento ed è stato ampiamente utilizzato sia per l'agricoltura che per i trasporti. In Asia e Oceania gli asini, di recente introduzione, sono stati impiegati sia per il lavoro che per la produzione carnea.

Nel corso dei decenni, nei diversi continenti, l'andamento della consistenza asinina è variato, anche in funzione del differente sviluppo economico e sociale, come si osserva nel seguente grafico.

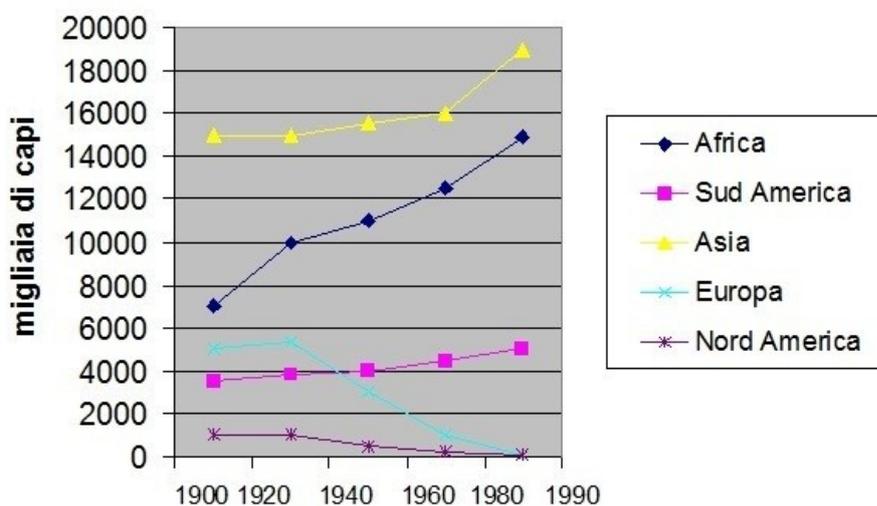


Fig. 11. Evoluzione della popolazione asinina nel XX secolo
(da Chappez G. "L'âne. Histoire, mythe et réalité". Cabédita Ed., 2000. In Pesce A., 2012).

Il grafico mostra due principali trend: il primo, corrispondente ai paesi industrializzati, in cui il numero di animali allevati diminuisce nell'arco del XX secolo, il secondo, riguardante i Paesi in via di sviluppo, dove si ha un aumento del numero di asini. Questo incremento osservato nei paesi in via di sviluppo, come l'Asia e l'Africa, è spiegato da una maggiore arretratezza nella meccanizzazione agricola. In tali paesi gli asini sono infatti ancora oggi utilizzati per il trasporto, la cavalcatura e sono forza motrice nei lavori agricoli.

L'Italia, nel primo Novecento, occupa il secondo posto nelle statistiche della produzione asinina in Europa, con una consistenza di quasi un milione di capi, e primeggia anche per la produzione mulina, come riportato nella tabella di seguito.

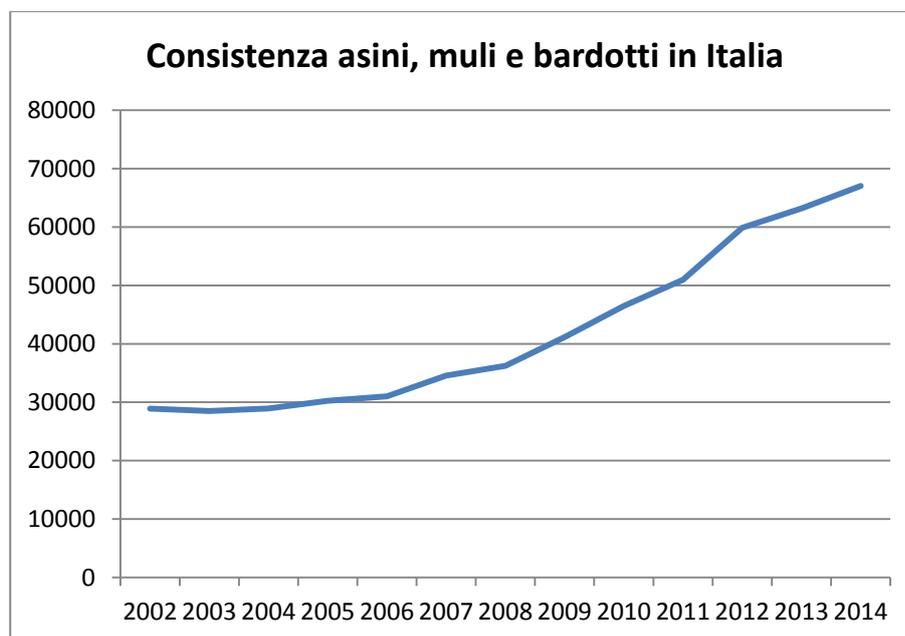
| Asini | Numero Capi | Muli e Bardotti | Numero Capi |
|--------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| Spagna | 1.137.900 | Spagna | 1.294.900 |
| Italia | 949.000 | Italia | 496.700 |
| Francia | 296.000 | Francia | 186.400 |
| Grecia | 243.600 | Grecia | 127.300 |
| Rep. Ceca | 155.000 | Irlanda | 25.700 |
| Bulgaria | 84.200 | Bulgaria | 20.400 |
| TOT | 2.865.700 | TOT | 2.151.400 |

Censimento della popolazione asinina europea
(Tortorelli N. "L'asino" – Ed Paravia, 2007. In Pesce A., 2012).

Il decremento della popolazione inizia nella prima metà del XX secolo: già nel 1941 la popolazione asinina conta solo più 640.000 capi. Dopo la seconda Guerra Mondiale, venuta meno la funzione di asini e muli come animali da trasporto per l'artiglieria dell'esercito, si osserva un nuovo trend negativo, che porterà, nell'arco di quarant'anni, alla quasi totale estinzione di molte razze. Nel 1981, l'ISTAT dichiarava 125.000 asini di cui ben 100.000 concentrati nel Meridione. Sette anni dopo, nel 1998, gli asini si riducevano a 30.000 con la maggiore densità in Campania, Sicilia, Sardegna e la minore in Pianura Padana con appena 2.000 capi.

Nel 1992, uno studio della SAVE Foundation individua e censisce otto razze e popolazioni asinine, di cui cinque a rischio critico di estinzione (meno di 100 individui): Asinara, Martina Franca, Pantasca, Romagnola, Grigio Siciliano; e tre in pericolo (da 100 a 1.000 capi): Amiantino, Ragusano, Sardo. Lo stesso studio evidenzia in Italia già sei razze estinte: Cariovilli, Castelmorone, Emiliano, Grigio Viterbese (o Viterbese), Irpinia, S.Alberto.

Fortunatamente, già dal 2005, si è potuta osservare una graduale ripresa dell'allevamento, soprattutto grazie alla riscoperta delle "nuove potenzialità" dell'asino. L'asino diviene progressivamente un animale da compagnia, particolarmente apprezzato nell'onoterapia e diventa una risorsa della multifunzionalità agricola, trovando impiego negli agriturismi, fattorie didattiche e negli allevamenti per la produzione di latte d'asina a fini alimentari e cosmetici.



Trend positivo nel censimento della popolazione asinina italiana nel XXI secolo (dati Istat).

L'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.) si occupa di tutelare le razze asinine presenti nel territorio nazionale. Sono stati istituiti i Registri Anagrafici delle razze asinine a limitata diffusione che definiscono gli standard di razza.

In Italia sono presenti ben otto principali razze asinine delle quali vengono riportate di seguito le consistenze relative al 2015:

| RAZZA | CONSISTENZA |
|----------------------|-------------|
| ASINO ROMAGNOLO | 702 |
| ASINO PANTESCO | 76 |
| ASINO AMIATA | 2166 |
| ASINO RAGUSANO | 2813 |
| ASINO ASINARA | 202 |
| ASINO SARDO | 1874 |
| ASINO MARTINA FRANCA | 1210 |
| ASINO VITERBESE | 189 |

Il totale di asini registrati negli otto Registri Anagrafici è pari a 9.232 soggetti su un totale nazionale di 75.556 asini registrati in anagrafe.

E' doveroso precisare, tuttavia, che i sopra citati valori sono fortemente sottostimati per una limitata efficienza del sistema anagrafico, dovuta anche ad una certa ritrosia degli allevatori e possessori di asini nell'iscrivere i propri capi in anagrafe, specie per motivi legati ai costi di iscrizione e al timore di dover sottostare a tasse di proprietà.

Le razze asinine italiane sono tutte inserite nella Risk Status Classification della FAO, come riportato nella tabella seguente:

| ASINI | | | | |
|--------------------|------------------|---------------|----------------|----------------|
| Estinta | Critica | Critica Mant. | Minacciata | Minac. Manten. |
| Cariovilli | Dell'Asinara | | Dell'Amiata | |
| Grigio viterbese * | Di Pantelleria | | Martina Franca | |
| Sant'Alberto | Grigio Siciliano | | Ragusano | |
| | Romagnolo | | Sardo | |
| | | | | |
| | | | | |

* nel 2013 questa razza è stata riclassificata come "Critica"

Asini in Sardegna : reperti archeologici e fonti letterarie

L'origine degli asini in Sardegna è una questione non ancora risolta definitivamente. Si suppone che l'asino nell'isola fosse presente fin da tempi molto antichi, ma non si conosce ancora esattamente quando sia stato introdotto e ad opera di chi. Secondo alcuni Autori sarebbero stati presenti nell'isola già dal Neolitico, secondo altri sarebbero stati importati dai Fenici, mentre per altri ancora sarebbero arrivati dalla Nubia, culla degli asini africani.

Nella sua opera *Evoluzione storica dell'attività industriale agricola caccia e pesca in Sardegna* (1974), Cherchi Paba afferma che l'asino sardo, originario dell'Etiopia, sarebbe stato introdotto in Sardegna fin dal III millennio a.C., in concomitanza con lo sviluppo del commercio marittimo dell'ossidiana, e si sarebbe diffuso durante la civiltà nuragica. Tuttavia, ad oggi, questa tesi non è confermata dagli scavi archeologici nei siti nuragici poiché non è possibile rinvenire in tali scavi resti ossei attribuibili ad asini. I pochi resti di equidi rinvenuti in contesti nuragici sono infatti talmente esigui, e soprattutto non sono mai stati datati al C14, per cui non si può escludere che tali resti siano sprofondati negli strati nuragici da strati più recenti come quelli romani. A tale proposito si ricorda lo studio condotto da Zedda (2010) su resti faunistici rinvenuti nello scavo della necropoli eneolitica di S'Elighe Entosu (Usini). In questa indagine è emersa la presenza di alcune falangi attribuite all'asino ma, poiché la stratigrafia è stata sconvolta, non si può escludere che provenissero da strati più superficiali.



Fig. 12. Frammento di vertebra cervicale di asino proveniente dallo scavo della necropoli eneolitica di S'Elighe Entosu a Usini (da Zedda 2010).



Fig. 13. Frammento di falange prossimale di asino proveniente dallo scavo della necropoli eneolitica di S'Elighe Entosu a Usini (da Zedda 2010).

Dagli scavi archeologici effettuati nelle città fenicie di Sulky e Tharros sono emersi alcuni resti ossei di asino risalenti all'età del ferro: si è diffusa quindi l'opinione che l'introduzione di questa specie in Sardegna sia avvenuta ad opera dei fenici e, successivamente, dei cartaginesi.

Scavi di periodi storici più recenti (età romana e medievale) hanno portato alla luce un numero maggiore di frammenti ossei appartenenti ad asini, perlopiù adulti. Si ricordano, ad esempio, i reperti della villa romana di Sant'Imbenia e del Forte della Maddalena (Alghero), quelli del villaggio altomedievale di Santa Filittica (Sorso), e altri provenienti da vari scavi archeologici di Sassari, Nulvi, Olmedo, Geridu (Sorso) e dal castello di Monteleone Roccadoria. Ulteriori reperti ossei, risalenti all'età moderna, sono stati rinvenuti a Sassari, Alghero, Olmedo, Saccargia e Castelsardo.

In generale, sebbene si tratti spesso di reperti molto frammentati, è stato possibile trarre alcune utili informazioni.

Anzitutto, la totale assenza di segni di macellazione fa supporre che questi animali non fossero destinati al consumo alimentare, ma venissero impiegati quasi esclusivamente per il lavoro agricolo, quali animali da soma e da traino. Inoltre, grazie all'applicazione di formule ed indici in uso per la specie equina, è stato possibile stimare le altezze al garrese da ossa quali omero, radio, metacarpo e metatarso.

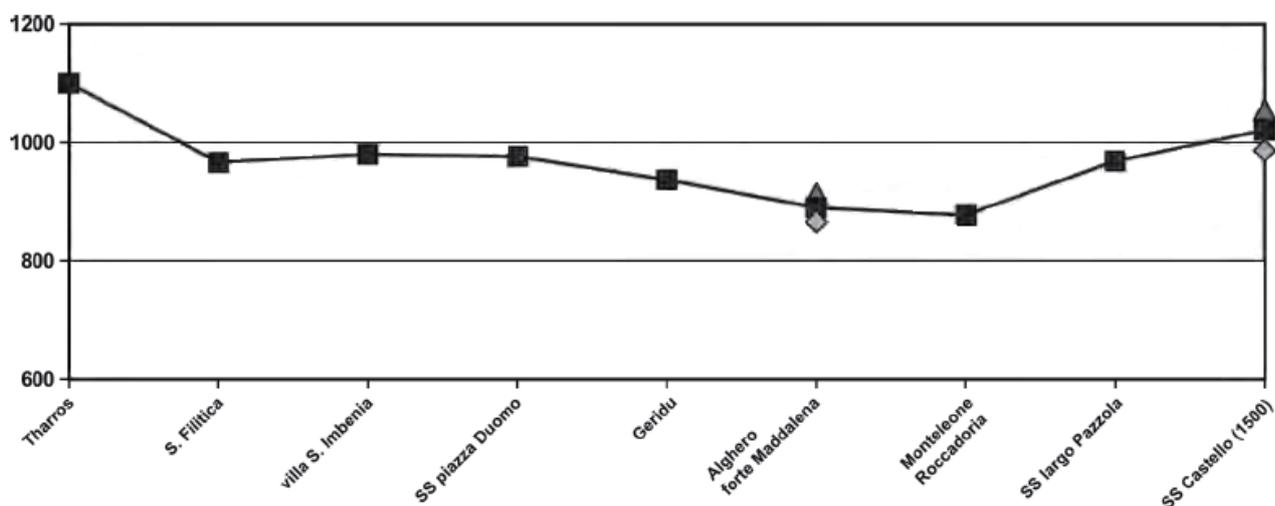


Fig. 14. Altezze al garrese di asini provenienti da scavi archeologici
(da Wilkens 2012).

Dal grafico si può osservare come l'altezza al garrese degli asini in Sardegna si sia sostanzialmente conservata nel tempo: dall'alto Medioevo all'età moderna, raramente gli asini superavano il metro di altezza.

Accanto alle notizie archeologiche, anche le fonti letterarie forniscono utili informazioni sulla presenza degli asini in Sardegna fin dall'antichità. La maggior parte degli Autori si limita a fornire semplici cenni su questi animali, ma ve ne sono alcuni che forniscono descrizioni più dettagliate e precise.

Nei frammenti delle *Saturae* di Lucilio (150 a.C.), VI libro, si fa riferimento alla presenza in Sardegna di "equum musimonem", termine che Nonio, in *De Compensiosa Doctrina per litteras ad filium* (IV sec. d.C.), definisce come "asini, muli aut equi breves", citando come fonti lo stesso Lucilio e Cato de Letorio.

Il termine "musmonum" compare anche in diverse trascrizioni dell'opera di Plinio il Vecchio *Naturalis Historia* (77-79 d.C.), rimandando nelle annotazioni al termine "equum musimonem" delle *Saturae* di Lucilio.

Il Fara, nel II libro dell'opera *Chorographie Sardiniae* (1580), riferisce che "Vi sono in Sardegna anche muli ed asini, di piccola taglia che Nonio e Lucilio chiamano musimones davvero utili ed in grado di sopportare le fatiche più pesanti...".

Infine, riferimenti a Lucilio e Cato de Letorio sono presenti anche nell'opera *Totius Latinitatis Lexicon* (Forcellini E. 1771) alla voce Musimo, e nell'opera del Pais *Storia della Sardegna e della Corsica* (1923) si legge che "Fra i Romani erano detti musmones anche gli asini, i muli ed i cavalli di piccola statura".

Testimonianze sulla presenza di asini selvatici di piccole dimensioni in Sardegna sono riportate in vari scritti dei secoli XVII, XVIII e XIX.

Nell'opera *Conciones et exercitia pia, super Evangelia Dominicalia totius Anni - Vol. I* (1610), ad esempio, Diego De La Vega parla della presenza in Sardegna di asini liberi di errare di monte in monte. Nell'opera *L'Afrique de Marmol* (1667), si afferma di aver visto in Sardegna un gran numero di asini, più piccoli di quelli visti nel deserto della Numidia e della Libia: "Tambien vimos grande manadas de stos asnos salvajes en Cerdena, aunque son mas pequenos". Nell'opera *Cadiz Phenicia - Vol.I* (1805), inoltre, si afferma che la città di Cagliari "produceva un gran numero di asini selvatici". La presenza di asini selvatici in Sardegna è infine segnalata anche da Leclerc-Buffon e Roig nell'opera enciclopedica *Los tres reinos de la naturaleza o museo pintoresco de historia natural* (1853).

Di asini sardi *piccoli, vivaci e forti* parla Azuni nella sua opera *Essai sur l'histoire géographique, politique et naturelle du Royaume de Sardaigne* (1798), definendoli molto più piccoli di quelli italiani e francesi. Anche nell'opera *Histoire de la Sardaigne* di Mimaut (1825) si fa riferimento alla piccolezza degli asini della Sardegna definendola un capriccio della natura: "Les anes sardes victimes d'un caprice de la nature". Persino Cervantes nel suo famosissimo *Don Quijote* (1836) cita l'asino sardo "asno..pequeno sardesco", conosciutissimo in Spagna proprio per le sue piccole dimensioni almeno dal XVII secolo.

Le fonti letterarie finora citate, forniscono solamente dei cenni sulla presenza degli asini nell'isola, soffermandosi soprattutto sulle piccole dimensioni e sulla selvaticità di questi animali.

Tra l'altro, circa la presenza di asini selvatici, gli autori non sono pienamente concordi. L'illustre gesuita Cetti, ad esempio, nell'opera *Storia naturale di Sardegna- I quadrupedi di Sardegna* (1774), mette in dubbio la teoria riportata nell'opera *L'Afrique de Marmol* affermando che "onagri oggi non ci sono in parte veruna" e che Martin Carrillo, emissario del re Filippo III di Spagna, "che visitò il regno nell'anno undici del secolo decimo settimo.....non fa menzione alcuna degli onagri",

quando descrive gli asini all'interno della sua relazione al re. Cetti conclude pertanto che "L'unico asino dunque, che esiste, ed esiste unico da gran tempo, e forse esistette unico sempre, è l'asino domestico".

Altre importanti informazioni molto più precise sulla presenza e l'impiego degli asini in Sardegna provengono da testi del periodo giudiciale: la *Carta de Logu* (1355-1376) e il *Breve di Villa di Chiesa* (1327).

In questi testi gli asini vengono definiti "Molentes" o "Molenti" o "Mulenti" in quanto impiegati per la macinazione (molitura) del grano. Da questi testi si evince che l'asino domestico avesse una grande importanza per la società agropastorale del tempo, svolgendo uno dei più preziosi servizi per la popolazione fin dall'antichità, ossia quello di macinare il frumento e di ottenere una farina di ottima qualità.



Fig. 15. Fotografia dei primi del Novecento che mostra un asino sardo utilizzato per la macinatura del grano (fonte *Sardegna Cultura*).

L'asino molitore veniva considerato un bene preziosissimo per ogni famiglia e, per questo, le leggi dell'epoca prevedevano la pena dell'impiccagione per chiunque rubasse questo animale. Inoltre, gli stessi scritti evidenziano anche l'esistenza della figura professionale del "molentaro" ossia del custode di asini, deputato alla loro cura e protezione.

Il *Dizionario geografico-storico-statistico-commerciale degli stati di S.M. il Re di Sardegna* (1833-1856) di Casalis riporta un “Atto di donazione della regione della Trecenta dal giudice Torgotorio di Cagliari al suo figlio Salusio di Lacon”. In questo testo giudicale, tra gli altri beni, il Giudice dona a suo figlio anche i “molentis”, che vengono distinti dal resto del bestiame, quasi a volerne rimarcare l’importanza speciale che essi rivestivano.

La funzione di molitore è stata conservata nel corso dei secoli successivi, fino a periodi relativamente recenti.



Fig. 16. Fotografia dei primi del Novecento che mostra un asino sardo utilizzato per la macinatura del grano. Si notino le dimensioni dell’animale: l’altezza al garrese è all’incirca la stessa della mola.
(fonte *Sardegna Cultura*)

Nel periodo aragonese, ad esempio, questa pratica era diffusa in tutto il Regno di Sardegna: nell’opera *I Malaspina e la Sardegna* (1345), viene riportato un ordine del re Pietro IV d’Aragona in cui vengono menzionati gli asini molitori e i lavoratori “molendini”, che lavoravano nei mulini della baronia di Osilo (Documento 404).

Anche il Cetti, nell’opera *Storia naturale di Sardegna- I quadrupedi di Sardegna* (1774) descrive la pratica di impiegare l’asino per la macinazione del grano e fa risalire il termine “su molente” all’espressione dell’autore romano Columella “Molarum, et conficiendi frumenti pene solemnus est huius pecoris labor” (*De re rustica- Lib. VII, cap.I*). Questa frase di Columella viene ripresa inoltre

da Azuni nella sua opera *Historie géographique, politique et naturelle de la Sardaigne* (1802), proprio per confermare l'etimologia del nome "mulenti".

Sempre Cetti afferma che "Ne' villaggi del Campidano, ove scarseggia l'acqua, il numero ne è maggiore; ogni casuzza ne ha di suo almeno uno; l'asinello per ogni famiglia vi è riputato essenziale quanto la pignatta; in un angolo bolle la pignatta, nell'altro rumoreggia la macinuzza, e gira il molente; però il numero degli asini vi supera facilmente quello de' fuochi." Inoltre evidenzia come il governo degli asini fosse affidato "ad un pastore stipendiato", a conferma dell'importanza centrale di questo animale nel mondo agropastorale del tempo.

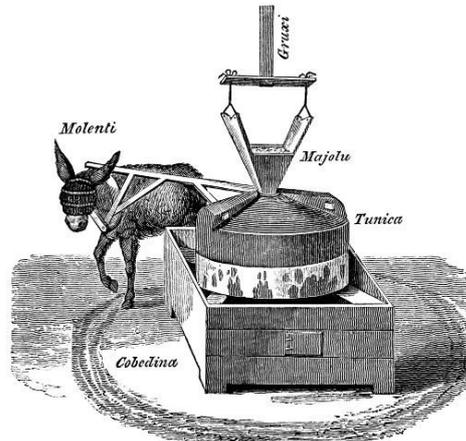
Accanto alla funzione di macinatore, l'asino ha sempre svolto anche la funzione di trasporto dell'acqua. Ancora Cetti (1774), in riferimento al trasporto dell'acqua mediante l'impiego degli asini afferma "A questo servizio è deputato in parte l'asinello; esso è succeduto agli acquedotti, come forse gli aveva preceduti".

Azuni riferisce dell'impiego quotidiano dell'asino per il trasporto di acqua dalle fontane alle case nella città di Sassari.



Fig. 17. Sassari, fontana del Rosello. Fotografia dei primi del Novecento (1914 ca) raffigurante alcuni asini impiegati per il trasporto di acqua nella città (fonte Archivi Alinari – Firenze).

Numerosi altri autori riferiscono di queste due principali mansioni svolte dagli asini in Sardegna. Per brevità vengono qui solo citati con il riferimento della data delle rispettive opere, per le quali si rimanda alla bibliografia. Fuos (1780), Madao (1792), Francesco D’Austria-Este (1812), Charles De Saint-Severin (1827), Smyth (1828), Valery (1837), La Marmora (1839), Tyndale (1849), Bresciani (1860), Tennant (1885), Vuiller (1891).

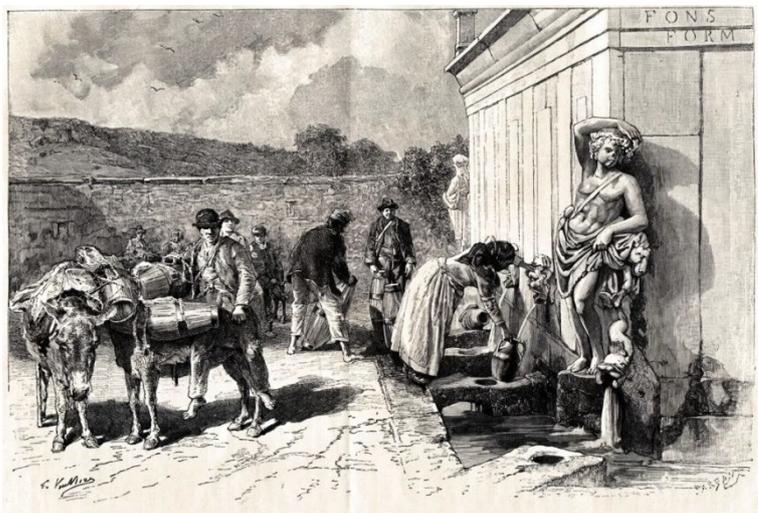


Rappresentazione di un mulino - fonte Smith 1828

Fig. 18. Rappresentazione di un mulino (fonte Smith 1828)



Un giovane asinaio - fonte Vuiller 1891



Sassari. La fontana di Rosello - fonte Vuiller 1891

Fig. 19 e 20. Rappresentazione di un giovane asinaio (a sinistra) e della fontana del Rosello di Sassari (fonte Vuiller 1891).

Questi autori riferiscono anche dell'impiego di asini per il trasporto di persone, legname e utensili da lavoro, tutte funzioni mantenute fino all'avvento della meccanizzazione in campo agricolo.



Fig. 21. Fotografie relative all'impiego degli asini per il trasporto di legname e persone in varie località della Sardegna (anni '30-'50).

In conclusione è possibile affermare che, al di là della esattezza e della completezza delle informazioni a noi giunte dal passato, la presenza dell'asino in Sardegna è molto antica e che questo piccolo animale ha sempre svolto un ruolo importantissimo nell'economia dell'isola, contribuendo al suo sviluppo e al suo progresso.

Asini dell'Asinara

Un capitolo a parte meritano gli asini albini dell'Asinara. Questa razza è stata riconosciuta tale solo di recente, anche per la scarsità di notizie storiche che sono, peraltro, spesso imprecise, fantasiose e discordanti tra loro.

Una prima ipotesi sull'origine della razza afferma che la presenza degli asini albini sull'isola dell'Asinara sarebbe conseguenza del naufragio, nei pressi dell'isola, di una nave che trasportava i suddetti asini dall'Egitto alla Francia, per volere del re Luigi XIV. Un'altra ipotesi afferma che alcuni asini bianchi sarebbero stati importati dall'Egitto dal Marchese di Mores e Duca dell'Asinara, don Antonio Manca Pilo Amat Tola. Di quest'ultima teoria parla Cherchi Paba nella sua opera *Evoluzione storica dell'attività industriale, agricola, caccia e pesca in Sardegna* (1974): "nell'800 il Marchese di Mores, duca dell'Asinara, importò dall'Egitto i somari bianchi, numerosi nel Cairo, dove erano gli animali da soma preferiti delle dame Egiziane...non pensò a luogo più adatto, ... che all'isola dell'Asinara... dove questa razza particolare di asini si riproduce stentatamente, mantenendosi sulla media di una trentina di esemplari o poco più".

Purtroppo queste teorie non possono essere confermate per la mancanza di documenti storici e prove attendibili.



Fig. 22. Fotografia degli anni '50 scattata in una piana dell'isola dell'Asinara mostrante un gruppo di asini dal caratteristico mantello bianco.

Tuttavia esistono interessanti notizie che ci aiutano a ricostruirne la storia.

La presenza di asini selvatici nell'isola dell'Asinara è attestata da diversi autori del XIX secolo. Si ricorda, tra gli altri, Casalis che, nella sua opera *Dizionario geografico-storico-statistico-commerciale degli stati di S.M. il Re di Sardegna* (1833-1856), ipotizza che la loro presenza si possa far risalire già dalla dominazione cartaginese e romana e addirittura in tempi più antichi. Secondo lo stesso autore, inoltre, il nome Asinara potrebbe essere dovuto proprio alla presenza di questi asini selvatici. Anche l'autore inglese Tyndale, nell'opera *L'isola di Sardegna* parla della presenza di asini selvatici sull'Asinara, paragonandoli agli abitanti dell'isola "rimasti allo stato primitivo".

Un'altra opera in cui emerge la presenza di asini sull'isola dell'Asinara è la *Biblioteca Arabo-Sicula* del 1880 (Dalli 2005) in cui viene riferito che l'Asinara era nota nel mondo arabo come isola "madre degli asini".

Un aspetto molto interessante è che, nonostante si parlasse di asini sull'isola dell'Asinara, nessun autore riferisce della presenza in essa degli asini albini, ma solo di generici asini selvatici: ciò desta molta perplessità, perché, di certo, la presenza di questi particolarissimi animali non sarebbe passata inosservata. Perciò questa assenza di riferimenti letterari sulla razza albina potrebbe essere spiegata o reputandola una "razza recente" (fine '800, inizio '900) oppure ipotizzando che solo pochi autori abbiano visitato realmente l'isola e, magari, non abbiano incontrato nessun esemplare albino, dato il loro carattere schivo dovuto alla loro spiccata selvaticità.

Arnaldo Satta-Branca, nella sua opera *Giornale della antica Sardegna* (1968), parlando della infeudazione dell'isola, avvenuta nel 1775, afferma che "...l'isola fosse in effetto popolata da asini selvatici, compresa una razza pregevolissima dal mantello bianco...".



Fig. 23. Asini dell'Asinara negli anni '50.

Da alcune testimonianze orali dei discendenti degli abitanti dell'isola dell'Asinara, la presenza di questi asini albini può esser fatta risalire alla fine del XIX secolo: infatti si ritiene che, quando nel 1885 gli asinaresi furono costretti a lasciare l'isola, diventata colonia penale, vi abbandonarono gli esemplari albini.

Il *Bollettino Ufficiale del Ministero dell'Agricoltura, Industria e Commercio* del 1905 riporta la Relazione del Maggiore A. Barzacchi, Direttore del Deposito Cavalli Stalloni di Ozieri, nella quale si fa riferimento alla diffusa presenza degli asini dal mantello bianco sull'isola dell'Asinara prima che questa fosse trasformata in un lazzaretto nel 1885. In questa pubblicazione si legge che "Questi animali erano (come i loro confratelli sardi di mantello sorcino e raramente baio-scuro) di somma resistenza e parsimoniosi nel cibo, ma erano, a causa del mantello, più eleganti e di pochi centimetri più alti, per cui venivano pagati quasi il doppio degli altri asini comuni".

Un'altra chiara e autorevole testimonianza scritta su questi asini è rappresentata dalla *Relazione del campo di prigionieri colerosi all'isola dell'Asinara nel 1915-1916* redatta dal Gen. Div. Ferrari. In questo testo si legge che dall'isola "non si esporta nulla, all'infuori di pochi asinelli bianchi cogli occhi azzurri, che vivono allo stato selvaggio nelle montagne". Questa affermazione ha una duplice importanza: da un lato attesta la presenza di asini albini selvatici sull'isola già agli inizi del 900, dall'altro evidenzia come questi esemplari fossero oggetto di esportazione.

Nelle *Memorie Ippiche* di Bruno Vanzi, relative al periodo 1914-1923 in cui fu direttore del Regio Deposito Stalloni di Ozieri, riguardo gli asini dell'Asinara si legge "Dopo la guerra 1915-1918 gli asinelli bianchi dell'Asinara erano diventati, più che non lo fossero prima, una vera rarità perché i prigionieri austriaci concentrati nell'isola (e forse anche... i loro custodi) avevano fatto strage di quei graziosi equini che vivevano in numero limitato ed allo stato libero". Lo stesso autore riferisce, inoltre, che nella Tenuta di S. Angelo nell'iglesiente, venne costituito un nucleo di riproduttori, raccolti in varie località della Sardegna, al fine di preservare "quella non comune varietà asinina".

Partendo da testimonianze orali, Colombani afferma, nella sua pubblicazione scientifica sull'albinismo nell'asino di razza sarda (1963), che "la comparsa del primo soggetto dal manto totalmente bianco si possa far risalire a circa 30-35 anni fa", quindi intorno al 1930, e aggiunge "...in questo periodo il numero medio degli albini è di 8 femmine e 10 maschi...Tale gruppo venne costituito nella colonia dell'Asinara senza alcuna finalità economica, verosimilmente a scopo

folkloristico”. Secondo Colombani, dopo la comparsa del primo soggetto bianco (da asini grigi), “i soggetti successivi, vennero ottenuti o mediante accoppiamento del figlio del figlio bianco con la madre colorata, oppure con quello della figlia bianca con il padre colorato”. Secondo questa tesi, quindi, l’asino dell’Asinara sarebbe semplicemente la variante albina dell’asino Sardo il cui numero sarebbe stato incrementato attraverso precisi accoppiamenti in stretta consanguineità.



Fig. 24. Esemplare di asino dell’Asinara in una fotografia degli anni '50.

Nelle varie fonti letterarie storiche consultate è stato possibile individuare anche alcuni interessanti cenni sulla presenza di asini bianchi in Sardegna.

Nel *Bulletin de la Société Nationale d'Acclimatation de France* (1887) si legge che nel giardino zoologico di Marsiglia era presente un puledro meticcio ottenuto dall’incrocio tra una femmina di *Equus burchelli* (un tipo di zebra) e un Asino bianco di Sardegna (“Ane blanc de Sardaigne”). Anche l’opera *Tratado de la cria del caballo, mula y asno y principios generales de equitacion* (1843) riferisce che in Sardegna vi sono asini molto piccoli, forti e agili e di una bianchezza straordinaria (“de una blancura straordinaria”).

Nell' edizione n.50 della rivista tedesca *Über Land und Meer* (1877), è possibile osservare un dipinto della fontana di monte Rosello a Sassari in cui compaiono due asini bianchi.



Fig. 25. Stampa del 1877 raffigurante numerosi asini attorno alla fontana di Rosello a Sassari (fonte rivista *Über Land und Meer*).

Infine, è stato possibile reperire la riproduzione di una tela, risalente al 1826, in cui è presente un asino dal mantello bianco accanto ad asini dal tipico mantello grigio sorcino.



Fig. 26. Tela risalente al 1826 in cui è presente un asino dal mantello bianco accanto ad asini dal tipico mantello grigio sorcino (fonte *la Nuova Sardegna*).

Queste notizie rappresentano un interessante indizio sulla presenza di asini bianchi in Sardegna e, sebbene non chiariscano nulla sul carattere dell'albinismo, sono comunque spunto per ulteriori indagini.

Asini in Sardegna oggi

In Sardegna la popolazione asinina ha subito, nel corso dei decenni, le stesse dinamiche che hanno interessato l'Italia e l'Europa. A partire dal secondo dopoguerra, il numero di asini nell'isola è cominciato a diminuire vertiginosamente. Tale diminuzione è da attribuire anzitutto all'avvento della meccanizzazione del settore agricolo: gli asini, che per secoli avevano ricoperto un ruolo essenziale nell'economia rurale, sono stati così sostituiti dai mezzi agricoli. Inoltre, nella fase di transizione verso la meccanizzazione agricola, sono stati introdotti in Sardegna riproduttori di altre razze, aventi taglie superiori e quindi più apprezzate: in questo modo, razze quali il Martina Franca, il Ragusano e l'Amiata, hanno contribuito alla sostituzione di parte della popolazione asinina della Sardegna, generando un notevole numero di soggetti meticcii. Questi eventi, nel complesso, hanno determinato un brusco calo del numero di capi nell'isola e la perdita di buona parte del patrimonio genetico. Da qui l'esigenza di tutelare le razze autoctone sarde attraverso l'inserimento nei relativi Registri Anagrafici presso l'A.I.A. e nella "Risk Status Classification" della FAO.



Fig. 27. Esempjari di asino dell'Asinara (a sinistra) e asino Sardo (a destra)
(fonte Parco Nazionale dell'Asinara).

Da diversi anni, inoltre, la Regione Sardegna predispone dei piani di tutela e salvaguardia di tutte le razze autoctone dell'isola, anche attraverso il pagamento di un contributo agli allevatori e promuovendo la ricerca tecnico-scientifica in seno ai suoi centri di ricerca, quali il Servizio di ricerca per la qualità e la valorizzazione delle produzioni equine dell'Agenzia AGRIS Sardegna.

Riguardo l'asino dell'Asinara, è doveroso segnalare che l'istituzione dell'Ente Parco dell'Asinara e la creazione di alcuni nuclei di asini allevati in purezza ex situ hanno contribuito non poco al mantenimento della razza.

Fortunatamente, negli ultimi anni si sta assistendo a un sempre più crescente interesse nei confronti delle due razze asinine sarde. Diversi allevatori sul territorio regionale hanno intrapreso la strada dell'allevamento degli asini in purezza, conseguendo anche buoni risultati economici dalla vendita di soggetti selezionati. Si stanno diffondendo nell'isola le stazioni di monta asinine e il numero di capi allevati sta aumentando.

L'asino sembra stia rivivendo un nuovo fiorimento, specie in nuove attività nell'ambito del turismo (passeggiate, trekking) e dell'onoterapia.



Fig. 28. Esemplare di razza Sarda con evidente riga mulina crociata e zebraure agli arti

Le due razze sarde sono poi molto apprezzate anche nel resto d'Italia e all'estero: ciò è dovuto principalmente alle loro piccole dimensioni e, nel caso della razza Asinara, anche per il caratteristico mantello. Esistono nuclei di asini sardi (o loro derivati) in diversi paesi europei e negli USA. A livello internazionale è ormai una realtà molto conosciuta l'associazione *Miniature Mediterranean Donkey Association* che ha addirittura istituito un vero e proprio stud book: buona parte degli asini iscritti sono discendenti di asini sardi esportati in passato fuori dall'isola.

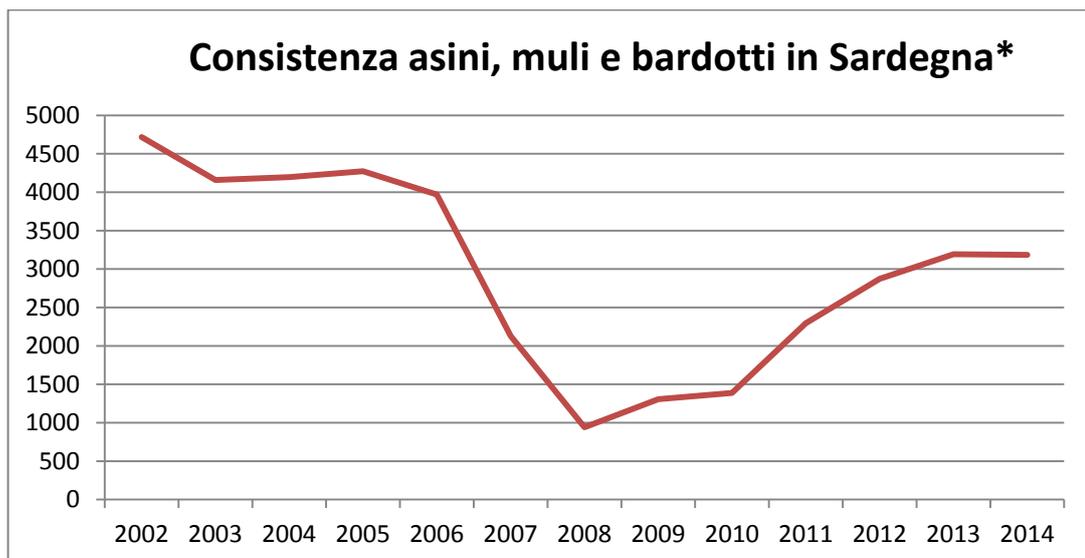
Riguardo l'asino dell'Asinara, si ricorda un importante nucleo di asini allevati nel parco "Città della Domenica" a Perugia.

E' interessante segnalare anche la presenza di una razza di asini austriaca, denominata Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel, che, secondo una teoria non convalidata scientificamente, sembra derivi da soggetti albi dell'Asinara esportati dall'isola dopo la prima guerra mondiale.



Fig. 29. Esempari di razza Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel
(fonte <http://www.weisse-barockesel.at/>)

Viene di seguito riportato un grafico sull'andamento della consistenza della popolazione asinina in Sardegna dal 2002 al 2014 (dati ISTAT):



*il numero di muli e bardotti nell'isola è sempre stato molto basso

Riguardo la consistenza di asini albi sull'isola dell'Asinara non si hanno notizie certe. Verso la fine degli anni 90, in vicinanza della chiusura del carcere (avvenuta nel 1998), si contavano sull'isola circa 70-75 soggetti albi. Attualmente si stima che l'isola sia abitata da circa 120-140 asini albi distribuiti al centro-sud dell'Asinara: i soggetti albi del centro dell'isola vivono spesso in nuclei familiari misti, cioè insieme a soggetti fenotipicamente grigi (asino Sardo; circa 240-250 capi stimati che vivono nel centro-nord dell'isola), con cui si incrociano frequentemente originando soggetti "meticci" fenotipicamente grigi. Questi ultimi, inoltre, incrociandosi tra loro, generano spesso individui albi.

Un altro importante gruppo di asini dell'Asinara si trova presso l'azienda di Foresta Burgos dell'Agenzia AGRIS Sardegna (circa 40 capi).



Fig. 30. Esempari di razza Asinara allevati presso il centro di Foresta Burgos (AGRI Sardegna)

Considerata l'attuale mancanza di iscrizione anagrafica dei soggetti albi sull'isola dell'Asinara e a causa di un non sempre preciso funzionamento dello stesso sistema di flusso dati dell'anagrafe, non è possibile fornire dati certi sulla consistenza di asini dell'Asinara in Sardegna.

Aspetti morfologici e biometrici

Nel 1990 il Ministero dell'Agricoltura ha istituito presso l'Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.) il "Registro Anagrafico delle popolazioni equine riconducibili a gruppi etnici locali" (DM 27 luglio 1990), oggi denominato "Registro Anagrafico delle razze equine ed asinine a limitata diffusione". L'istituzione di tale registro rientrava nell'ambito delle azioni avviate dal Ministero per la salvaguardia della biodiversità animale con particolare riferimento alla tutela delle razze o popolazioni autoctone italiane aventi limitati areali di distribuzione e non sempre salvaguardate da specifici libri genealogici.

Con la stesura delle norme tecniche e degli standard di razza, nel 1994 le razze asinine della Sardegna (asino Sardo e asino dell'Asinara), per la loro specificità geografica e per le loro peculiarità morfologiche (prime tra tutte la bassa statura ed il colore del mantello), sono state inserite fin da subito all'interno del Registro.

Tali norme prevedono che l'iscrizione di un soggetto al relativo registro deve avvenire previa verifica della rispondenza agli standard di razza da parte di un esperto A.I.A. Gli standard riguardano il fenotipo del soggetto, con riferimento al colore del mantello, alla conformazione e ai principali parametri biometrici (altezza al garrese, circonferenza del torace e circonferenza dello stinco).

Riguardo alla razza Sarda, il mantello è di colore grigio sorcino con riga mulina crociata, il ventre chiaro, la criniera scarsa e più scura del colore del mantello, le orecchie con bordo scuro e la coda lunga con scarsi crini. Possono essere presenti anche zebrature alla spalla o agli arti. La testa è pesante, quadrangolare con un profilo rettilineo. Il collo è corto, il dorso è dritto e leggermente disteso e la groppa è corta e lievemente inclinata. Il torace si presenta stretto e basso ed, infine, gli arti, sebbene corti, sono robusti e terminanti con un piede piccolo e duro. Da un punto di vista biometrico, gli unici parametri considerati nella selezione dei soggetti di razza Sarda sono l'altezza al garrese, la circonferenza minima del torace e la circonferenza dello stinco misurati su soggetti a 30 mesi di età.

| Parametro | Maschi (cm) | Femmine (cm) |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|
| Altezza garrese | 80-110 | 80-110 |
| Circonferenza minima torace | 137 | 137 |
| Circonferenza stinco | 15-18 | 15-18 |

In riferimento a questi dati biometrici è opportuno rilevare che la circonferenza toracica e la circonferenza dello stinco hanno subito una variazione nel corso degli ultimi anni. Più precisamente, le norme tecniche approvate nel 2009 prevedevano per l'asino Sardo una circonferenza toracica pari a 100 cm ed una circonferenza dello stinco pari a 11-13, in entrambi i sessi. Addirittura, prima del 2009, era ammessa una altezza al garrese pari a 80-115. Nel dicembre 2013, su richiesta degli esperti di razza A.I.A., sono stati approvati i nuovi standard di razza che hanno introdotto la dicitura "circonferenza **minima** del torace", innalzata a 137 cm, e hanno aumentato il valore della circonferenza dello stinco a 15-18 cm.

Queste modifiche sono state apportate in quanto la valutazione morfologica e biometrica (in altre parole fenotipica) eseguita negli ultimi anni dagli esperti di razza ha imposto la necessità di correggere i valori biometrici iniziali, rendendoli più vicini alla media della popolazione attualmente censita.

E' interessante, comunque, notare come questi incrementi tendano ad avvicinare maggiormente, da un punto di vista biometrico, la razza Sarda alle altre razze italiane, come emerge dalla tabella seguente:

| RAZZA | ALTEZZA AL GARRESE | | CIRCONFERENZA TORACE | | CIRCONFERENZA STINCO | |
|----------------|--------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|-------|
| | M | F | M | F | M | F |
| Sardo | 80-110 | 80-110 | >137 | >137 | 15-18 | 15-18 |
| Asinara | 80-105 | 80-105 | 100 | 100 | 11-13 | 11-13 |
| Amiata | 123-147 | 119-142 | 143-173 | 133-163 | 16-22 | 15-19 |
| Ragusano | 138 | 130 | 150 | 142 | 18 | 17 |
| Romagnolo | 135-155 | 130-145 | >150 | >140 | >18 | >17 |
| Viterbese | 119-137 | 112-135 | >100 | >100 | 11-13 | 11-13 |
| Pantelleria | 124-140 | 124-140 | 135-160 | 135-160 | 16-20 | 16-20 |
| Martina Franca | >135 | >127 | >145 | >140 | >19 | >17 |
| Barockesel | 105-125 | 105-125 | ? | ? | 15-18 | 15-18 |

Questi aspetti evidenziano molto bene come, ancora oggi, gli standard della razza Sarda siano ancora in fase di definizione. La maggiore difficoltà che si incontra nella selezione fenotipica dei soggetti di questa razza consiste nel fatto che si tratta di una valutazione puramente esteriore degli individui: data la presenza a livello nazionale di altre razze fenotipicamente simili a quella Sarda, e ampiamente utilizzate per il meticciamiento della stessa, la probabilità di iscrivere nel registro anagrafico individui non in purezza (solo esteriormente assimilabili alla razza Sarda) è abbastanza elevata.

Riguardo la razza Asinara, gli standard di razza prevedono il tipico mantello bianco con cute rosa (depigmentata) e occhi rosa-celesti (depigmentati). Questi aspetti peculiari della razza sono da attribuire all'Albinismo Oculo Cutaneo, simile al tipo 1A della specie umana, che è caratterizzato dalla totale assenza di pigmento melanico nella cute e negli annessi cutanei (Pinna et al., 1998 e 1999; Cappai et al., 2015; Utzeri et al., 2015). La testa degli individui di questa razza si presenta quadrangolare con un profilo variabile dal rettilineo al montonino. Il collo è corto e il dorso leggermente disteso, generalmente più allungato di quello dell'asino Sardo (Pinna et al., 1991 e 1993). La groppa si presenta corta e lievemente inclinata. Il torace si presenta stretto e basso ed, infine, gli arti sono corti e robusti, terminanti con un piede chiaro (depigmentato) piccolo e poco resistente.

Da un punto di vista biometrico, come per la razza Sarda, gli unici parametri considerati nella selezione dei soggetti sono l'altezza al garrese, la circonferenza del torace e la circonferenza dello stinco misurati su soggetti a 30 mesi di età.

| Parametro | Maschi (cm) | Femmine (cm) |
|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Altezza garrese | 80-105 | 80-105 |
| Circonferenza torace | 100 | 100 |
| Circonferenza stinco | 11-13 | 11-13 |

Da un rapido confronto tra i dati morfologici e biometrici appena descritti per le due razze, si evince come tra queste vi sia una grande similarità. Ciò in passato (ma anche oggi) ha indotto alcuni a pensare che il termine "razza" per i soggetti Asinara fosse inappropriato: sarebbe stato più opportuno parlare di "variante albina" della razza Sarda. In ogni caso, l'esistenza di due distinti registri anagrafici per le due razze asinine della Sardegna ha costituito e costituisce un valido strumento per la preservazione di entrambi i gruppi etnici, che, comunque, al di là del loro valore zootecnico, hanno un importante valore storico per tutta la Sardegna.

Conoscenze scientifiche sull'Asino Sardo e l'Asino dell'Asinara

La ricerca bibliografica ha permesso di individuare diversi articoli scientifici sulle due razze asinine sarde, riguardanti diverse aree di indagine, soprattutto di interesse medico veterinario. Tali indagini hanno contribuito, tra l'altro, alla definizione degli standard di razza e, nel caso specifico dell'Asino dell'Asinara, allo stesso riconoscimento dello status di razza.

Volendo fare un rapido excursus, si può senz'altro affermare che i principali studi sono stati condotti presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari e hanno riguardato, in particolare, gli aspetti morfometrici, ematochimici, clinico-metabolici, etologici-demografici, nutrizionali e parassitologici.

In uno studio del 1994, Pinna et al. hanno svolto un'analisi morfometrica su 15 soggetti di razza Sarda evidenziando che gli individui di questa razza possono essere considerati di tipo costituzionale mesomorfo, di piccola costituzione e con una struttura scheletrica robusta e compatta. Inoltre non esiste dimorfismo sessuale, fatta eccezione per maggiori diametri pelvici nelle femmine.

Gli stessi Autori hanno svolto indagini morfologiche e somatometriche anche su asini di razza Asinara (1991 e 1993). Le misurazioni hanno evidenziato l'assenza di dimorfismo sessuale e hanno delineato un tipo morfologico di piccola taglia, compatto e raccolto ed indici zoometrici attribuibili al tipo costituzionale mesomorfo. Pur presentando notevoli affinità con la razza Sarda (sviluppo scheletrico e compattezza), i soggetti di razza Asinara studiati mostravano una maggiore lunghezza relativa del tronco e quindi un profilo laterale corporeo più allungato.

Vacca et al. (1994), studiando i parametri ematochimici dell'asino di razza Sarda (19 asini), hanno messo in evidenza una maggiore concentrazione di alcuni parametri (GGT, GPT, LDH, ecc.) nei maschi rispetto alle femmine: ciò è stato attribuito soprattutto ai fenomeni di induzione o attivazione enzimatica a base androgenica surrenalica più spiccati nei maschi. Gli Autori hanno riscontrato inoltre che alcuni parametri, soprattutto la calcemia, si discostano molto da quelli determinati da Cubeddu et al. (1991) su asini di razza Asinara. In quest'ultimo studio sono stati esaminati i medesimi parametri ematochimici su 14 soggetti di razza Asinara riscontrando, nel complesso, una certa corrispondenza con i valori ottenuti in altre razze asinine e una uniformità di valori tra i due sessi.

Vacca et al. (1998) hanno anche studiato il profilo metabolico degli asini dell'Asinara nel primo anno di vita osservando, soprattutto, bassi livelli di proteine totali e albumine, probabilmente attribuibili ad un insufficiente apporto alimentare proteico.

Carcangiu et al. (2003), indagando sui parametri ematochimici degli asini dell'Asinara, hanno rilevato bassi valori di emoglobina e ematocrito in parte riconducibili ad una carenza di elementi minerali nel pascolo dell'isola dell'Asinara, in parte all'azione ematofaga di ecto-endo parassiti: i trattamenti antiparassitari hanno determinato un miglioramento delle condizioni generali dei soggetti esaminati e la normalizzazione di alcuni parametri ematochimici, quali globuli bianchi, emoglobina, AST, ALT e LDH.

Diversi studi condotti da Cubeddu et al. (1995, 2001 e 2010) hanno indagato sulle principali patologie che colpiscono gli asini di razza Asinara presenti nell'isola dell'Asinara, con particolare riferimento alle infestazioni parassitarie (endo e ecto parassiti) e dermatologiche. Gli stessi Autori hanno evidenziato come questa razza sia particolarmente suscettibile alle patologie cutanee e necessiti di particolari cure e attenzioni sanitarie.

Anche Pinna et al. (1995 e 1996) hanno evidenziato come i soggetti albinici dell'Asinara siano particolarmente soggetti a lesioni cutanee (soprattutto dermatiti fotosensibilizzanti), gravi infezioni cutanee post traumatiche (specie nei maschi durante il periodo riproduttivo) e ecto-endoparassitosi. Gli Autori ritengono che, per tali motivi, e considerata l'esiguità della popolazione, questa razza debba essere sottoposta ad accurati e regolari controlli sanitari e interventi di profilassi anche per evitare brusche diminuzioni della numerosità della popolazione.

Riguardo l'albinismo nella razza Asinara, uno dei primi studi è stato condotto da Colombani nel 1963: in questo studio viene descritto il caso di un asino sardo albino e vengono indicate le varie teorie del tempo che trattano dell'albinismo.

Studi successivi condotti da Pinna et al. (1998 e 1999) hanno dimostrato che l'albinismo degli asini dell'Asinara è simile all'albinismo oculo cutaneo di tipo 1A (OCA 1A) tirosinasi negativo. In particolare, in questi soggetti esiste un blocco metabolico nella sintesi della melanina dovuto alla mancata conversione della tirosina in L-DOPA (che è il precursore della melanina). Tali osservazioni sono state ulteriormente confermate dagli stessi autori in un recente studio (Cappai et al., 2015) che ha evidenziato come, nonostante il fenotipo dell'Asino dell'Asinara sia assimilabile al fenotipo albino umano di tipo OCA1A, l'attività tirosinasi è solo parzialmente negativa e non totalmente

negativa come avviene invece nell'uomo. Più precisamente, i test biochimici eseguiti sui melanociti dei bulbi piliferi di alcuni asini albinici hanno evidenziato la totale assenza di conversione della L-Tirosina in L-DOPA (ad opera dell'enzima Tirosinasi), mentre è presente in tutti i soggetti la successiva conversione enzimatica (sempre ad opera dell'enzima Tirosinasi) della L-DOPA in DOPACHINONE .

Un'analisi genetica condotta da Utzeri et al. nel 2015 ha messo in luce l'esistenza di una mutazione nel gene della Tirosinasi (gene TYR) che sembrerebbe essere responsabile della mancata attività tirosinasi e quindi dell'albinismo in questa razza. Secondo gli autori, l'analisi degli aplotipi del gene TYR nelle varie razze asinine studiate (Sardo, Asinara, Amiata, Martina Franca, Pantesco, Grigio Siciliano, Ragusano e Romagnolo) sembrerebbe supportare l'ipotesi che la mutazione dell'albinismo si verifica all'interno dell'aplotipo "grigio", che è quello degli asini di razza Sarda.

Un recente studio condotto da Cappai et al. (2013) su 19 asini ha proposto un nuovo approccio specie-specifico nella valutazione dello stato di nutrizione degli asini adulti di razza Sarda durante la visita clinica, che tiene conto di cinque parametri: peso corporeo, body condition score, indice di massa muscolare, profilo metabolico (AST, ALT, CK, LDH, ALKP, GGT, LIPASI e vari elettroliti), misure morfometriche (altezza al garrese e circonferenza toracica). Inoltre è stata messa a punto una equazione per la stima del peso corporeo partendo dall'altezza al garrese e dalla circonferenza toracica.

Gli aspetti riproduttivi sono stati principalmente investigati dall'Istituto Incremento Ippico della Sardegna, in collaborazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari. Si ricordano, ad esempio, gli studi di Cherchi et al. (2001) sull'analisi e conservazione del materiale seminale e sul monitoraggio dell'attività ovarica nella razza Sarda e Asinara. Gli stessi Autori hanno altresì condotto delle sperimentazioni sull'applicazione dell'embryo-transfer nelle etnie asinine sarde, riuscendo, per primi al mondo, ad eseguire con successo il trasferimento embrionale in razze asinine di così piccole dimensioni.

In uno studio del 1995, Pinna et al. hanno notato che la fertilità dei soggetti di razza Asinara risulta inferiore rispetto a quella osservata in asini di razza Sarda: si parla di valori medi intorno al 35%, probabilmente dovuti anche ai bassi livelli sierici di 17β estradiolo riscontrati nei soggetti esaminati.

Numerosi sono stati anche gli studi condotti per tipizzare le razze Sarda e Asinara. Tra i primi si ricordano gli studi di Mengozzi et al. (1982) e Romagnoli et al. (1982) che hanno cercato di caratterizzare la razza Sarda e Asinara mediante l'analisi dei polimorfismi di alcuni enzimi eritrocitari (quali 6-PGD, PGM, AP, PHI, CA, Cat) e proteine del siero (transferrina).

Le analisi elettroforetiche condotte da Romagnoli et al. (1982) hanno evidenziato una elevata omogeneità nei risultati della determinazione del polimorfismo ematico (sierico ed eritrocitario): ciò potrebbe essere determinato dall'elevato tasso di consanguineità tra i soggetti. Mengozzi et al. (1982) hanno invece rilevato una alta similarità tra la razza Asinara e gli asini di Gubbio, riscontrando un Indice di similarità $r=0,9988$.

Cristofalo et al. (1994), hanno analizzato il polimorfismo immunologico eritrocitario su 35 asini di razza Sarda evidenziando la presenza di polimorfismo in 8 loci su 17 analizzati. Le frequenze alleliche hanno fornito risultati simili a quelli riportati in letteratura per altre razze (Amiata, Martina Franca, Asino Siciliano).

Con lo sviluppo di nuove tecniche della biologia molecolare, si è passati dall'analisi dei polimorfismi ematici mediante elettroforesi, agli studi di genetica molecolare mediante l'impiego di marker genetici (microsatelliti e mtDNA).

Pinna et al. nel 1998 e nel 1999 hanno condotto delle analisi genetiche preliminari sulle due razze asinine della Sardegna. La sperimentazione ha messo in evidenza la possibilità di impiego nella specie *Equus asinus* di alcuni microsatelliti già in uso nella specie *Equus caballus*. Inoltre, l'analisi della sequenza del Citocromo b nel DNA mitocondriale ha rivelato la presenza di alcune sostituzioni nucleotidiche tra le due razze. Da questi studi è emersa una scarsa eterozigosità ed un alto inbreeding nei soggetti di razza Asinara, contrariamente alla razza Sarda dove, invece, è stata riscontrata una maggiore variabilità genetica dei loci esaminati.

In uno studio genetico del 2001, Cosseddu et al. hanno impiegato un set di microsatelliti, normalmente impiegati per l'analisi di parentela negli equini, al fine di caratterizzare geneticamente quattro popolazioni asinine della Sardegna: Asini Sardi, Asini Comuni (meticci Sardi) e due gruppi di Asini dell'Asinara (uno residente sull'Isola dell'Asinara e uno allevato ex situ a Foresta Burgos). L'analisi degli alleli individuati ha evidenziato una maggiore variabilità genetica negli Asini Comuni, seguiti dagli Asini Sardi, dagli Asini dell'Asinara allevati ex situ e, infine, dagli Asini dell'Asinara residenti sull'Isola dell'Asinara.

Sulla base delle frequenze alleliche sono state calcolate le distanze genetiche tra le quattro popolazioni applicando le formule della Distanza Minima di Nei (D_m) e della Distanza di Reynold ($D_{Reynold}$). Dall'analisi dei risultati si è concluso che le popolazioni dell'asino Sardo e dell'asino comune sono le più vicine geneticamente (d'altronde si deve tener conto che la popolazione degli asini comuni deriva da incroci effettuati sull'asino sardo) e appaiono entrambe distanziate dalle due popolazioni di asini bianchi, a loro volta distanziate tra loro.

Le distanze osservate tra soggetti di razza Sarda e quelli Asinara, tuttavia, potrebbero essere fortemente condizionate dall'elevata consanguineità e dalla conseguente perdita di variabilità genetica dovuta alle particolari condizioni di isolamento geografico e di esiguità numerica. Ciò fa sì che queste popolazioni si comporti come distinti nuclei familiari, rendendo più marcata la distanza genetica.

Nel 2013 Colli et al. hanno impiegato un set di microsatelliti simili a quelli impiegati da Cosseddu et al nel 2001 per valutare la diversità genetica nelle principali razze asinine italiane (Asinara, Sardo, Pantesco, Grigio Siciliano, Romagnolo, Amiata, Martina Franca e Ragusano). I valori di AR, N e H (AR allelic richness, N number of alleles e H eterozigosità) nelle razze italiane rientrano nei range delle altre razze europee, ma il grado di differenziazione genetica tra le razze è maggiore rispetto alle altre razze europee (es. spagnole e croate). Le razze sarde, asino Sardo e asino dell'Asinara, hanno tratti genetici distintivi che li separano dalle altre razze italiane. Ciò è messo in evidenza sia dall'albero filogenetico che dall'analisi Bayesiana condotta con Structure (Fig.31). Inoltre, le due razze mostrano un antenato in comune e il fatto che il valore F_{st} sia 0.041 indica una stretta similarità genetica tra esse, confermando le similarità fenotipiche.

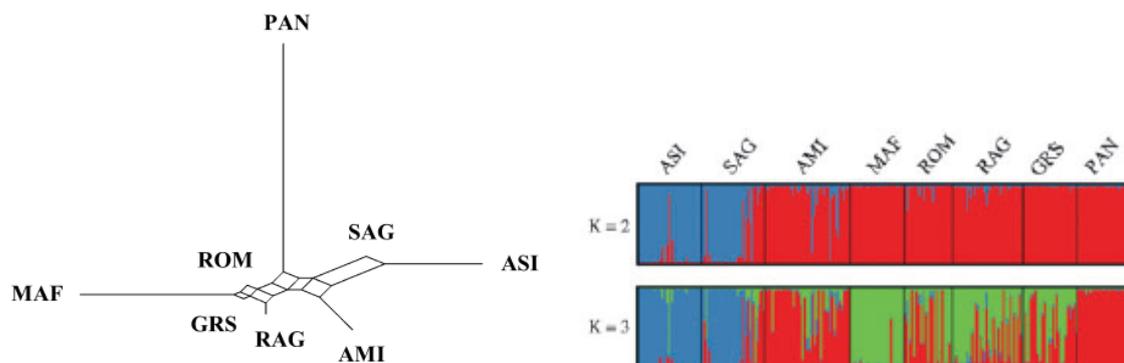


Fig. 31. Neighbour-net (Reynold) e analisi Bayesiana con Structure (K=2, K,3). (fonte Colli et. al., 2013).

E' importante sottolineare che gli asini di razza Sarda e Asinara studiati in questa indagine non provengono da allevamenti della Sardegna. Per questo motivo, gli stessi autori hanno ritenuto opportuno confrontare i risultati di questo studio con quelli ottenuti da Cosseddu et al. nel 2001. Tale confronto ha evidenziato che gli asini Sardi e Asinara presenti fuori dalla Sardegna hanno un maggior numero di alleli per locus e di siti polimorfici rispetto a quelli presenti in Sardegna, mentre questi ultimi hanno un valore H₀ più alto per diversi loci. Probabilmente il polimorfismo maggiore osservato negli asini Sardi e Asinara della penisola è dovuto al fatto che il campione esaminato in questo studio è doppio rispetto a quello dell'indagine condotta da Cosseddu et al., ma soprattutto perché gli asini esaminati da Colli et al. possono avere subito un apporto genetico da altre razze italiane allevate nella penisola. Riguardo infine le differenze di eterozigotità riscontrate nel confronto tra i due studi, esse potrebbero essere dovute al fatto che la popolazione asinina Sarda e Asinara della penisola è molto piccola.

Oltre agli studi genetici mediante l'impiego di microsatelliti, le razze sarde sono state incluse anche in diverse ricerche sulle caratteristiche del DNA mitocondriale. In uno studio del 2007, Pellecchia et al. hanno sequenziato due regioni del DNA mitocondriale di cinque razze italiane (Amiata, Martina Franca, Romagnolo, Asinara, Ragusano): la regione HVRI (o HVSI) del D-Loop e il gene dell'enzima Citocromo b. L'analisi filogenetica ha dimostrato la presenza di due linee materne (aplogruppi) nelle razze italiane che corrispondono alle due linee ancestrali (Cladi) *Equus asinus somaliensis* e *Equus asinus africanus*. Queste due linee ancestrali sono entrambe rappresentate nelle razze Martina Franca, Romagnolo, Ragusano e Asinara, mentre nella razza Amiata è presente solo la linea dell'*Equus asinus somaliensis*.

Nel 2008 Cozzi et al. hanno condotto uno studio analogo sulle razze Romagnolo, Ragusano, Asinara e Sardo, individuando ben 10 aplotipi (H1-H10) che differiscono tra loro per poche mutazioni. Tali aplotipi sono raggruppabili in due aplogruppi (A e B) che condividono la stessa origine comune e che sono geneticamente affini all'asino selvatico africano.

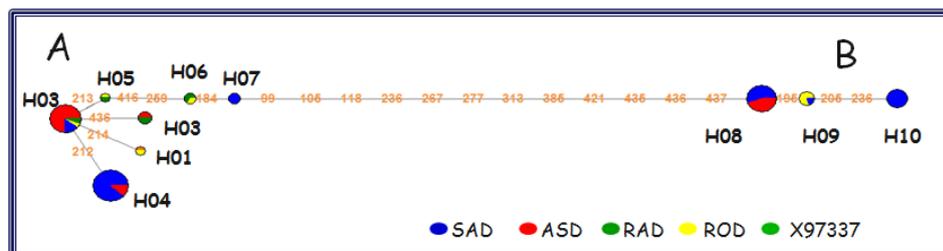


Fig. 32. Gli aplogruppi A e B racchiudono gli aplotipi da H1 a H10 (H7 e H10 sono tipici dell'asino Sardo). SAD, Sardo; ASD, Asinara; RAD, Ragusano; ROD, Romagnolo; X97337, *Equus asinus* sequenza di riferimento. (fonte Cozzi et al., 2008).

Gli F-ISSR e il DNA mitocondriale

L'uso di un marcatore molecolare (locus del genoma tipicamente rilevabile con un primer) è un ottimo sistema per indagare sulla variabilità genetica degli organismi e delle popolazioni. I marcatori molecolari sono in grado di analizzare la variabilità genetica da ogni materiale biologico contenente DNA, e sono in grado di fornire importanti informazioni sulla struttura genetica di specie e popolazioni in via di estinzione o in uno stato di conservazione vulnerabile.

Le più recenti tra queste tecniche di analisi del DNA prevedono l'uso di NGS (Next Generation Sequencing) che consente di eseguire un sequenziamento parallelo e massivo di molecole di DNA. Questo sistema consente quindi di sequenziare fino a diverse Gb (miliardi di paia di basi) di DNA in un'unica seduta analitica (Metzker, 2010). Le analisi di routine, tuttavia, sono ancora basate sulla classica PCR (Polimerase Chain Reaction), che ha permesso negli ultimi decenni di indagare sulla variabilità genetica di tutte le specie animali e vegetali, in maniera più sicura ed affidabile rispetto al passato, con il relativo affinamento delle tecniche di sequenziamento o genotyping, e con costi relativamente contenuti. Il DNA analizzato può essere nucleare o mitocondriale.

Il DNA nucleare, essendo non codificante per il 90%, ma ricombinante, consente di rilevare la variabilità data da mutazioni silenziose, cioè che non causano una sostituzione amminoacidica. Tra i metodi più usati vi sono le tecniche di fingerprinting, che forniscono "un'impronta digitale" degli individui, utile per le analisi sulle dinamiche di popolazione, ma negli ultimi anni ampiamente utilizzate nella genetica forense, soprattutto ai fini dell'accertamento di paternità, dell'identificazione personale (eventualmente anche di cadavere) e nell'ambito di indagini dirette ad individuare i colpevoli di reati.

I microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeat) sono la scelta di elezione per misurare il grado e la distribuzione della variabilità genetica del DNA nucleare. I microsatelliti sono brevi sequenze (1-5 paia di basi) ripetute in tandem in un numero variabile di volte (Tautz & Renz, 1984). Nella classificazione dei marcatori molecolari vengono inclusi tra i polimorfismi di lunghezza, e sono particolarmente rilevanti in quanto spesso la variabilità si ritrova nel numero di nucleotidi di un gene. Si trovano in tutti gli eucarioti e sono distribuiti in modo uniforme e casuale. Nell'intero genoma è presente un locus SSR ogni 50-750 kb. Gli alleli a un dato locus vengono identificati effettuando un'amplificazione specifica con primer (lunghi solitamente 15/21 bp)

sintetizzati in base alle sequenze fiancheggianti. I microsatelliti sono in grado di evidenziare elevati livelli di polimorfismo e sono altamente informativi, in quanto marcatori codominanti, cioè in grado di discriminare gli individui omozigoti da quelli eterozigoti ad un determinato locus.

Gli ISSR sono marcatori molecolari nucleari dominanti. Sono una classe scoperta di recente, e sono chiamati anche RAMS (Random Amplified Microsatellites) (Zietckiewicz et al., 1994). Rappresentano le porzioni che si trovano tra due microsatelliti uguali e inversamente orientati. Indicano la presenza o l'assenza di una porzione di DNA tra due microsatelliti con estremità note.

Più precisamente, la tecnica degli ISSR consiste nell'amplificazione di regioni genomiche comprese tra sequenze di DNA microsatellite ripetute e invertite, mediante l'uso di un singolo primer costituito da una breve sequenza microsatellite (tipicamente 18-20 paia di basi) con "un'ancora", cioè 1-4 nucleotidi che interrompono la sequenza microsatellite all'estremità 5' o a quella 3' (Zietckiewicz et al., 1994).

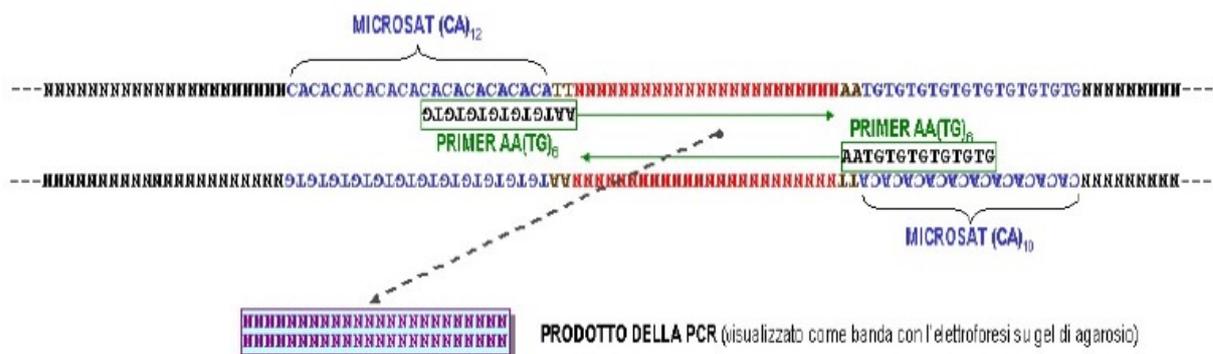


Fig. 33. Schematizzazione della PCR di una regione ISSR (in rosso). Il primer [AA(TG)₆ in verde], che funziona sia da forward che da reverse, si lega alle regioni estreme dei due microsatelliti vicini (azzurro) grazie all'ancora (in questo caso AA) e consente la amplificazione della regione tra i due microsatelliti vicini. (fonte Lai et al., 2005).

Lo studio degli ISSR mostra diversi vantaggi, primo su tutti la possibilità di usare dei primer arbitrari (non è necessario conoscere a priori la sequenza nucleotidica) e hanno un alto grado di polimorfismo. Consentono di eseguire un campionamento casuale dell'intero genoma (un locus SSR ogni 50-750 kb). Inoltre sono caratterizzati da una certa rapidità di esecuzione, facilità d'uso e semplicità d'interpretazione. Hanno costi relativamente bassi, una buona riproducibilità dei risultati e sono in grado di rilevare un'elevata diversità genetica.

L'unico svantaggio mostrato, se confrontati con gli SSR, è la dominanza (mostrano un'eredità di tipo dominante), cioè in seguito alla corsa elettroforetica su gel apparirà o meno, una

banda della quale non è valutabile la sua condizione di omozigosi o eterozigosi. Poiché per la tipizzazione dell'individuo è fondamentale la condizione di presenza/assenza della banda, ne consegue una capacità d'inferenza minore sul genoma. Tale problema tuttavia può essere superato attraverso l'applicazione di analisi statistiche di tipo bayesiano (Holsinger et al., 2002), permettendo comunque una precisa valutazione delle dinamiche di popolazione.

Nagaraju ed i suoi collaboratori (2002) hanno testato la tecnica con un vasto numero di piante (tra cui un ampio numero di varietà di riso) e con alcuni insetti, il più importante, a livello commerciale, il *Bombyx mori*. I risultati da loro ottenuti hanno mostrato chiaramente l'utilità del metodo, soprattutto per quelle specie le cui informazioni genomiche potessero essere scarse o addirittura assenti.

Il DNA mitocondriale (contenuto nei mitocondri) è trasmesso ai discendenti solo per via materna, in quanto i mitocondri di ogni individuo derivano esclusivamente da quelli dell'ovocita. Inoltre, il DNA mitocondriale non è soggetto a fenomeni di ricombinazione, pertanto viene trasmesso in maniera pressoché inalterata tra le varie generazioni.

Esso possiede un alto tasso di mutazioni, e poiché quasi completamente codificante ma non ricombinante, è altamente variabile e molto utilizzato per studiare la migrazione e per stabilire le relazioni tassonomiche tra specie (Frankham et al., 2002). È usato anche per rintracciare linee di discendenza completamente femminili, perché il mitocondrio si eredita per via materna, mentre quello paterno presente nello spermatozoo non supera la membrana della cellula uovo. Queste caratteristiche (eredità materna e assenza di ricombinazione) fanno sì che il DNA mitocondriale sia un utile marcatore da impiegare soprattutto negli studi filogenetici.

Più precisamente, analizzando un frammento della regione ipervariabile (HVSI) del d-Loop in differenti individui, è possibile individuare differenti aplotipi, ossia differenti tipi di mtDNA che condividono un insieme di varianti acquisite per discesa da un comune antenato femminile. La variabilità esistente tra i vari aplotipi consente di elaborare dei veri e propri alberi filogenetici che mettono in evidenza i rapporti esistenti tra le popolazioni analizzate.

Nella nostra indagine abbiamo utilizzato come marcatori genetici tre marcatori F-ISSR e un frammento della prima regione ipervariabile (HVSI) del d-Loop del DNA mitocondriale.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nella presente indagine sono stati campionati complessivamente 188 asini appartenenti a 9 razze : Asino Sardo (n.97, di cui 15 da Foresta Burgos, 44 dall'isola dell'Asinara, 4 da Cardedu, 8 da Senorbì, 8 da Iglesias, 4 da Ittireddu, 4 da Serramanna, 10 da Ortueri), Asino dell'Asinara (n.46, di cui 5 da Perugia, 21 dall'isola dell'Asinara, 20 da Foresta Burgos), Asino Martina Franca (n.5), Asino Ragusano (n.6), Asino Romagnolo (n.4), Asino dell'Amiata (n.4), Asino Viterbese (n.6), Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel (n.16), Asino domestico Etiope (n.4).

I campioni biologici prelevati dagli asini della Sardegna e dell'isola dell'Asinara sono costituiti da sangue intero in EDTA, mentre tutti gli altri campioni consistono in crini con bulbo pilifero.

Per alcune razze, il numero iniziale di campioni raccolti era superiore a quelli effettivamente analizzati, ma, per una scarsa qualità degli stessi, si è proceduto alla sola estrazione di quelli meno deteriorati.

Per quanto riguarda le razze Sarda e Asinara, il criterio di campionamento ha tenuto conto, anzitutto, dei tradizionali siti storici di allevamento dell'asino nell'isola (soprattutto il basso Campidano e la Trexenta), delle zone più incontaminate (Ogliastra) e dei principali centri di preservazione delle razze (Logudoro-Goceano sotto la tutela dell'Agenzia AGRIS Sardegna; Parco dell'Asino Sardo di Ortueri; Parco Nazionale dell'Asinara).

In particolare, i soggetti di razza Sarda, sono stati campionati in 8 siti distribuiti sul territorio regionale: Isola dell'Asinara, Foresta Burgos, Ittireddu, Ortueri, Cardedu, Serramanna, Senorbì, Iglesias. I soggetti di razza Asinara, invece, sono stati campionati nell'Isola dell'Asinara e a Foresta Burgos, e in un parco sito a Perugia, denominato "Città della Domenica".

Le altre razze non sarde sono state campionate in allevamenti selezionati della penisola; i soggetti africani sono stati prelevati in Etiopia, e gli asini austriaci sono stati prelevati presso il parco del Castello di Hof (Schloßhof) in Austria.



Fig.34. La figura mostra i siti di campionamento nelle diverse aree geografiche di origine dei soggetti analizzati, segnalato dalla presenza di una figura stilizzata di asino su ciascuna mappa.

Tutti gli animali campionati in Italia sono iscritti nei relativi Registri anagrafici, fatta eccezione dei soggetti residenti sull'Isola dell'Asinara che, vivendo allo stato selvatico, non sono registrati nell'Anagrafe Equidi Nazionale. I campioni di razza Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel (Barockesel) risultano iscritti ad uno specifico registro anagrafico detenuto dalla associazione di razza in Austria, mentre i soggetti africani non risultano essere inseriti in alcun registro.

Estrazione del DNA

Dopo il prelievo, i campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA, secondo due differenti metodiche in base alla natura del campione.

Per i campioni ematici è stata impiegata una tecnica di estrazione del DNA detta Salting out (Miller et al., 1988 modificata). Dopo l'iniziale lisi delle cellule ematiche (600 µl di sangue in EDTA) mediante una soluzione di lisi contenente Triton (Triton Blood Buffer) e un successivo lavaggio con Tris-HCl, il campione è stato sottoposto all'azione di un buffer di estrazione assieme alla Proteinasi K in un bagnetto termostato (37°) per 60 minuti. Successivamente si è ottenuta la precipitazione delle proteine mediante l'impiego di una soluzione di NaCl 5M. Infine, attraverso un passaggio in Isopropanolo e due passaggi in Etanolo è stato ricavato il pellet di DNA disidratato.

I crini con bulbo sono stati sottoposti ad estrazione del DNA impiegando un kit commerciale (Sigma-Aldrich).

Per visualizzare il DNA genomico, è stata eseguita una corsa elettroforetica degli estratti su un gel di Agarosio allo 0,8%, preparato in 30 ml di buffer elettroforetico TBE (pH 8). In questa fase, sono stati scartati i campioni di razza Ragusana e Africana per la scarsa qualità dell'estratto.

Amplificazione del DNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

PCR F-ISSR

Per esigenze di laboratorio, l'amplificazione dei frammenti F-ISSR è stata eseguita su 130 campioni dei 188 iniziali.

| Sito campionamento (macroarea geografica) | Tot. campioni | Razze | N. campioni |
|--|----------------------|---------------|--------------------|
| Sardegna (inclusa l'isola dell'Asinara) | 88 | Asinara | 25 |
| | | Sardo | 63 |
| Italia | 26 | Amiata | 6 |
| | | Asinara | 5 |
| | | Martinafranca | 5 |
| | | Romagnolo | 4 |
| | | Viterbese | 6 |
| Austria | 16 | Barockesel | 16 |

Nella reazione di amplificazione sono stati utilizzati solo tre primer marcati con fluorocromi, a differenza di quanto eseguito da Nagaraju et al. (2002) che hanno utilizzato, invece, un set di otto primer degenerate non marcati e un nucleotide marcato con fluorocromo (dUTP TAMARA).

I tre marcatori impiegati per genotipizzare i campioni sono denominati UBC864, UBC868 e (GAG)₃GC (Nagaraju et al., 2006). Le loro sequenze sono riportate nella tabella seguente:

| Primer | Sequenze (5'-3') | N. bande | Dimensione bande (bp range) |
|-----------------------|-------------------------|-----------------|--|
| UBC864 | ATGATGATGATGATGATG | 15 | 400-1060 |
| UBC868 | GAAGAAGAAGAAGAAGAA | 14 | 330-1050 |
| (GAG) ₃ GC | GAGGAGGAGGC | 20 | 275-1065 |

I tre primer utilizzati [UBC864, UBC868 e (GAG)₃GC] sono marcati rispettivamente con i fluorocromi 6-FAM, HEX e NED (Sigma-Aldrich).

Di seguito viene indicato il protocollo di preparazione della mix per la PCR e i parametri impostati nel Termociclatore :

| REAGENTI | MIX [Ci Stock] | MIX Volume UNITARIO (µl) | [Cf Mix] |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|-------------------|
| H ₂ O | Milliq sterile | 8,75 | |
| BUFFER | [10x] | 1,5 µl | [1x] |
| dNTPs Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) | [10 mM] | 1,2 µl | [0,2 mM ciascuno] |
| PRIMER | [10 µM] | 1,25 µl | [0,5 µM] |
| MgCl ₂ | [50 mM] | 1,05 µl | [3,5 mM] |
| Taq polimerasi (Sigma-Aldrich) | [5 U/µl] | 0,25 µl | [0.05 U/µl] |
| DNA genomico | [10-20 ng/µl] | 1 µl | [Ci Stock] |
| VOLUME FINALE | | 15 µl* | |

*I 15µl di mix contengono circa 100ng di DNA genomico, 3.5mM di MgCl₂, 0.5µM di primer, 0.2 mM di ogni dNTP, e 0.05U/µl di Taq polimerasi (Sigma-Aldrich).

| | |
|-------------------|-----------------------------|
| 35 cicli | 94 °C per 1' Denaturazione |
| | *45°/**51 °C 2' Appaiamento |
| | 72 °C per 1' Estensione |
| Estensione finale | 72°C per 7' |
| 4°C | |

* UBC864 e UBC868 = 45°C

** (GAG)₃GC = 51°C

PCR DNA mitocondriale (regione HVSI)

Relativamente all'analisi genetica del frammento HVSI, sono stati sottoposti a PCR 120 campioni selezionati tra i 188 iniziali.

| Sito campionamento (macroarea geografica) | Tot. campioni | Razze | N. campioni |
|--|---------------|---------------|-------------|
| Isola dell'Asinara | 65 | Asinara | 21 |
| | | Sardo | 44 |
| Sardegna | 34 | Asinara | 4 |
| | | Sardo | 31 |
| Italia | 13 | Amiata | 4 |
| | | Martinafranca | 2 |
| | | Romagnolo | 4 |
| | | Viterbese | 3 |
| Austria | 7 | Barockesel | 7 |

I primer sono stati disegnati sulla base della sequenza della regione ipervariabile del D-loop, compresa tra tRNAPro e l'ampio blocco centrale di sequenza conservata (Xu et al., 1996 - GenBank X97337.1).

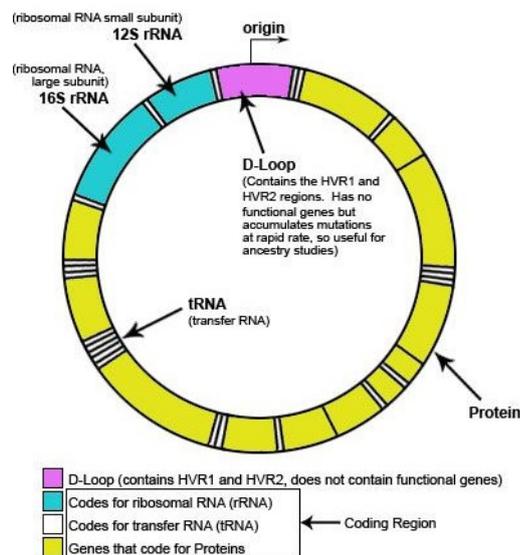


Fig. 35. Struttura del DNA mitocondriale.

I primer Donk-F (15387A-F) e Donk-R (15769A-R) ottenuti hanno le seguenti sequenze (Aranguren –Mendez et al., 2004):

| Primer | Sequenza (5'-3') | Dimensione bande (bp range) |
|--------|----------------------|-----------------------------|
| Donk-F | CCCAAGGACTATCAAGGAAG | 383 |
| Donk-R | TTGGAGGGATTGCTGATTTC | |

Di seguito viene indicato il protocollo di preparazione della mix per la PCR e i parametri impostati nel Termociclatore :

| REAGENTI | MIX [Ci Stock] | MIX Volume UNITARIO (µl) | [Cf Mix] |
|------------------------------------|----------------|--------------------------|-------------------|
| H ₂ O | Milliq sterile | 16,95 µl | |
| BUFFER | [10x] | 2,5 µl | [1x] |
| dNTPs Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) | [10 mM] | 1 µl | [0,1 mM ciascuno] |
| PRIMER 15387A-F | [10 µM] | 1 µl | [0,4 µM] |
| PRIMER 15769A-R | [10 µM] | 1 µl | [0,4 µM] |
| MgCl ₂ | [50 mM] | 1,25 µl | [2,5 mM] |
| Taq polimerasi (Sigma-Aldrich) | [5 U/µl] | 0,3 µl | [1,5U/ µl] |
| DNA genomico | [10-20 ng/µl] | 1 µl | [Ci Stock] |
| VOLUME FINALE | | 25 µl | |

| | |
|-------------------|----------------------------|
| Attivazione | 95°C per 2' |
| 35 cicli | 94 °C per 1' Denaturazione |
| | 60 °C per 1' Appaiamento |
| | 72 °C per 1' Estensione |
| Estensione finale | 72°C per 7' |
| 4°C | |

I prodotti delle due amplificazioni (F-ISSR e mtDNA) sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di Agarosio al 2% (previa colorazione col Bromuro di Etidio) per mezzo del transilluminatore a lampada UV.

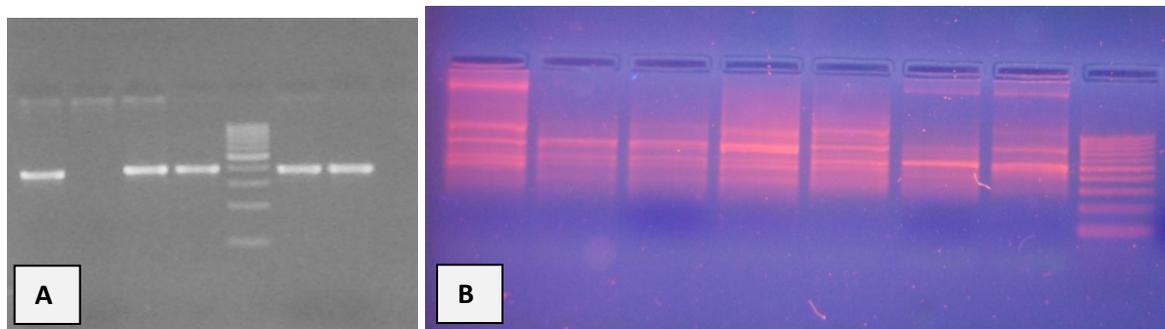


Figura 36 A e B. La figura mostra una fotografia della visualizzazione al transilluminatore dei prodotti di amplificazione dei frammenti di DNA analizzati, dopo la corsa elettroforetica; xA) frammento amplificato della HVSI del DNA mitocondriale (383bp) in alcuni campioni;xB) frammenti amplificati F-ISSR.

Genotipizzazione dei frammenti F-ISSR e sequenziamento del frammento di HVSI del DNA mitocondriale

La genotipizzazione dei frammenti F-ISSR amplificati è stata eseguita presso i laboratori BMR Genomics (Padova) impiegando un sequenziatore automatico ABI377. Il marcatore utilizzato è il ROX 1000 bv (MapMarker®) che contiene 23 frammenti di dimensione tra 50 e 1000 paia di basi (base pairs – bp). I frammenti sono 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 base pairs.

Il sequenziamento degli amplificati della prima regione ipervariabile (HVSI) è stato eseguito presso i laboratori MACROGEN EUROPE (Olanda).

Analisi dei frammenti F-ISSR e delle sequenze di DNA mitocondriale

Analisi dei frammenti F-ISSR

Gli elettroferogrammi ottenuti dalla genotipizzazione con i primer F-ISSR [UBC864, UBC868, (GAG)₃GC] sono stati analizzati mediante il software Peak Scanner™ (Applied Biosystems).

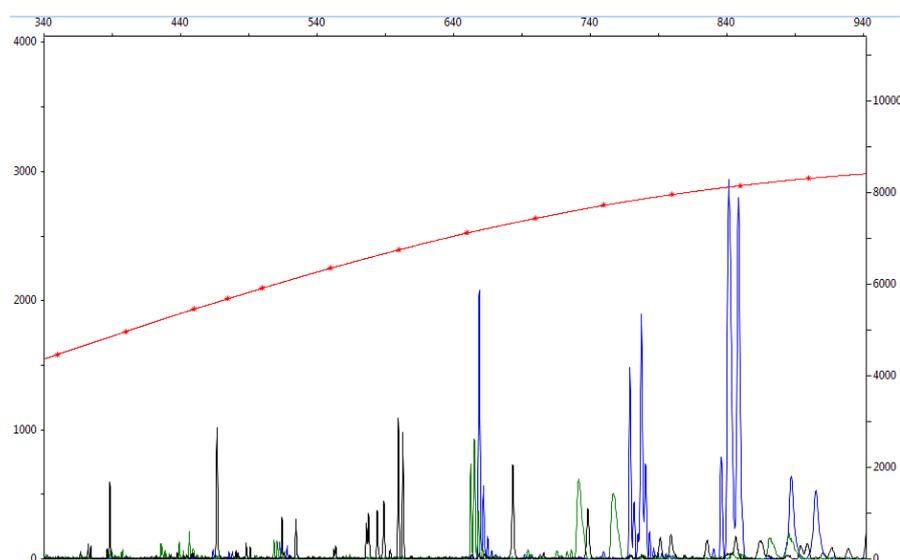


Fig. 37. Immagine di un elettroferogramma relativo ai frammenti F-ISSR

Per ciascun campione è stata eseguita la lettura del relativo elettroferogramma, rilevando la presenza o l'assenza (riportate rispettivamente come uno 1 o 0 in una matrice binaria) dei relativi picchi di differente peso molecolare (in bp), dal più pesante al più leggero, da destra verso sinistra.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R |
|----|--------------|---------|----------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | ID CAMPIONE | RAZZA | LOCALITA' | 1050 | 1000 | 966 | 900 | 837 | 770 | 730 | 700 | 660 | 620 | 580 | 560 | 540 | 464 | 400 |
| 2 | dataset1-B02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | dataset1-C03 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | dataset1-D02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | dataset1-E01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 6 | dataset1-E02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7 | dataset1-F01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | dataset1-F02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 9 | dataset1-F03 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | dataset1-G01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 11 | dataset1-G02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 12 | dataset1-G03 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 13 | dataset1-H01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 14 | dataset1-H02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 15 | dataset1-H03 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 16 | dataset1-A02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 17 | dataset1-B01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | dataset1-B03 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | dataset1-C02 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 20 | dataset1-D01 | ASINARA | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 21 | dataset1-A04 | SARDO | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 22 | dataset1-A05 | SARDO | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 23 | dataset1-B04 | SARDO | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | dataset1-C04 | SARDO | FORESTA BURGOS | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 25 | dataset1-C05 | SARDO | FORESTA BURGOS | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Fig. 38. Esempio di matrice binaria dei frammenti F-ISSR

Gli FISSR sono interpretati come marcatori diallelici dominanti, e questo spiega l'uso di una matrice di presenza/assenza, dove l'allele dominante (genotipo AA o Aa) mostra come fenotipo la presenza della banda, indicata nella matrice dal numero 1. Nel caso di omozigosi recessiva (genotipo aa) il fenotipo non manifesta alcuna banda, e viene indicato nella matrice con il numero 0. Ogni banda o picco elettroforetico, rappresenta un singolo locus, e la sua assenza è interpretata come un mancato appaiamento del primer in seguito ad una modificazione della sequenza nel sito complementare. Poiché ogni banda rappresenta un locus diallelico, secondo la legge di Hardy-Weinberg la presenza o l'assenza della banda, cioè il fenotipo (da cui si stima il genotipo), può essere convertito nella frequenza allelica assumendo che le popolazioni siano all'equilibrio (Frankham et al., 2002 & 2006), in modo da poter stimare la variabilità genetica tra ed entro le popolazioni. L'analisi spaziale della distribuzione della variabilità genetica è stata effettuata attraverso l'analisi delle coordinate principali, PCoA (Principal Coordinates Analysis). Il programma GenAEx (Genetic Analysis In Excel - Peakall & Smouse, 2006) è stato utilizzato per costruire plot bidimensionali, in cui sono espresse le percentuali di differenziamento sui diversi assi. Tale metodo consente di verificare il grado di sovrapposizione degli individui e di apprezzare l'eventuale esistenza di una strutturazione genetica delle popolazioni. La presenza di strutturazione è stata successivamente indagata attraverso ulteriori analisi eseguite con STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). STRUCTURE ha la funzione di determinare la struttura genetica più probabile (anch'esso mediante metodo bayesiano), e valuta i valori di K (valore massimo di possibili gruppi genetici), identificando gruppi di individui geneticamente correlati da genotipi multilocus, ignorando la loro origine. In base ai diversi livelli gerarchici della struttura genetica (Coulon et al., 2008) è stato applicato il metodo descritto da Vaha et al. (2007). Tale metodo consiste nell'individuare il più piccolo K che include la struttura principale, ripartire i dati secondo la migliore soluzione di clustering, eseguire analisi indipendenti su ogni sottoinsieme di dati e infine ripetere queste procedure fino a quando non è più possibile ottenere una diversa partizione dei dati. Nel nostro caso è stata eseguita un'analisi indipendente sui sottoinsiemi. Al fine di rilevare l'attuale struttura appartenente ad un livello gerarchico superiore è stato utilizzato il metodo descritto in Evanno et al. (2005), cioè valutando le probabilità a posteriori per determinati K impostati a priori. Per ogni K impostato ($n^{\circ} \text{Max Pop} + 3$ per ciascun insieme analizzato) sono state fatte 5 corse. Al fine di individuare il K più piccolo che descriva la struttura più probabile, è stata applicata la statistica ΔK , che prevede la normalizzazione del dato dividendo il valore della variazione di 2° ordine tra le

medie per la deviazione standard. Il K più rappresentativo è quello da cui si è ottenuto il ΔK con il valore più alto. L'elaborazione grafica è stata realizzata con Excel.

Analisi del DNA mitocondriale (regione HVSI)

L'attribuzione della sequenza nucleotidica del frammento analizzato della HVSI del DNA mitocondriale, per ciascun campione, è stata eseguita mediante lettura degli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento: ciò ha consentito di attribuire la sequenza nucleotidica ad un frammento di 334 bp (dalla posizione nucleotidica 15436 alla 15769). Gli elettroferogrammi sono stati verificati con il Software Bioedit 7.0.5.2 © (Hall, 1999) e le sequenze sono state esportate in fasta (*.fas) un formato versatile ed utile per le successive analisi di sequenza.

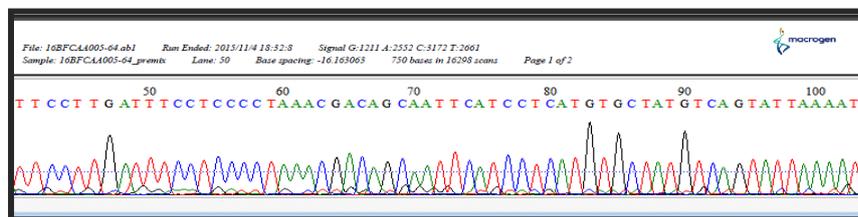


Fig. 39. Esempio di visualizzazione di elettroferogramma delle sequenze analizzate.

Successivamente, impiegando il software Mega6 (Tamura et al., 2013) si è proceduto all'allineamento delle sequenze ottenute (applicazione Clustal W), confrontandole con una sequenza di riferimento di *Equus asinus* (GenBank X97337.1), per poter così assegnare la corretta posizione nucleotidica dei siti polimorfici e lo stato allelico. Nel multi-allineamento, inoltre, è stata inserita anche una sequenza di *Equus caballus* (GenBank X79547.1) utile come outgroup.

Alle sequenze dei nostri campioni sono state aggiunte, inoltre, alcune sequenze corrispondenti di *Equus asinus* di altre aree geografiche mondiali disponibili in GenBank (Yang et al., 2006; Perez-Pardal et al., 2013; Chen et al., 2006; Beja-Pereira et al., 2004), *Equus asinus africanus* (nubiano) e *Equus asinus somalicus* (somalo) (GenBank HM622626-HM622669 - Kimura et al., 2011), al fine di confrontare la variabilità mitocondriale osservata nelle popolazioni in studio, in un contesto geografico e filogenetico più ampio. Grazie alle specifiche funzioni del software Mega6 è stato possibile, infine, individuare i siti polimorfici, in termini di differenze dalla sequenza di riferimento, e definire gli aplotipi dei vari campioni.

Sulla base delle sequenze ottenute, la variabilità del mtDNA è stata analizzata a livello intra- ed inter-popolazionistico. Impiegando il software Arlequin (ver 3.5.1.2) sono stati calcolati gli indici di diversità standard ed è stata effettuata l'analisi di condivisione degli aplotipi (haplotype sharing analysis) nelle popolazioni analizzate. Infine, mediante Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA, Excoffier et al., 1992) è stata analizzata la struttura genetica delle popolazioni oggetto dello studio.

L'approccio utilizzato dal software Arlequin è simile a quello per l'analisi della varianza delle frequenze geniche, ma considera il numero delle mutazioni tra aplotipi molecolari (Schneider et al., 1999). Una particolare struttura genetica viene definita attraverso la distinzione di gruppi di popolazioni; il metodo di analisi permette inoltre, facendo ricorso a un test di randomizzazione, di testare la significatività della strutturazione a livello gerarchico (ad esempio tra individui, popolazioni o gruppi di popolazioni). Mediante un'analisi gerarchica la varianza totale viene divisa nelle componenti dovute alle differenze intra-individuali, inter-individuali e/o interpopolazionistiche. Una particolare struttura genetica viene definita attraverso la distinzione di gruppi di popolazioni; il metodo di analisi permette di saggiare la validità della struttura scelta (Weir e Cockerham, 1984.; Excoffier et al.,1992; Weir, 1996). La varianza totale viene espressa tramite il convenzionale F_{st} (Φ_{st}). Attraverso un test di permutazioni casuali, viene testata la significatività (p) della diversità genetica ai diversi livelli: se $p > 0,05$ il dato non è significativo, se $p < 0,05$ il dato è significativo.

L'analisi di condivisione degli aplotipi (haplotype sharing analysis) ha consentito di confrontare i diversi campioni analizzati raggruppandoli in base alla eventuale condivisione degli aplotipi rappresentati nella popolazione in esame.

Il software Arlequin ha consentito di calcolare anche gli Indici di Diversità Standard, ossia gli indici che esprimono la diversità genetica tra le popolazioni analizzate.

L'indice di Diversità Aplotipica o di Diversità Genetica (Haplotype diversity o Genetic diversity, h) indica la probabilità che due aplotipi presi a caso nel campione siano differenti tra loro ed è equivalente all'eterozigosità per i dati diploidi. Viene stimato secondo la formula di Nei (Nei,1987). L'indice di Diversità Nucleotidica (Nucleotide diversity, π) esprime la probabilità che due siti omologhi scelti a caso (nucleotidi o RFLP) siano diversi tra loro. E' l'equivalente della diversità genetica a livello nucleotidico (Tajima, 1983; Nei, 1987). L'indice Numero Medio di Differenze a

Coppie (Mean Number Pairwise Differences, MNPD) descrive il numero di loci per cui due aplotipi sono diversi.

La fase conclusiva dell'indagine ha previsto, infine, l'analisi degli aplotipi individuati attraverso l'ausilio del software Network (Bandelt 1995), per l'individuazione delle relazioni filogenetiche tra le linee mitocondriali delle razze analizzate e la creazione di un albero del tipo Median Joining Network .

RISULTATI

In questa sezione vengono riportati i risultati ottenuti nella sperimentazione, argomentando separatamente quelli relativi agli F-ISSR e quelli ottenuti dall'analisi della prima porzione ipervariabile (HVSI) del DNA mitocondriale.

Analisi dei frammenti F-ISSR

L'elaborazione della PCoA relativa ai campioni analizzati (Fig. 40), evidenzia una strutturazione genetica che raggruppa insieme le due razze asinine della Sardegna distinguendole dalle altre razze (italiane e austriaca): si vengono così a definire due raggruppamenti (cluster), che definiremo di seguito Cluster razze Sardegna e Cluster razze Continentali.

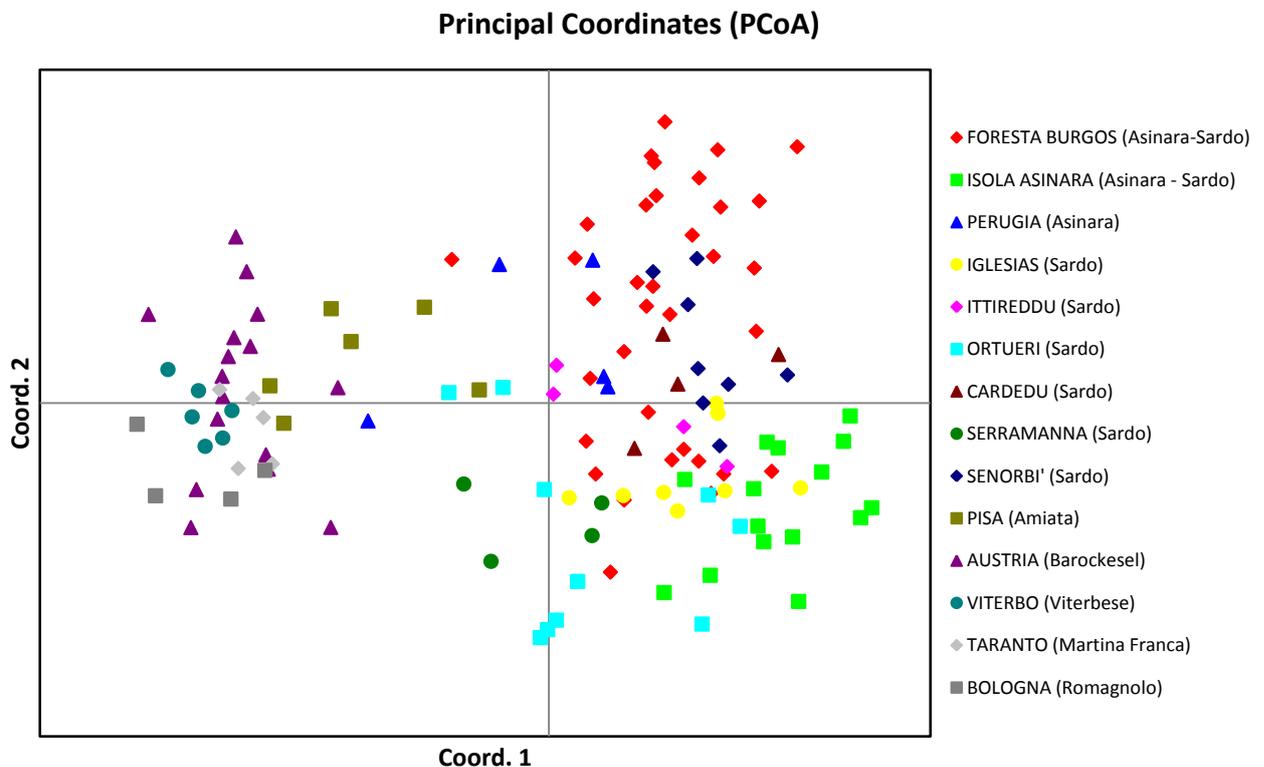


Fig. 40. Analisi PCoA sulla strutturazione genetica delle razze analizzate.

L'asse 1 del grafico (Coord.1) spiega una porzione della variabilità del 31.10% e l'asse 2 (Coord.2) ne spiega il 21.50%.

Di seguito viene riportata la tabella con la percentuale di variabilità spiegata dai primi tre assi: la variabilità totale pari a 66,24%.

| ASSE | 1 | 2 | 3 |
|----------------------------|-------|-------|--------------|
| % DI VARIABILITA' SPIEGATA | 31,10 | 21,50 | 13,64 |
| SOMMA% | 31,10 | 52,60 | 66,24 |

L'analisi evidenzia anche che alcuni soggetti di razza Sarda, appartenenti alle popolazioni di Ortueri (3 individui), Serramanna (2 individui) e Foresta Burgos (1 individuo), si collocano in una zona del grafico intermedia rispetto ai due cluster principali, tendendo a distaccarsi dal Cluster razze Sardegna e ad avvicinarsi al Cluster razze Continentali. Ciò, evidentemente, può essere spiegato ammettendo che questi individui abbiano un pattern genetico più simile ai soggetti continentali, in virtù di possibili meticciami avvenuti con alcune razze di questo cluster. Questo aspetto è anche supportato dalle notizie storiche, riferite dai tecnici esperti di razza, che descrivono la diffusa pratica di incrocio dell'asino di razza Sarda con altre razze italiane (prime tra tutte Amiata e Martina Franca), al fine di incrementare la forza e la mole dei soggetti adibiti ai lavori agricoli ed al trasporto.

E' interessante notare, inoltre, la distribuzione grafica degli asini di razza Asinara allevati ex situ nel parco "Città delle Domenica" di Perugia. La maggior parte degli individui da noi campionati si collocano all'interno del Cluster razze Sarde, sovrapponendosi alla popolazione di Foresta Burgos. Anche in questo caso, le notizie storiche, riferite dal personale operante nel centro di Foresta Burgos, aiutano a comprendere questa particolarità. Infatti, una parte dei soggetti di razza Asinara che hanno contribuito a fondare il gruppo di asini allevati in questo parco, sarebbero stati prelevati in passato dalla popolazione di Foresta Burgos.

Inoltre, due individui della popolazione di Perugia si vanno a collocare nella zona intermedia tra i due principali cluster, facendo supporre che il patrimonio genetico di questi soggetti abbia subito delle introgressioni ad opera di altre razze allevate in Italia.

Anche gli asini di razza Amiata (campionati a Pisa) tendono a collocarsi nella porzione intermedia tra il Cluster razze Continentali e il Cluster razze Sardegna, sebbene mostrino una maggiore affinità con i soggetti del cluster continentale. In effetti, la razza Amiata, come riportano gli standard di

razza del relativo Registro Anagrafico, presenta un fenotipo molto simile a quello della razza Sarda. Al di là dei maggiori valori biometrici, il mantello degli asini Amiata si presenta grigio sorcino con riga mulina crociata, il ventre è chiaro e sono presenti zebbrature agli arti, analogamente al fenotipo Sardo. Inoltre, così come è risaputo che gli asini Sardi siano stati in passato oggetto di meticciamiento con individui Amiata, è altrettanto noto che la regione d'origine della razza Amiata (Toscana) ospita un gran numero di allevatori di origine sarda che potrebbero avere incrociato, a loro volta, asini Amiata con soggetti di razza Sarda esportati dalla Sardegna.

Infine, l'analisi PCoA mette nettamente in risalto la distinzione tra i pattern genetici degli asini austriaci di razza Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel e i soggetti albini di razza Asinara. (Fig. 41)

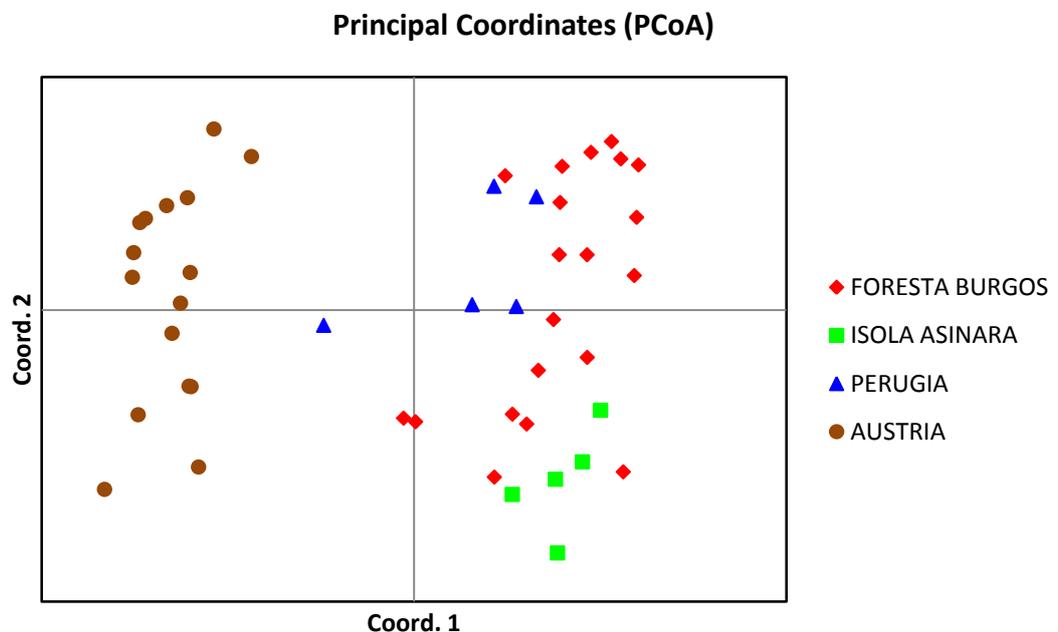


Fig. 41. Analisi PCoA relativa agli asini di razza Asinara (di Foresta Burgos, Isola dell'Asinara e Perugia) e di razza Barockesel

I siti web dedicati a questa particolare razza austriaca, riportano un' ipotesi proposta dal prof. F. D. Altmann (VR Universität) secondo cui questa razza avrebbe avuto origine, nell'epoca Barocca, da una razza italiana (non ben definita) importata dalla corte di Napoli, che probabilmente si identificava con la razza Asinara.

In realtà gli stessi siti istituzionali della razza Barockesel precisano che questi asini venivano in passato erroneamente definiti albini, mentre in realtà possiedono un mantello giallo chiarissimo che appare come un bianco brillante: in questo caso, essendo assente il pigmento melanico, si tratterebbe quindi di flavismo e non di albinismo.

In definitiva, dall'analisi dei profili genetici di queste due razze, riteniamo di poter escludere la possibilità di un legame diretto tra esse, sebbene ulteriori indagini sarebbero auspicabili per una migliore caratterizzazione genetica delle stesse.

Procedendo con un'ulteriore elaborazione PCoA all'interno delle popolazioni della Sardegna, si consolida l'ipotesi di una scarsa strutturazione tra le popolazioni asinine dell'isola anche tra gli asini di razza Sarda e quelli di razza Asinara da noi campionati, seppur è di notevole interesse una certa distanza tra le popolazioni Sarde ed il gruppo di Foresta Burgos (e Perugia).

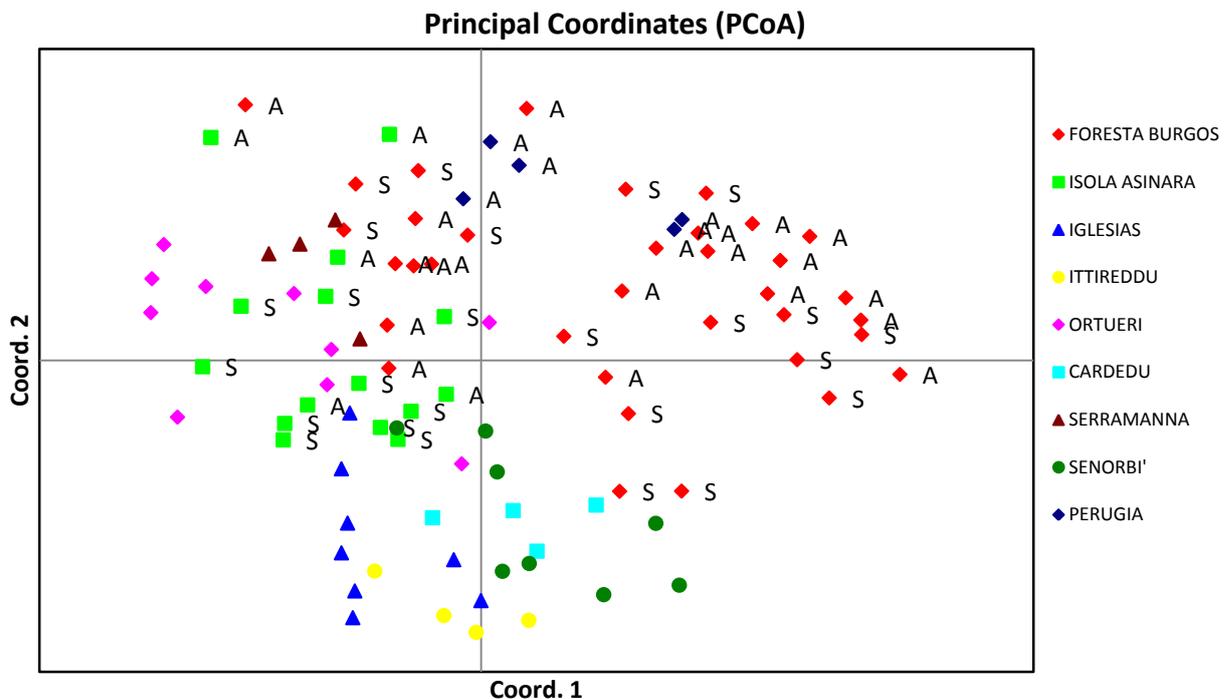


Fig. 42. Analisi PCoA relativa a tutti i soggetti della Sardegna (inclusa l'isola dell'Asinara). I soggetti delle località Foresta Burgos, Isola dell'Asinara e Perugia sono stati identificati con le lettere A e S. La lettera A indica i soggetti di razza Asinara, la lettera S indica i soggetti di razza Sarda. Nelle altre località tutti i soggetti sono di razza Sarda.

L'asse 1 spiega una porzione della variabilità del 31,08%, l'asse 2 ne spiega il 19,46%.

La tabella seguente riassume la percentuale di variabilità spiegata dai primi tre assi, variabilità totale di 66,06%.

| ASSE | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------|-------|-------|--------------|
| % DI VARIABILITÀ SPIEGATA | 31,08 | 19,46 | 15,52 |
| SOMMA % | 31,08 | 50,54 | 66,06 |

Nel grafico seguente vengono rappresentati soli individui campionati nei siti di Foresta Burgos, Isola dell'Asinara e Perugia.

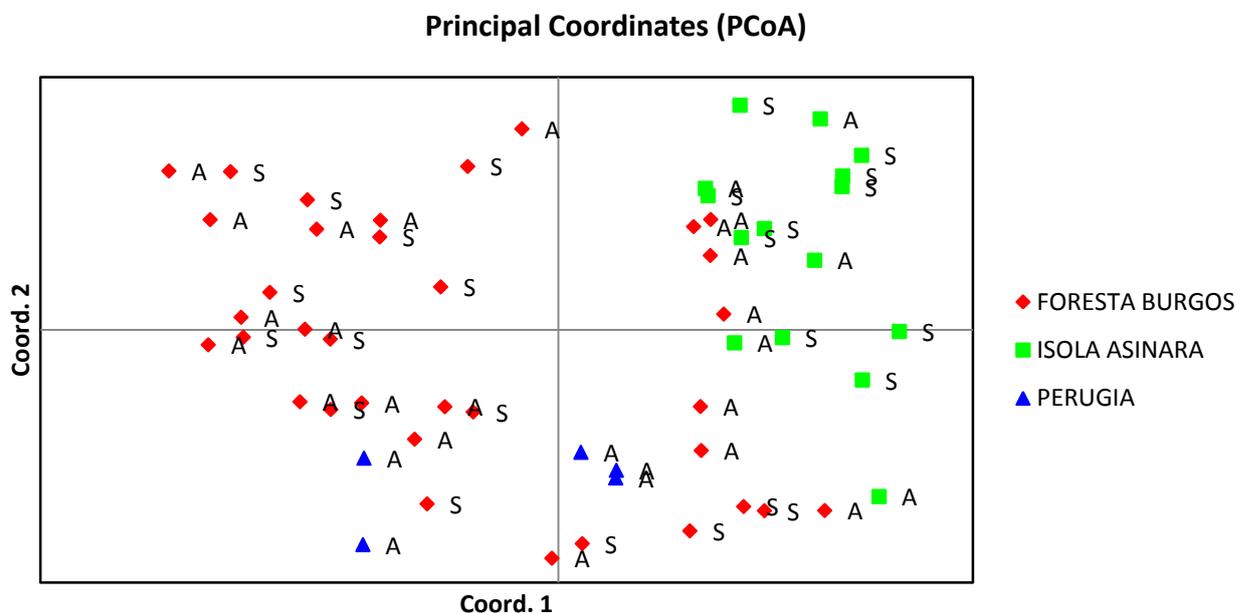


Fig. 43. Particolare della precedente analisi PCoA relativa ai soli asini campionati nei siti Foresta Burgos, Isola dell'Asinara e Perugia. La lettera A indica i soggetti di razza Asinara, la lettera S indica i soggetti di razza Sarda.

Gli asini di razza Asinara campionati in questo studio provengono da tre differenti località: il Parco Nazionale dell'isola dell'Asinara, l'allevamento regionale di Foresta Burgos e il parco "Città della domenica" a Perugia. Nelle prime due località si trovano sia asini Sardi che asini dell'Asinara.

Osservando il grafico (Fig.43) dell'analisi PCoA, si evince che in questi due siti non è possibile distinguere tra loro i soggetti appartenenti alle due razze della Sardegna. La stessa analisi, inoltre, evidenzia una generale separazione della maggior parte (più del 60%) dei soggetti allevati a

Foresta Burgos (Sardi e Asinara) rispetto al cluster principale, includente gli asini di altri siti di campionamento. Questi due aspetti sono molto interessanti e necessitano di essere esaminati in maniera congiunta.

La mancata differenziazione dei soggetti delle due razze potrebbe essere imputata, ad esempio, al ridotto numero di marcatori F-ISSR e ad eventuali limiti di campionamento. Nonostante ciò, la capacità mostrata nel separare la maggior parte degli asini di Foresta Burgos suggerisce che gli stessi marcatori abbiano un buon potere discriminante.

Evidentemente, quindi, la somiglianza tra le due razze della Sardegna è da imputare ad altre cause principali.

Anzitutto è da tenere in considerazione che la razza Sarda e la razza Asinara, sebbene siano riconosciute come due etnie distinte da più di venti anni, condividono una comune origine geografica e, fenotipicamente, se si esclude il carattere dell'albinismo e poche altre caratteristiche biometriche, mostrano notevoli affinità: ciò consente di supporre ragionevolmente una comune origine.

Pertanto, la mancata differenziazione tra esse potrebbe essere attribuita ad una notevole similarità dei rispettivi pattern genetici.

Inoltre, non è da sottovalutare la possibilità che alcuni individui campionati siano dei meticci derivanti dall'incrocio tra soggetti delle due razze, e quindi siano solo fenotipicamente appartenenti ad una o all'altra etnia. Non è raro, infatti, specie sull'isola dell'Asinara, trovare branchi "misti" di asini in cui soggetti dal mantello grigio (Sardi) convivono e si riproducono con soggetti dal mantello bianco (Asinara). Di conseguenza, l'analisi genetica di questi animali meticci rivela una sostanziale similarità, nonostante il diverso fenotipo.

Riguardo gli asini razza Asinara allevati a Perugia, questa ulteriore analisi PCoA mostra chiaramente la stretta relazione di questi animali con quelli allevati a Foresta Burgos.

Le successive analisi svolte con Structure hanno permesso di evidenziare in maniera ancora più specifica quanto precedentemente osservato.

Anzitutto sono stati determinati i valori ΔK per individuare il K più rappresentativo.

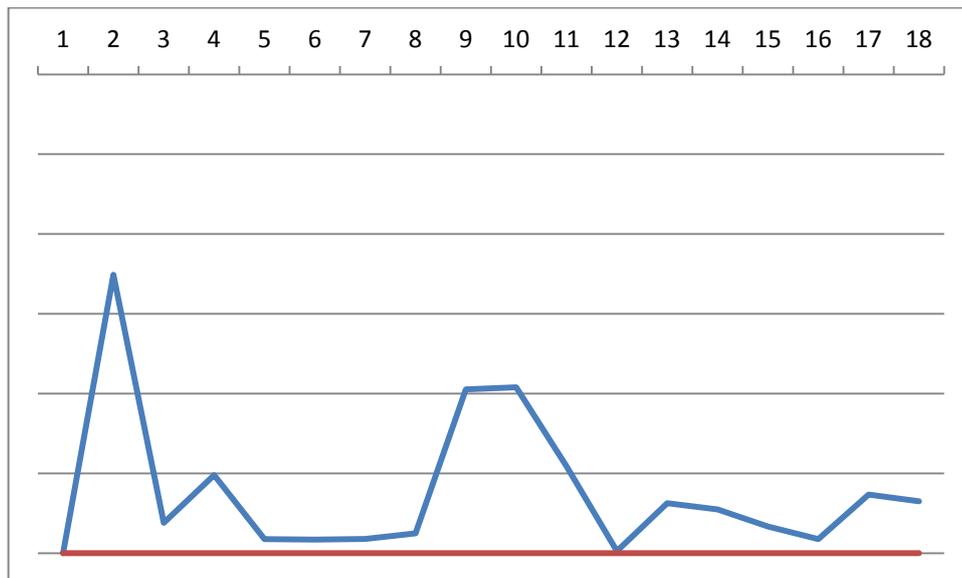


Fig.44. Valori ΔK determinati relativamente all'intera popolazione asinina studiata.
Il valore $K=2$ è il più rappresentativo.

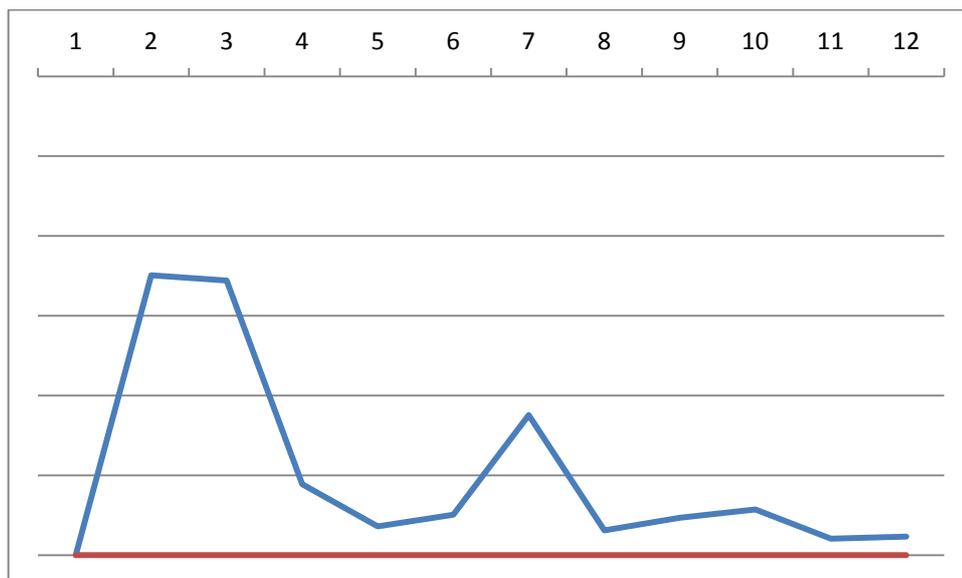


Fig.45. Valori ΔK determinati relativamente alla sola popolazione asinina della Sardegna.
Il valore $K=2$ è il più rappresentativo.

Analizzando la suddivisione in cluster elaborata per K=2, emerge la netta separazione tra gli asini di razza Sarda e Asinara (Cluster razze Sardegna) rispetto alle altre razze esaminate (Cluster razze Continentali).

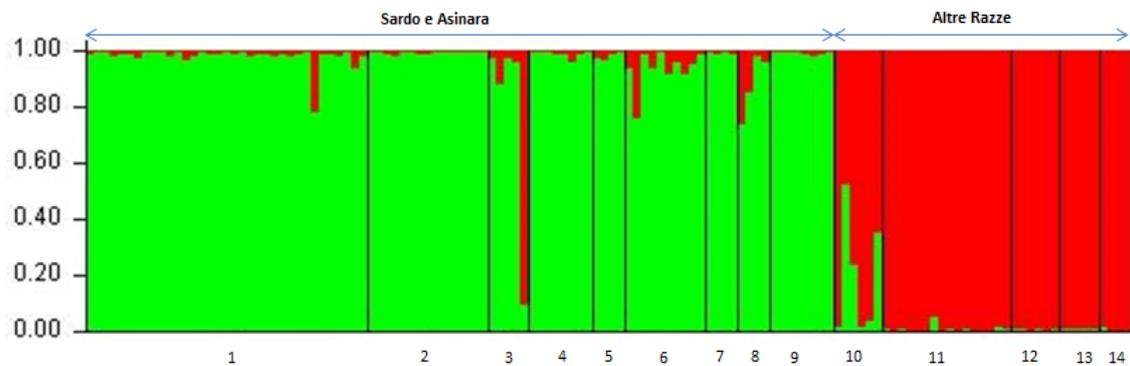


Fig. 46. Clusterizzazione Bayesiana ottenuta mediante STRUCTURE (K=2) dalla quale emerge la separazione tra le razze della Sardegna e le altre razze esaminate. I numeri indicano i siti di campionamento [1.Foresta Burgos; 2.Isola Asinara; 3.Perugia; 4.Iglesias; 5.Ittireddu; 6.Ortueri; 7.Cardedu; 8.Serramanna; 9.Senorbi; 10.Pisa (*Amiata*); 11.Austria (*Barockesel*); 12.Viterbo (*Viterbese*); 13.Taranto (*Martina Franca*); 14.Bologna (*Romagnolo*)].

Questa separazione è stata evidenziata anche da Colli et al., nel 2013, impiegando un set di 16 marcatori microsatelliti su individui di varie razze italiane, inclusi alcuni asini di razza Sarda e Asinara allevati ex situ, ossia in Italia, ma al di fuori della Sardegna e dall'isola dell'Asinara.

Analogamente a Colli et al., e in accordo con la precedente analisi PCoA, è da rilevare che gli asini di razza Amiata (Fig.46, pop.10) si collocano in una posizione "intermedia" tra le razze non sarde e le razze della Sardegna, evidenziando una certa affinità genetica con queste ultime. A tal riguardo si noti come l'analisi PCoA (Fig. 42) tenda a collocare i soggetti Amiata maggiormente in prossimità del cluster delle razze della Sardegna, mentre Structure tenda a attribuire una maggiore affinità con il cluster delle razze non sarde. In ogni caso, entrambe le analisi pongono la razza in posizione intermedia.

Infine, Structure rimarca ulteriormente la chiara differenza dei pattern genetici degli asini della razza austriaca Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel (Fig.46, pop.11) e quelli di razza Asinara (Fig.46, pop.2), già osservata nell'analisi PCoA.

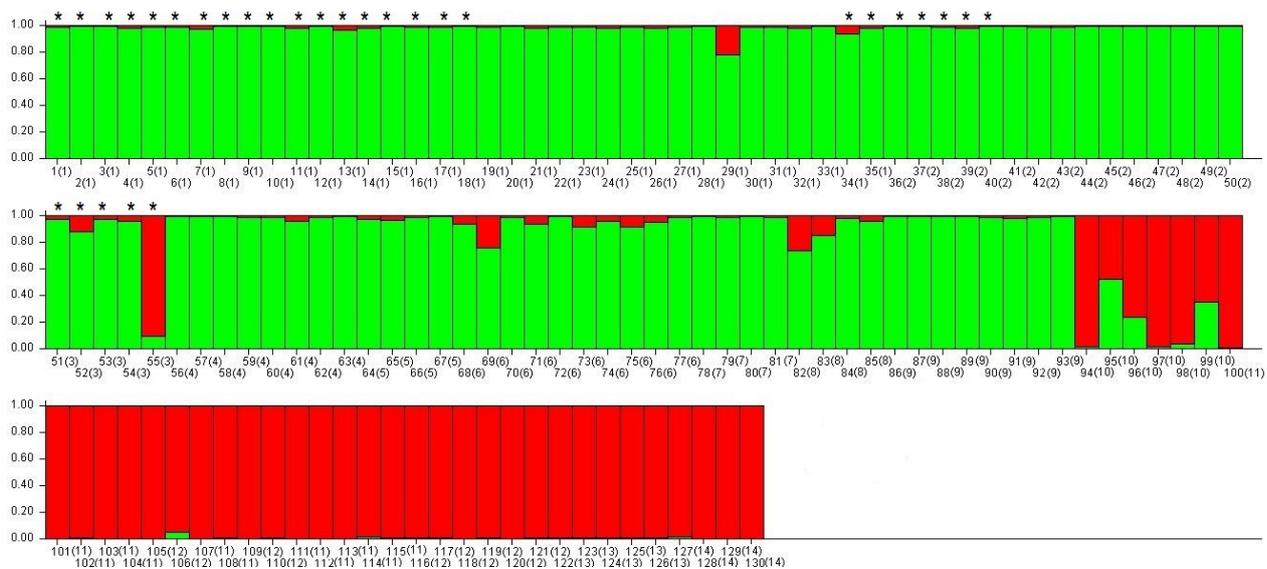


Fig. 47. In questa immagine viene rappresentata più in dettaglio la precedente suddivisione in cluster dei soggetti analizzati. I numeri fuori dalle parentesi indicano gli asini (tot.130), mentre quelli tra parentesi indicano i siti di campionamento [1.Foresta Burgos; 2.Isola Asinara; 3.Perugia; 4.Iglesias; 5.Ittireddu; 6.Ortueri; 7.Cargedu; 8.Serramanna; 9.Senorbì; 10.Pisa (*Amiata*); 11.Austria (*Barockesel*); 12.Viterbo (*Viterbese*); 13.Taranto (*Martina Franca*); 14.Bologna (*Romagnolo*)]. Il simbolo * indica i soggetti di razza Asinara.

Relativamente al solo cluster delle razze della Sardegna, l'analisi con Structure consente di distinguere i soggetti allevati presso il centro di Foresta Burgos (Fig.47, pop.1), e quelli di razza Asinara allevati a Perugia (che come accennato hanno in parte origine da Foresta Burgos) (Fig. 47, pop.4), rispetto agli individui campionati in altri siti della Sardegna.

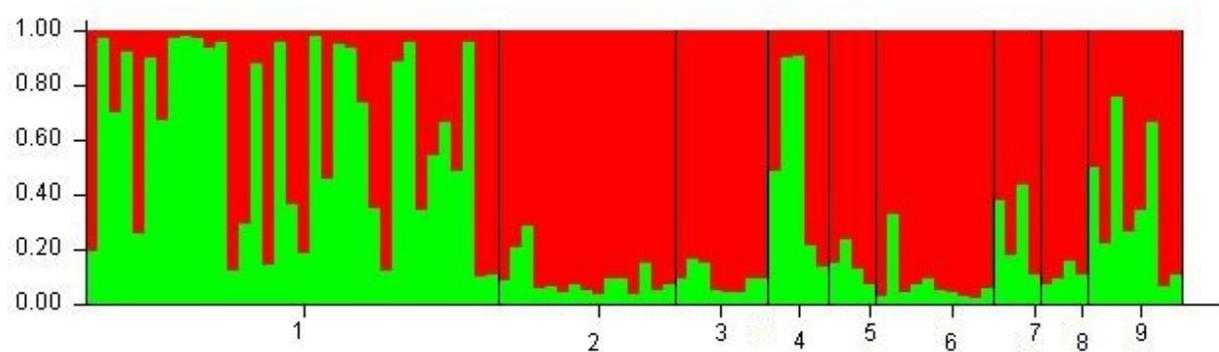


Fig. 46. Clusterizzazione Bayesiana ottenuta mediante STRUCTURE (K=2) dalla quale emerge la separazione tra i diversi siti di campionamento della Sardegna. I numeri indicano i siti di campionamento [1.Foresta Burgos; 2.Isola Asinara; 3. Iglesias; 4. Perugia; 5.Ittireddu; 6.Ortueri; 7.Cargedu; 8.Serramanna; 9.Senorbì].

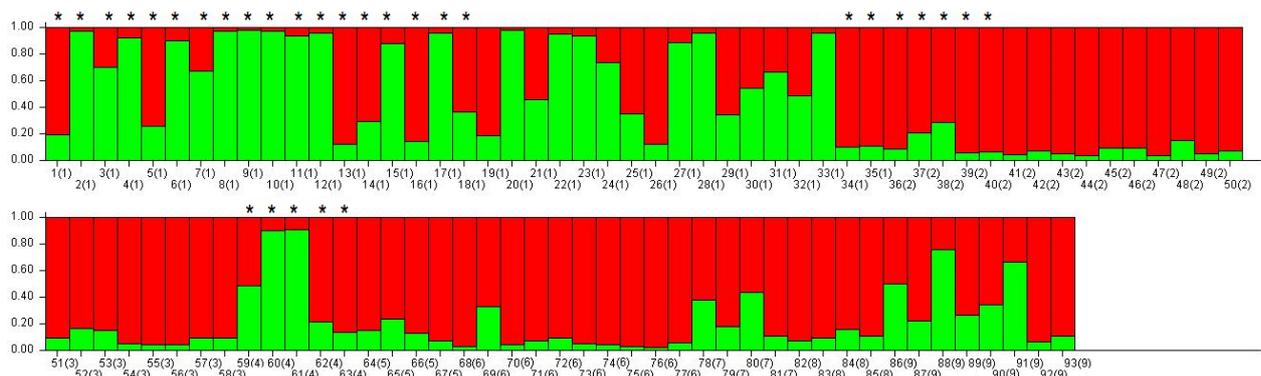


Fig. 48. In questa immagine viene rappresentata più in dettaglio la precedente suddivisione in cluster dei soggetti campionati nei vari siti della Sardegna. I numeri fuori dalle parentesi indicano gli asini (tot.93), mentre quelli tra parentesi indicano i siti di campionamento [1.Foresta Burgos; 2.Isola Asinara; 3.Iglesias; 4.Perugia; 5.Ittireddu; 6.Ortuero; 7.Cardedu; 8.Serramanna; 9.Senorbi; Il simbolo * indica i soggetti di razza Asinara.

Ancora una volta, confermando l'analisi PCoA iniziale, emerge chiaramente la buona capacità discriminante dei tre marcatori F-ISSR: nonostante nel nostro pool di campioni non sia possibile differenziare la razza Sarda dalla razza Asinara, la popolazione allevata presso l'azienda di Foresta Burgos mostra un evidente pattern genetico distintivo.

A tal riguardo si potrebbe avanzare l'ipotesi che presso questo centro si stia lentamente costituendo una popolazione asinina (Sarda e Asinara) con caratteri specifici e unici nel contesto isolano.

Analisi del DNA mitocondriale (regione HVSI)

Mediante le analisi molecolari effettuate in questo studio sono state ottenute 120 sequenze, di un frammento di 334 bp della HVSI del mtDNA, utili per analizzare la variabilità mitocondriale nelle razze asinine oggetto di indagine. Come già riportato in precedenza, le analisi hanno riguardato le popolazioni di razza asino dell'Asinara e di razza Sarda, che vivono attualmente sull'Isola dell'Asinara e in altre località della Sardegna, alcuni campioni di altre razze italiane a limitata diffusione come Amiata, Martina Franca, Viterbese e Romagnolo, come campioni di confronto, ed infine un campione della razza austriaca Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel Barockesel (le cui possibili relazioni con la razza Asinara sono già state espone in precedenza). Le analisi sono state condotte sia a livello intra-popolazionistico che inter-popolazionistico, anche al fine di valutare le relazioni tra le razze considerate.

Il multi-allineamento tra le sequenze ottenute e la sequenza di riferimento di *Equus asinus* (GenBank X97337.1; Xu et al., 1996) eseguito con Mega6, ha consentito di individuare e definire la posizione nucleotidica i siti polimorfici all'interno del nostro dataset (120 campioni), e conseguentemente di definire gli aplotipi mitocondriali rilevati (All. 3).

Considerando 120 campioni analizzati è stato osservato un totale di 73 siti polimorfici, di cui 36 biallelici, 4 triallelici, 1 tetrallelico, e 32 singleton.

Successivamente, sulla base delle sequenze è stato possibile individuare i vari aplotipi rappresentati nelle popolazioni in analisi. Il totale degli aplotipi determinati è pari a 79, di cui 66 privati (il singolo aplotipo coincide con un singolo individuo della popolazione), 4 specifici (il singolo aplotipo è comune a più soggetti ma all'interno della stessa razza) e 9 condivisi (il singolo aplotipo è comune a più soggetti di razze diverse e, eventualmente, di origini geografiche diverse).

| Frequenze aplotipiche per origine geografica divise per razza | | | | | | | | |
|---|---------|----------|---------|------------|--------|-----------|-----------|----------------|
| Isola Asinara | | Sardegna | | Austria | Italia | | | |
| Sardo | Asinara | Sardo | Asinara | Barockesel | Amiata | Viterbese | Romagnolo | Martina Franca |
| H1 | H2 | H7 | H7 | H65 | H7 | H72 | H70 | H70 |
| H2 | H3 | H36 | H41 | H66 | H70 | H73 | H76 | H75 |
| H4 | H7 | H41 | H47 | H67 | H71 | H74 | H77 | |
| H5 | H8 | H42 | H48 | H68 | | | H78 | |
| H6 | H10 | H43 | | H69 | | | | |
| H7 | H14 | H44 | | | | | | |
| H9 | H15 | H45 | | | | | | |
| H11 | H16 | H46 | | | | | | |
| H12 | H17 | H49 | | | | | | |
| H13 | H20 | H50 | | | | | | |
| H17 | H24 | H51 | | | | | | |
| H18 | H25 | H52 | | | | | | |
| H19 | H26 | H53 | | | | | | |
| H20 | H27 | H54 | | | | | | |
| H21 | H29 | H55 | | | | | | |
| H22 | H31 | H56 | | | | | | |
| H23 | H32 | H57 | | | | | | |
| H28 | | H58 | | | | | | |
| H30 | | H59 | | | | | | |
| H31 | | H60 | | | | | | |
| H33 | | H61 | | | | | | |
| H34 | | H62 | | | | | | |
| H35 | | H63 | | | | | | |
| H36 | | H64 | | | | | | |
| H37 | | H65 | | | | | | |
| H38 | | H79 | | | | | | |
| H39 | | | | | | | | |
| H40 | | | | | | | | |

In bianco sono indicati gli aplotipi privati, in viola gli aplotipi specifici, in grigio gli aplotipi condivisi.

Grazie al software Arlequin (ver 3.5.1.2) è stato sono stati calcolati i seguenti Indici di Diversità standard, in relazione alle quattro marco-aree di campionamento (Isola dell'Asinara, Sardegna, Italia, Austria) :

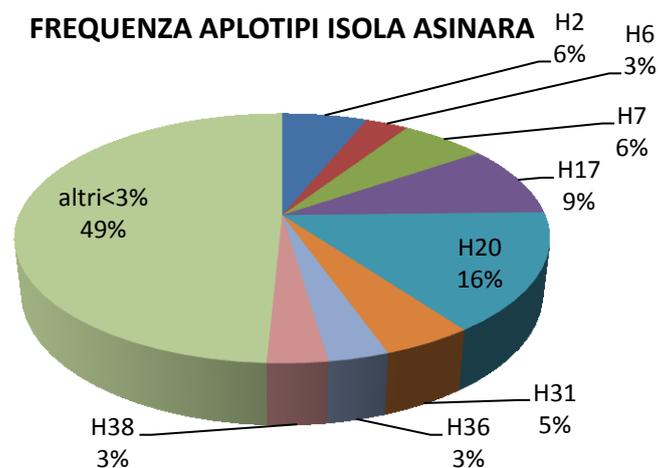
| Origine Geografica | N | Ht | Sum of sq | Haplotype diversity | | Pairwise differences | | Nucleotide diversity | |
|--------------------|------------|-----------|-----------|---------------------|--------|----------------------|----------|----------------------|----------|
| | | | | h | SD | MNPD | SD | π | SD |
| Isola Asinara | 65 | 40 | 0,0523 | 0,9625 | 0,0131 | 4,544231 | 2,263377 | 0,013565 | 0,007491 |
| Sardegna | 35 | 24 | 0,0465 | 0,9815 | 0,0132 | 10,63866 | 4,963674 | 0,032336 | 0,016772 |
| Italia | 13 | 10 | 0,1479 | 0,9231 | 0,0694 | 6,487179 | 3,282362 | 0,019481 | 0,01108 |
| Austria | 7 | 5 | 0,2245 | 0,9048 | 0,1033 | 5,809524 | 3,161821 | 0,017446 | 0,010876 |
| tot. | 120 | 79 | | | | | | | |

N=numero di individui; Ht= numero di aplotipi per popolazione; h=Haplotype diversity o Gene diversity (Diversità aplotipica); MNPD = Pairwise differences o Mean number of pairwise differences (Numero medio di differenze a coppie); π = Nucleotide diversity (Diversità nucleotidica); SD=deviazione standard;

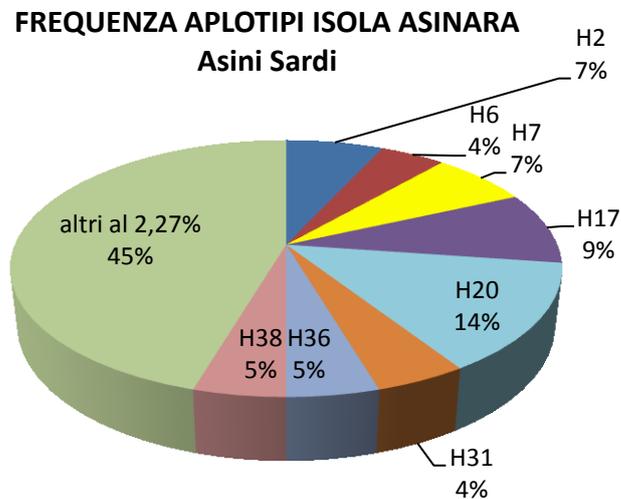
Sulla base degli indici riportati in tabella si osserva una elevata diversità aplotipica infatti H varia da 0,9048 a 0,9625 con i campioni austriaci e quelli della Sardegna che si collocano ai due estremi.

Con le frequenze aplotipiche calcolate è stato possibile realizzare i diagrammi che rappresentano i principali aplotipi per le popolazioni di ogni area geografica.

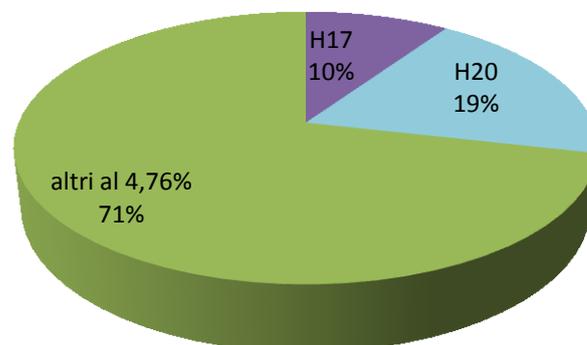
Il grafico seguente, relativo all'isola dell'Asinara, mostra come l'aplotipo rappresentato con maggiore frequenza nella popolazione asinina sia H20, seguito dagli aplotipi H17 e H7.



Considerando singolarmente le due razze presenti sull'isola dell'Asinara (asino Sardo e asino dell'Asinara) è possibile ottenere i seguenti diagrammi sulle frequenze aplotipiche:

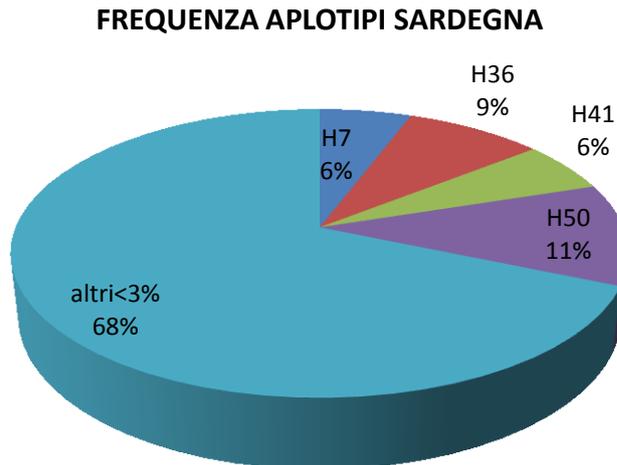


FREQUENZA APLOTIPI ISOLA ASINARA
Asini Asinara



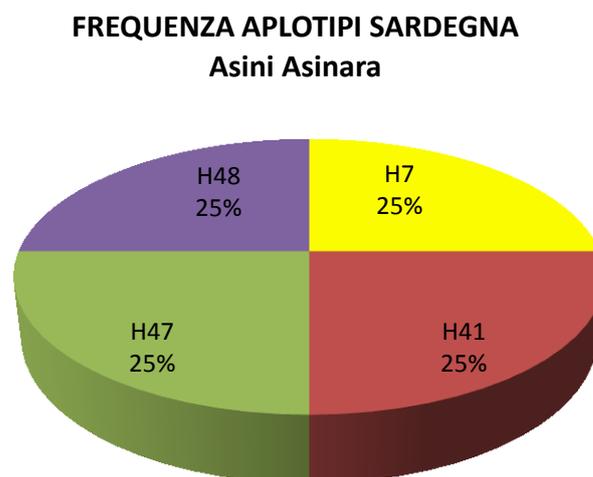
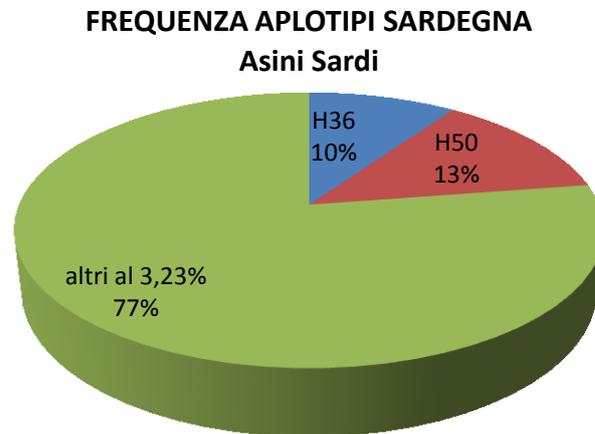
Da questi due grafici, in cui gli aplotipi sono stati divisi per razza, si nota come negli asini di razza Sarda e in quelli di razza Asinara siano rappresentati maggiormente gli aplotipi H20 e H17, con frequenze molto simili tra loro.

Il calcolo delle frequenze aplotipiche in Sardegna mostra che l'aplotipo con più alta frequenza è H50, seguito da H36 (presente anche tra i soggetti dell'Isola dell'Asinara, ma con minore frequenza) e dagli aplotipi H41 e H7 (quest'ultimo rilevato con la medesima frequenza anche nei soggetti dell'Isola dell'Asinara).



Tra gli aplotipi di questa area geografica, ve ne sono numerosi che hanno una frequenza minore del 3%: si tratta prevalentemente di aplotipi privati.

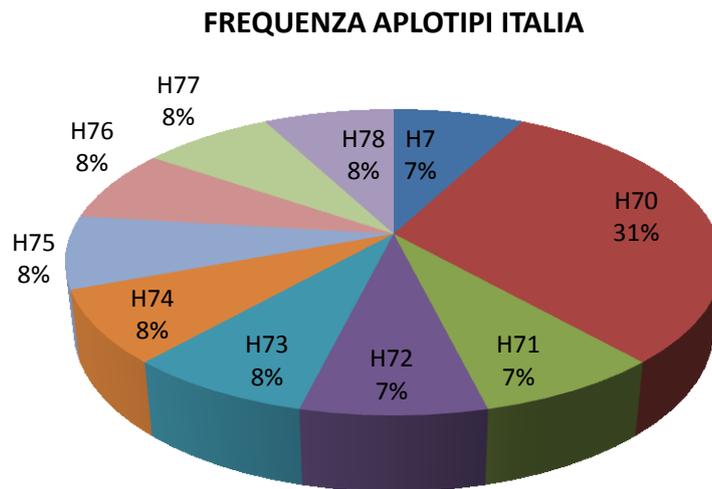
Anche in questo caso sono state successivamente determinate le frequenze aplotipiche per razza che hanno permesso di elaborare i seguenti grafici:



Da questi grafici emerge che nella popolazione di asini Sardi della Sardegna i due aplotipi più rappresentati sono H50 e H36, mentre i quattro individui di razza Asinara campionati in Sardegna presentano ciascuno un aplotipo differente.

In generale, si può affermare che le due popolazioni asinine della Sardegna e dell'isola dell'Asinara differiscono tra loro per tipo e frequenza di aplotipi, come evidenziato anche dall'analisi AMOVA.

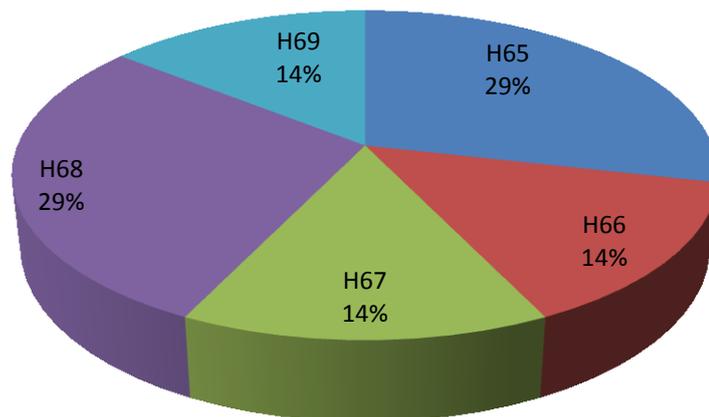
Il numero di aplotipi individuati nei campioni della macro-area Italia, cioè tra le razze Amiata, Martinafranca, Romagnolo e Viterbese, è inferiore rispetto a quello individuato nelle popolazioni della Sardegna e dell'Isola dell'Asinara. Questo potrebbe essere dovuto, tuttavia, alla minore numerosità di campioni di queste razze analizzati nella nostra indagine.



In generale, è possibile notare che tutti gli aplotipi qui rappresentati differiscono da quelli presenti nelle popolazioni della Sardegna e dell'isola dell'Asinara. Fa eccezione l'aplotipo H7 che invece è riscontrabile con frequenze simili anche nelle razze sarde. Questo aspetto è di grande interesse in quanto evidenzia una marcata diversità aplotipica delle altre razze italiane rispetto alla razza Sarda e alla razza Asinara.

Nella razza austriaca Österreichisch-Ungarische weiße Barockesel, infine, sono stati evidenziati cinque differenti aplotipi e, tra questi, i più rappresentati nella popolazione esaminata sono H65 e H68 con il 29% di frequenza.

FREQUENZA APLOTIPI AUSTRIA



Mentre gli aplotipi H66, H67, H68 e H69 sono esclusivi di questa razza, l'aplotipo H65 risulta essere condiviso con un soggetto di razza sarda proveniente dalla Sardegna. A parte questa particolarità, tuttavia, è possibile affermare che questa analisi sulla frequenza aplotipica nei soggetti di razza Barockesel sembra confermare la netta diversità genetica rispetto ai soggetti di razza Asinara, già riscontrata nell'analisi con i marcatori F-ISSR.

Nel loro insieme, gli asini delle razze Italiane e gli individui di razza Barockesel presentano una certa diversità di aplotipi rispetto alle popolazioni della Sardegna e dell'isola dell'Asinara.

I risultati dell'analisi AMOVA effettuata per i diversi raggruppamenti sono stati riassunte nella seguente tabella:

| <i>Tipo di raggruppamento</i> | <i>% di variabilità componente intra-popolazionistica</i> | <i>% di variabilità tra popolazioni all'interno del gruppo</i> | <i>% di variabilità tra gruppi</i> | <i>Fst</i> | <i>P value *</i> |
|--|---|--|------------------------------------|------------|------------------|
| Unico gruppo | | | | | |
| 1) Isola Asinara, Sardegna, Italia e Austria | 61,51 | 38,49 | -- | 0,38494 | 0,0000 |
| 2) Isola Asinara e Sardegna | 54,39 | 45,61 | -- | 0,45613 | 0,0000 |
| 2 gruppi | | | | | |
| 1) Isola Asinara e Sardegna vs Italia e Austria | 66,12 | 47,73 | -13,85** | 0,33877 | 0,0000 |
| 2) Asino Sardo Isola Asinara e Asino sardo Sardegna vs Asino Asinara Isola Asinara | 72,4 | 59,83 | -32,23** | 0,27601 | 0,0000 |
| <i>(*p significativo per valori <0,05)</i> | <i>** p non significativo</i> | | | | |

Nell'analisi AMOVA qui riportata, la variabilità mitocondriale osservata è stata scomposta nelle diverse componenti, ovvero quella intrapopolazionistica, quella tra popolazioni all'interno dello stesso gruppo e tra gruppi; tali componenti sono state messe in relazione con la possibile presenza di struttura genetica tra le popolazioni analizzate sulla base delle origini geografiche e/o della appartenenza alla stessa razza.

Come riportato in tabella, sono stati testati diversi possibili raggruppamenti, nel primo le popolazioni in studio provenienti da quattro macroaree geografiche sono state considerate come un unico gruppo, in questo caso si osserva una elevata variabilità legata alle differenze tra popolazioni all'interno del gruppo (38,49%). Tale risultato è stato ulteriormente indagato imponendo una struttura a due gruppi, con le popolazioni sarde versus le popolazioni italiane ed austriaca; in questo caso si è potuto notare che tale differenziazione non sembra essere legata alle differenze tra gruppi di diversa provenienza geografica in termini di macroaree (Sardegna e non-Sardegna), infatti la percentuale di variabilità associata è risultata negativa e non significativa (-13,85%; P-value = 1.00000+-0.00000). Successivamente sono stati considerati come appartenenti ad un unico gruppo i campioni di asino Sardo e Asinara suddivisi in due popolazioni in base alla provenienza geografica, Sardegna o Isola dell'Asinara. In questo caso si è potuto osservare che la componente della variabilità legata alle differenze tra popolazioni all'interno del

gruppo è ulteriormente aumentata, evidenziando una marcata differenziazione tra le popolazioni sarde provenienti dalle due Isole (maggiore e minore); tale valore (45,61%), è risultato significativo. Infine per testare l'eventuale presenza di struttura tra le popolazioni sarde in base alla suddivisione per razze l'analisi è stata eseguita considerando ancora due gruppi di popolazioni, uno costituito da asini di razza Sarda provenienti dall' Isola Asinara e Sardegna e l'altro rappresentato da asini di razza Asinara provenienti dall'Isola dell'Asinara. Questa ultima analisi ha messo in evidenza che la variabilità rilevata è maggiormente legata alla componente tra popolazioni all'interno dello stesso gruppo (59,83%) piuttosto che alle differenze tra i gruppi che in questo caso coincidono con le due razze, che anche in questo caso mostra un valore negativo e non significativo (-32,23%). L'analisi AMOVA indica dunque una sostanziale omogeneità dal punto di vista della variabilità mitocondriale tra le due razze sarde, mentre mette in luce una certa differenziazione tra le popolazioni dell'Asinara e della Sardegna di asino Sardo.

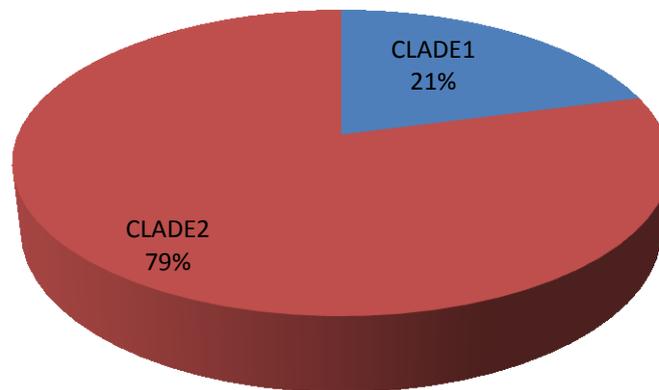
Gli aplotipi definiti sulla base della sequenza nucleotidiche sono stati classificati nei due cladi principali detti nubiano (C1) e somalo (C2), considerando lo stato allelico di 12 siti polimorfici considerati diagnostici (Kimura et al., 2011 e Perz-Pardal et al, 2014), come mostrato nella tabella seguente:

| | | Posizione Nucleotidica (np) | | | | | | | | | | | |
|-----------|--|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | | 4 | 6 | 5 | 6 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 5 | 5 | 6 |
| | | 8 | 9 | 9 | 5 | 9 | 6 | 0 | 4 | 6 | 8 | 5 | 2 |
| | | 4 | 8 | 8 | 2 | 0 | 9 | 3 | 4 | 2 | 0 | 6 | 1 |
| Clade | Aplotipo | G | C | C | C | C | A | T | G | A | A | A | A |
| C2 | <i>Equus asinus</i> ref. X97337.1 | | | | | | | | | | | | |
| C1 | H45, H52, H53, H59 | A | T | T | T | T | G | C | A | G | G | G | G |
| C1 | H44, H49, H51, H79, H54, H58, H60, H62, H63, H50 | A | T | T | T | T | G | C | A | G | G | . | G |
| C1 | H55, H57, H47, H61, H64 | A | T | T | T | T | G | C | A | G | . | . | G |
| C1 | H74, H75 | A | T | T | T | T | G | C | A | G | G | . | . |
| C2 | H19, H25, H26, H27, H1, H4, H11, H12, H14, H22, H23, H24, H28, H2, H6, H17, H20, H40, H69, H7, H31, H36, H38, H41, H70, H65, H68, H78, H42, H48, H72, H30 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| C2 | H76, H9 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . |
| | H21, H32, H33, H39, H77, H43, H46, H73, H34, H35 , H37, H67 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . |
| C2 | H10, H66, H29 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | G | . |
| C2 | H71 | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

In questa tabella vengono elencati i 12 siti polimorfici diagnostici che suddividono i due Clade

Il grafico seguente mostra la frequenza dei due Clade nel nostro dataset di campioni (n.120 asini) provenienti dalle 4 macro aree geografiche (Sardegna, Isola dell'Asinara, Italia, Austria).

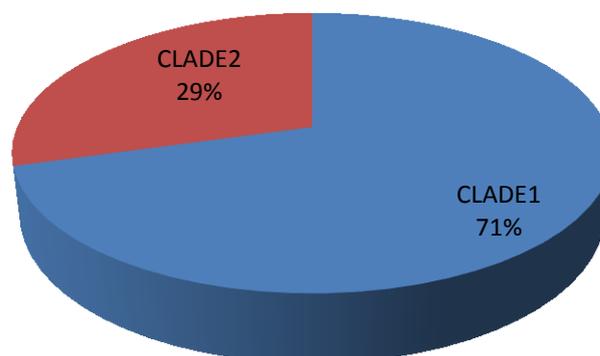
Frequenza complessiva CLADE



Dei 120 campioni analizzati, solo 25 campioni sono attribuiti al Clade1, mentre i restanti e 95 ricadono nel Clade 2. Gli aplotipi assegnati al Clade 2 sono prevalentemente quelli rappresentati nelle popolazioni con sarde e nella popolazione dell'Isola dell'Asinara.

Nella popolazione della Sardegna sono rappresentati sia aplotipi del Clade1 (71%) che del Clade 2 (29%), mentre in quella dell'Asinara sono presenti solo aplotipi del Clade 2, a differenza di quanto riportato da Pellecchia et al. (2007).

Frequenza CLADE Sardegna



Gli aplotipi individuati sono stati analizzati con un approccio di tipo filogenetico attraverso l'ausilio del software Network, per mezzo del quale è stato possibile creare un albero del tipo Median Joining Network (Fig.49).

In questo Network sono state incluse, oltre alle razze da noi campionate, anche altre razze asinine diffuse a livello mondiale, le cui sequenze mitocondriali sono state ricavate da precedenti studi scientifici (Beja-Pereira et al.,2004; Yang et al., 2006; Chen et al., 2006; Kimura et al., 2011; Perez-Pardal et al., 2013).

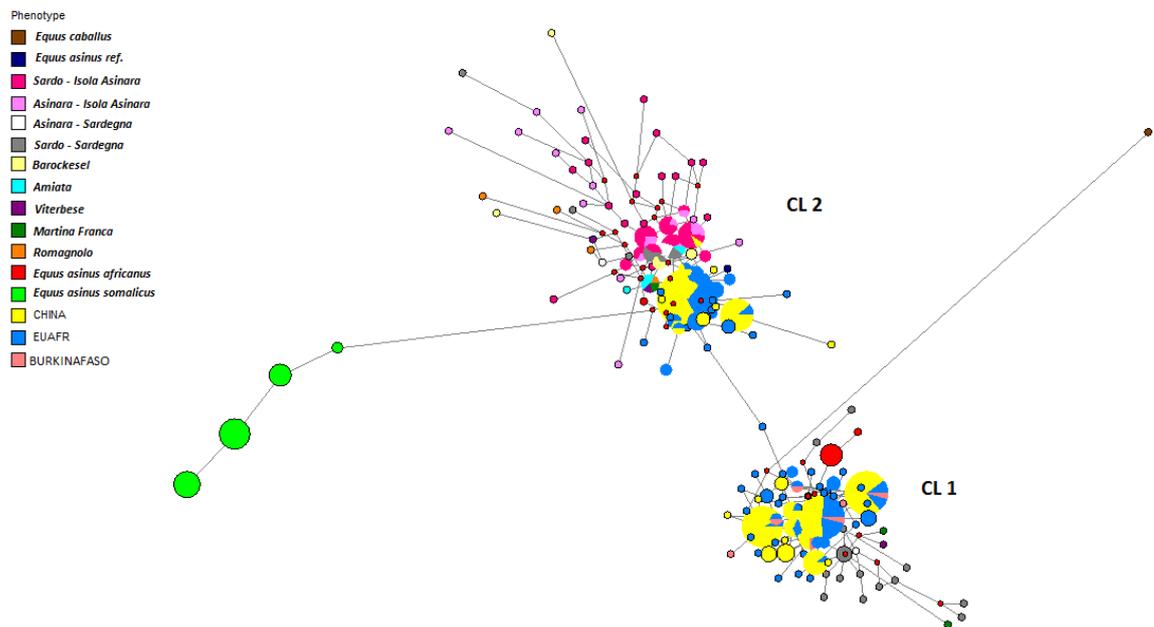


Fig.49. Median Joining Network raffigurante la distribuzione nei due tipici Clade mondiali degli aplogruppi di asino (CL1, nubiano; CL2, somalo).

La distanza dei due Clade è determinata dai 12 siti polimorfici precedentemente descritti. Come outgroup è stata inserita una sequenza di *Equus caballus* (GenBank X79547.1), mentre per la corretta attribuzione dei Clade sono state utilizzate sequenze di *Equus asinus somalicus* (che individua il Clade2) e *Equus asinus africanus* (che individua il Clade1) (Kimura et al., 2011). Queste ultime sono state ricavate attraverso il sequenziamento di DNA mitocondriale proveniente da campioni museali (o storici).

Come si può osservare, gli aplotipi rappresentati nelle razze da noi analizzate vanno a distribuirsi all'interno dei due Clade, confermando così la tipica distribuzione osservata nelle altre razze. La sequenza di *Equus asinus* da noi utilizzata come sequenza di riferimento (GenBank X97337.1)

ricade all'interno del Clade2.

Analizzando il Network con le sole razze esaminate nella nostra analisi (Fig.50), emerge ancora più chiaramente la modalità di assegnazione ai due Clade dei diversi aplotipi individuati.

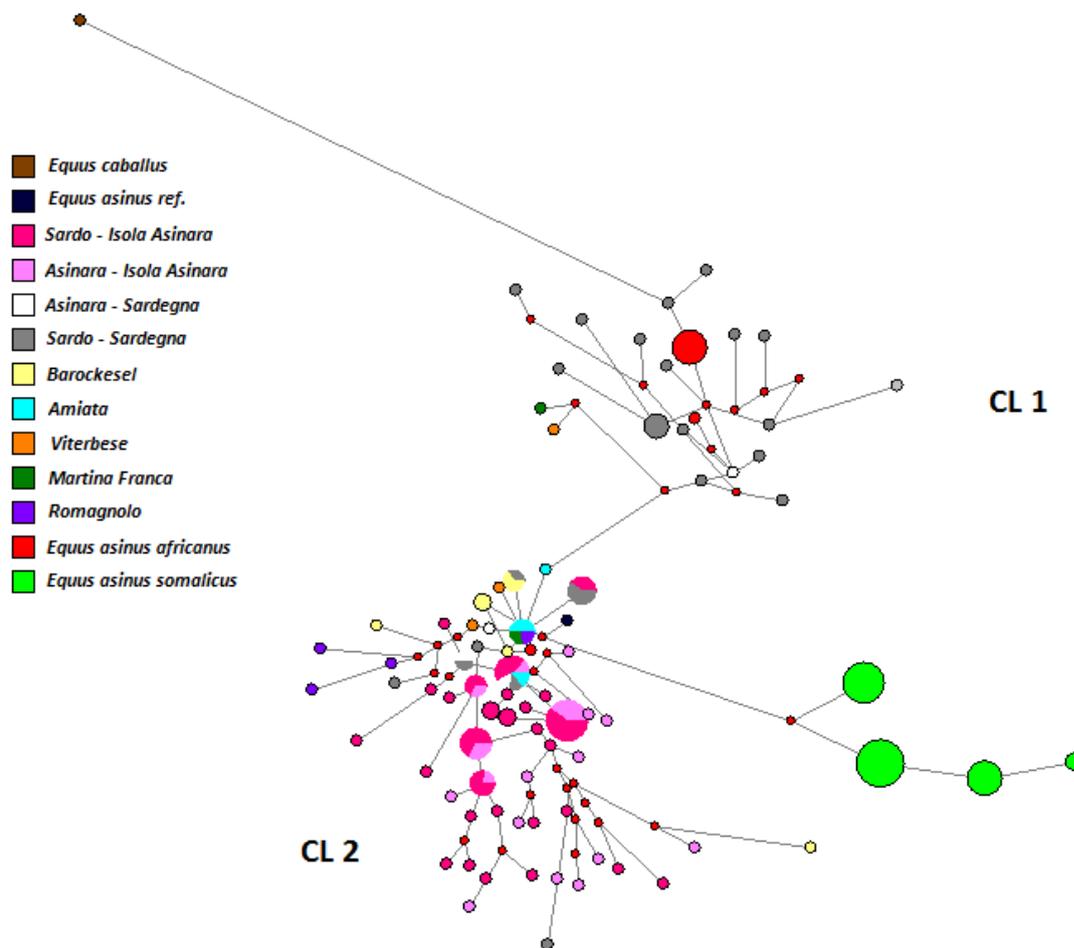


Fig.50. Median Joining Tree raffigurante la distribuzione nei due Clade mondiali degli aplogruppi di asino delle razze indagate (CL1, nubiano; CL2, somalo).

Anche in questo caso sono state utilizzate le sequenze di *Equus asinus africanus* e *Equus asinus somalicus* per la discriminazione dei due Clade. L'outgroup è sempre rappresentato dalla sequenza di *Equus caballus*.

Si può facilmente notare come tutti gli aplotipi dei soggetti dell'isola dell'Asinara (Sardi e Asinara indistintamente) ricadono esclusivamente all'interno del Clade2, nel quale si osserva anche la maggior parte di aplotipi delle razze italiane, quelli riscontrati nella razza Barockesel e alcuni aplotipi relativi ad asini di razza Sarda campionati in Sardegna.

Nel Clade1, invece, si osserva la maggior parte degli aplotipi dei soggetti di razza Sarda della Sardegna.

In definitiva, anche l'analisi mediante Median Joining Network ha confermato le osservazioni precedenti riguardo la diversa ripartizione dei soggetti della Sardegna e dell'Isola dell'Asinara nei due Clade e gli alti livelli di diversità aplotipica riscontrati.

CONCLUSIONI

La necessità di salvaguardare e valorizzare le razze asinine autoctone della Sardegna spinge il mondo della ricerca a svolgere continue indagini capaci di incrementare le conoscenze scientifiche e applicative, e fornire strumenti sempre più efficaci per la tutela e preservazione della biodiversità isolana.

La nostra indagine si colloca proprio in questo ambito di studio e ha voluto fornire un contributo per il conseguimento di tali obiettivi.

In particolare, i risultati ottenuti impiegando i marcatori F-ISSR, mai utilizzati precedentemente in questa specie, fanno ritenere che questa tipologia di marcatori possa essere un valido ausilio per lo studio della struttura genetica della popolazione asinina della Sardegna. I risultati da noi ottenuti, infatti, evidenziano come l'impiego dei tre marcatori F-ISSR consenta di discriminare efficacemente le razze autoctone della Sardegna (Sardo e Asinara) rispetto alle altre razze analizzate, nonostante non siano state rilevate differenze tra le due razze isolate. Queste osservazioni suggeriscono, tra l'altro, la possibilità di poter impiegare tali marcatori in analisi di routine con finalità di selezione e salvaguardia.

Ulteriori indagini, che prevedano un più ampio campionamento e l'impiego di un maggior numero di marcatori F-ISSR, consentiranno di conoscere ancora meglio la struttura genetica della popolazione asinina della Sardegna ed, eventualmente, permetteranno di rilevare le differenze genetiche tra due razze autoctone.

Le indagini genetiche condotte sul frammento della regione ipervariabile (HVSI) del DNA mitocondriale evidenziano la complessità dei rapporti filogenetici tra le due razze isolate, anche nel contesto generale delle razze asinine domestiche diffuse nel mondo.

Le differenze osservate tra soggetti di razza Sarda e Asinara risultano essere soprattutto legate all'origine geografica, ossia al sito di campionamento degli asini, anziché essere dovute alla diversità di razza. Infatti, nel confronto tra soggetti della Sardegna e soggetti dell'Isola dell'Asinara è stata osservata una evidente differenza aplotipica (indipendentemente dalla razza), mentre all'interno dell'isola dell'Asinara le due razze mostrano una elevata condivisione di aplotipi.

La differenza aplotipica tra gli asini campionati in Sardegna e quelli campionati sull'isola dell'Asinara è confermata anche dalla distribuzione di queste due popolazioni nel contesto più ampio dei due Clade mondiali (Clade1, denominato nubiano e Clade 2, denominato somalo): tutti i soggetti dell'isola dell'Asinara (indipendentemente dalla razza) ricadono nel Clade2, mentre la maggior parte dei soggetti campionati in Sardegna ricade nel Clade1.

E' da precisare che le analisi sul DNA mitocondriale esposte in questa tesi rappresentano solamente il primo risultato ottenuto nell'ambito di un più ampio progetto di analisi genetica mitocondriale svolto presso il Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università degli studi di Sassari e finanziato dal Parco nazionale dell'Asinara. Ulteriori indagini di approfondimento di questi risultati preliminari verranno successivamente condotte nell'ambito di tale progetto.

In conclusione, è auspicabile che questi risultati incoraggianti possano incentivare la prosecuzione di indagini scientifiche sempre più accurate sul patrimonio genetico asinino della Sardegna. Ciò avrà, inevitabilmente, anche delle ripercussioni positive sul comparto allevatorio isolano e sul complesso sistema di salvaguardia e valorizzazione della biodiversità della Sardegna

NOTE FINALI E RINGRAZIAMENTI

Questa tesi di Dottorato è stata realizzata grazie alla collaborazione scientifica di:

- AGRIS Sardegna - Agenzia Regionale per la Ricerca in Agricoltura, Servizio di ricerca per la qualità e la valorizzazione delle produzioni equine, che ha fornito preziose informazioni storiche e tecnico-scientifiche sulle razze asinine della Sardegna, ha consentito di realizzare i campionamenti su tutto il territorio regionale e ha reso disponibili i suoi laboratori per lo svolgimento di alcune delle principali analisi.
- Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio (DipNeT) dell'Università degli studi di Sassari, che svolto i campionamenti e le analisi genetiche riguardanti il DNA mitocondriale, nell'ambito di un più ampio progetto di indagine genetica sulla popolazione asinina dell'Isola dell'Asinara finanziato dal Parco Nazionale dell'Asinara.
- Parco Nazionale dell'Asinara, che ha consentito l'esecuzione dei campionamenti dei soggetti presenti nel territorio del Parco.

Un ringraziamento particolare va ai colleghi Dott. Gian Luca Dedola e Dott.ssa Antonella Useli per l'indispensabile contributo tecnico fornito in ogni fase della sperimentazione e per l'elevata professionalità dimostrata nell'organizzazione e nella realizzazione del progetto di ricerca.

Si ringraziano il Prof. Sergio Ledda, Direttore della Scuola di Dottorato in Scienze Veterinarie, e il Dott. Raffaele Cherchi, Direttore Generale dell'Agenzia AGRIS Sardegna per il fondamentale supporto alla realizzazione della sperimentazione .

Un ultimo ringraziamento va a tutte le persone che, in vario modo, hanno fornito il loro contributo alla realizzazione del progetto e della tesi: Dott. Andrea Fraghì, Dott. Piero Fozzi , Sig. Giovanni Fresu (AGRIS Sardegna), Dott. Massimo Scandura, Dott. Marco Casu e Dott. Piero Cossu (DipNeT).

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV., Asini della Sardegna: la prospettiva di un laboratorio di esperienze. Atti del secondo convegno nazionale sull'asino. 21-24 settembre 2006.
- AA.VV., Atti del Primo convegno nazionale sull'asino – Ce.Mi.Vet. Grosseto- 28 e 29 maggio 2005.
- AA.VV., Bulletin de la Société Nationale d'Acclimatation de France – 1888.
- AA.VV., Breve di Villa di Chiesa – 1327.
- AA.VV., Carta de Logu – Riproduzione della edizione quattrocentesca conservata nella Biblioteca universitaria di Cagliari / a cura di Antonina Scanu - 1991 (Sassari : TAS).
- AA.VV., Donkey breeds in Europe – inventory, description, need for action, conservation. SAVE Foundation – 2008.
- AA.VV., Über Land und Meer , n.50 -1877.
- A.I.A. Associazione Italiana Allevatori - Registro Anagrafico delle razze equine ed asinine a limitata diffusione.
- Alhaique F., Marshal F., Preliminary report on the Jebel Gharbi fauna from site SJ – 00 – 56 (2000 and 2002 excavations). Africa LXIV, 3-4, 2009, pp. 498-507.
- Aranguren-Méndez J., Jordana J., Gómez M., Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. Genet. Sel. Evol. 33 (2001) 433-442.
- Aranguren-Méndez J., Gómez M., Jordana J., Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. Heredity (2002) 89,207-211.
- Aranguren-Méndez J., Jordana J., Gómez M., Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. J. Anim. Breed. Genet. 119 (2002), 256-263.
- Aranguren-Méndez J., Beja-Pereira A., Avellanet R., Dzama K., Jordana J., Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (Equus asinus). J. Anim. Breed. Genet. 121 (2004), 319-330.
- Azuni D.A., Essai sur l'histoire géographique, politique et naturelle du Royaume de Sardaigne - 1798.
- Azuni D.A., Historie géographique, politique et naturelle de la Sardaigne, Vol. II – 1802.
- Bakkappa S., Gopal S., Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers for Assessment of Genetic Polymorphism and Phylogenetic Relationships of the Silkworm Bombyx mori L. – Annual Research and Review in Biology 4(6): 897-905, 2014.
- Baldino B., Carenti G., Grassi E., Orgolesu T., Secchi F., Wilkens B., L'economia animale dal

medioevo all'età moderna nella Sardegna nord occidentale. *Sardinia, Corsica et Baleares antiquae* 01/2009; VI:103-155.

Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC, Richards MB., Mitochondrial portraits of human populations. *Genetics* 141:743-753 – 1995.

Barzacchi A., *Bollettino Ufficiale Nuova Serie*. Ministero dell'Agricoltura, Industria e Commercio. Divisione Industria. Sezione Pesca – 1905.

Beja-Pereira A., England P.R., Ferrand N., Jordan S., Bakhiet A.O., Abdalla M.A., African origins of the domestic donkey. *Science* vol.304 18 June 2004.

Blench R., *The history and spread of donkeys in Africa*. - Donkeys, people and development 2000.

Blench R. M., *A history of donkeys, wild asses and mules in Africa. The origins and development of African livestock. Archaeology, genetics, linguistics and ethnography.* pp.339-354 (2000).

Blench R., de Jode A., Gherzi E., *Donkeys in Nigeria: history, distribution and productivity. Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA).* 210-219. The Netherlands: CTA. – 2004.

Blench R., *Wild asses and donkeys in Africa: interdisciplinary evidence for their biogeography, history and current use.* Donkey Conference - SOAS 2012.

Beretti V., Zanon A., Soffiantini C.S., Sabbioni A., Preliminary results about morphological and demographic traits of Romagnolo donkey. *Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma* (vol. XXV, 2005) pag. 131-144.

Bomboi G., Cubeddu G., Sau F., Marongiu A., Pintori G., Livelli eritrocitari di G6PD e GSH in asini bianchi dell'Asinara . *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie* vol. XLV – Altavilla Milicia 25-28 settembre 1991.

Bordonaro S., Guastella A.M., Criscione A., Genetic diversity and variability in endangered pantesco and two other sicilian donkey breeds assessed by micro satellite markers. *The Scientific World Journal* vo. 2012. – 2011.

Bordonaro S., Guastella A.M., Criscione A., Zuccaro A., Marletta D., D'Urso G., Popolazioni asinine siciliane: caratterizzazione genetica mediante marcatori micro satelliti. – 2011.

Brehm A.E., *Brehms Thierleben Allgemeine Kunde des Thierreichs* vol. XII. Bibliographisches Institut 1925.

Bresciani A., *Dei costumi dell'isola di Sardegna comparati cogli antichissimi popoli orientali* Vol. I e II – 1850.

Bruford M.W., *Molecular Approaches to understanding animal domestication: what have we learned so far?* World Poultry Science Association, 4th European Poultry Genetics Symposium,

Dubrovnik, Croatia, 6-8 October, 2005: No.10.

Bulla C., Pilo G., Cannas A., Rassu S.P.G., Caratteristiche morfologiche e produttive dell'asino sardo selvatico dell'Asinara e domestico della Sardegna. Tesi -2013.

Cantagalli C., Ledda S., Pittalis A., Osservazione etologiche della popolazione ferale degli asini grigi nel Nord dell'Asinara. Tesi – 2003.

Cappai M.G., Picciau M., Pinna W., An integrated approach towards the nutritional assessment of the Sardinian donkey: a tool for clinical nutritionists. Italian Journal of Animal Science 2013, vol. 12:e29.

Cappai M.G., Picciau M., Nieddu G., Sogos I., Cherchi R., Pinna W., Cutaneous metabolic pathway of tyrosine as a precursor to melanin in Asinara's white donkey, *Equus asinus* L., 1758. Italian Journal of Animal Science 2015; volume 14:3976.

Carcangiu V., Vacca G.M., Cubeddu G.M., Bini P.P., Rilievi ematici in asini bianchi dell'Asinara sottoposti a trattamento per il controllo delle ectoparassitosi. – J.Mt. Ecol., 7 (suppl.)2003: 207-210.

Carenti G., Wilkens B., La colonizzazione fenicia e punica e il suo influsso sulla fauna sarda. Sardinia, Corsica et Baleares Antiquae-An Internationa Journal of Archaeology-Vol IV, 2006.

Casalis G., Dizionario geografico-storico-statistico-commerciale degli stati di S.M. il Re di Sardegna - 1833-1856.

Casas N., Tratado de la cria del caballo, mula y asno y principios generales de equitacion Vol.II – 1843.

Casu M., Maltagliati F., Cossu P., Lai T., Curini Galletti M., Castelli A., Commito J.A., Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 325 (2005) 46– 54.

Casu M., Casu D., Lai T., Cossu P., Curini-Galletti M., Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. Marine Biology (2006) 149: 1163–1174.

Casu M., Casu D., Lai T., Cossu P., Curini-Galletti M., A molecular tool for genetic surveys in the red coral (*Corallium rubrum*): An Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) perspective. Biochemical Systematics and Ecology 36 (2008) 77-83.

Casu M., Lai T., Curini-Galletti M., Ruiu A., Pais A., Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 368 (2009) 147–152.

Cecchi F., Ciampolini R., Ciani E., Matteoli B., Mazzanti E., Tancredi M., Presciuttini S., Demographic genetics of the endangered Amiata donkey breed. *Italian Journal of Animal Science* vol. 5, 387-391, 2006.

Cervantes Saavedra M., *El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha, Part.II, Vol. V – 1836.*

Cetti F., *Storia naturale di Sardegna (Vol.I) I quadrupedi di Sardegna – 1774.*

Chen J., Sun Y., Manglai D., Min L., Pan Q., Maternal genetic diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. *Livestock Science* 131 (2010) 272-280.

Chen S.Y., Zhou F., Xiao H., Sha T., Wu S.F., Zhang Y.P., Mitochondrial DNA diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. *Anim Genet.* 2006 Aug;37(4):427-9.

Cherchi R., Cossu I., Pau S., Bertulu A., Pilo G., Cherchi M., Esperienze preliminari di seminologia nelle razze asinine: asino sardo e asino dell'Asinara. *Atti 7° congresso nazionale SIVE – Salsomaggiore Terme – 2001.*

Cherchi Paba F., *Evoluzione storica dell'attività industriale agricola caccia e pesca in Sardegna. Vol. I-IV, R.A.S. – 1974.*

Ciampolini R., Cecchi F., Mazzanti E., Ciani E., Tancredi M., De Sanctis B., The genetic variability analysis of the Amiata donkey breed by molecular data. *Italian Journal of Animal Science* vol.6 (suppl.1), 78-80, 2007.

Colli L., Perrotta G., Negrini R., Bomba L., Bigi D., Zambonelli P., Verini Supplizi A., Liotta L., Aimone-Marsan P., Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds: the case of the Italian autochthonous donkeys. *Anim Genet.* 2013 Feb;44(1):69-78.

Colombani B., Su di un caso di albinismo totale di un asino di razza sarda – Istituto di zootecnia generale – *Annali facoltà med. Vet. Pisa* 16: 76-81 – 1963.

Coluccio P., Passantino A., Lai M.G., Russo M., Conte F., Cubeddu G.M., White donkey (*Equus asinus* var *albina*) protection in National park of Asinara's island (Italy): clinical observations and legislative considerations. *17° Scientific Conference on Animal Protection and Welfare – Brno (Czech Republic), 21 - 22 September 2010.*

Contu C., Cossu I., Rosati I., *Studio dell'attività ovarica in asine sarde e dell'Asinara - Tesi – 2007.*

Corona A., Dattena M., Mara L., Cossu I., Impiego delle biotecnologie della riproduzione per la salvaguardia di razze autoctone equine della Sardegna: studio preliminare. *XII Congresso SIVE – 2006.*

Cosseddu G.M., Fraghi' A., Mura L., Carta A., Cherchi R., Pau S., Genetic relationships among donkey populations living in Sardinia. An analysis using molecular markers. *Ippologia, Anno 12,*

n.2, Giugno 2001.

Cossu I., Cherchi R., Pau S., Bertulu A., Embryo-transfer in typical donkeys of Sardinia. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 21, n.8, 2001.

Cozzi M.C., Valiati P., Cherchi R., Strillacci M.G., Corona A., Pertica G., Gandolfi B., Polli M., Longeri M., Guidobono Cavalchini L., Mitochondrial DNA variability in four Italian donkey breeds (*Equus asinus*). *New findings in equine practice* 31 ottobre 2008 – Druento.

Cristofalo C. Cancedda M. Cozzi M.C. Valiati P., Salvaguardia della variabilità genetica: analisi del polimorfismo ematico di una popolazione di asini sardi. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Volume XLVIII. Giardini Naxos, 30 settembre-1 ottobre 1994.

Cubeddu G.M., Bini PP., Floris B., Carcangiu V., Bomboi G., Pintori G., Hematologic parameters of the white donkeys of Asinara. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1991 Jun; 67(6): 577-84.

Cubeddu G.M., Pintori G., Fadda Manlio, Pinna Parpaglia M.L., Il patrimonio zootecnico dell'Isola dell'Asinara: principali patologie rilevate negli ultimi 5 anni. *Biogeographia* Vol.XVIII – 1995.

Cubeddu G.M., Asinello Bianco – *Rivista Sardegna e dintorni* – Anno III - Numero 5 – Novembre/Dicembre 1999.

Cubeddu G.M., Pintori G., Cocco R., Pinna Parpaglia M.L., Pilo G.A., Animal welfare and protection in Asinara Island national park– 3° Congress of European Society of Agricultural and Food Ethics – Firenze, 3-5 Ottobre 2001.

D'Austria-Este F., *Descrizione della Sardegna (1812)* – Edizioni della Torre – 1993.

Dalli C., *The rise and fall of the donkey: the Central Mediterranean islands*. SOAS 2005.

De La Marmora A., *Viaggio in Sardegna I parte* – Edizioni Il Nuraghe – 1926.

De La Vega D., *Conciones et exercitia pia, super Evangelia Dominicalia totius Anni* - Vol. I – 1610.

De Saint-Severin ., *Souvenirs d'un séjour en Sardaigne pendant les années 1821 et 1822* – 1827.

Di Rosa A.R., Amato C., Zumbo A., Morphological traits of the “Pantesco” donkey. *Italian Journal of Animal Science* vol.6 (suppl.1), 2007.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider, Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50. (2005).

Fahmi A. I. and Al-Otaibi S. A., Genetic Variation in Captive Herd of Arabian Oryx Using RAPD and ISSR Markers. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(27), pp. 5251-5262, 15 June, 2011.

Farae I.F., *Chorographie Sardiniae, Lib.II* – 1580.

Feofilov A.V., Bardukov NV, Glazko VI., Gene pool differentiation between Altaic and trotting

- horse breeds inferred from ISSR-PCR marker data. *Genetika*. 2011 Sep;47(9):1230-5.
- Ferrari G.C., Relazione del campo di prigionieri colerosi all'isola dell'Asinara nel 1915-16 – 1929.
- Forcellini E., *Totius latinitatis lexicon*, Lib.III- a cura di Facciolati G. – 1828.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. – 2002.
- Fresi C., Pala D., Bogliani G., *Alcuni aspetti eco-etologici degli asini rinselvatichiti di capo caccia (Alghero) – 1993*
- Fuos J., *Nachrichten aus Sardinien von der gegenwartigen Verfassung dieser Insel – 1780*.
- Geigl E.M., Grange T., *Eurasian wild asses in time and space: Morphological versus genetic diversity. Annals of Anatomy* 194 (2012) 88-102.
- Glazko V., *An attempt at understanding the genetic basis of domestication. Animal Science Papers and Reports* vol. 21 (2003) no. 2, 109-120.
- Glazko V., *Divergence of domestic and wild species on different genome elements. Journal of Agrobiology*, 25: 41-43, 2008.
- Guastella A.M., Zuccaro A., Bordonaro S., Criscione A., Marletta D., D'Urso G. *Genetic diversity and relationship among the tree autochthonous Sicilian donkey populations assessed by micro satellite markers. Italian Journal of Animal Science* vol.6 (Suppl. 1), 2007.
- Guastella A.M., Zuccaro A., Criscione A., Marletta D., Bordonaro S., *Genetic analysis of Sicilian autochthonous horse breeds using nuclear mitochondrial DNA markers. - J Hered.* 2011 Nov-Dec;102(6):753-8.
- Guillot G., Leblois R., Coulon A., Frantz A.C., *Statistical methods in spatial genetics. Mol Ecol* 18:4734-56 - 2009.
- Gutiérrez J.P., Marmi J., Goyache F., Jordana J., *Pedigree information reveals moderate to high levels of inbreeding and a weak population structure in the endangered Catalanian donkey breed. J.Anim.Genet.* 122 (2005) 378-386.
- Hall T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98. 1999.
- Holsinger K.E., Lewis P.O., Dipak D., *A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. EEB Articles – 2002*.
- http://www.eurekalert.org/pub_releases/2004-06/uadb-tfd062304.php The first domesticated donkey was born in Africa.

<http://www.aia.it/>

<http://www.allanimal.org/article.php?n=51> DNA pilot study of the miniature Mediterranean donkey.

<http://www.agraria.org/>

<http://archaeology.about.com/od/domestications/qt/donkeys.htm> The Domestication History of Donkeys (*Equus asinus*). History of the Domestication of Donkeys.

<http://www.corfole.com/> Il levante e il legame con Stintino- Corriere Fontanabuona e Levante.

<http://www.donkeybreedsociety.co.uk/>

http://www.donkey-mule.org.nz/Register/Medd_Form/Mini_history.pdf The history of the Miniature Mediterranean Donkey.

<http://www.fao.org>

<http://www.istat.it>

<http://www.miniature-donkey-assoc.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://www.parcoasinara.org/>

<http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&c=3679&s=44930&v=2>

<http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=443&s=44929&v=2&c=3679>

<http://www.sardegnaicultura.it/>

<http://www.sardegnaigitalibrary.it/>

<http://www.weisse-barockesel.at/>

[Ibanez G., Cadiz Phenicia, Vol.I – 1805.](#)

Ivankovic A., Caput P., Mioc B., Pavic V., The phenotype features of donkeys in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 65, No. 2, 2000 (99-105).

Ivankovic A., Kavar T., Caput P., Mioc B., Pavic V., Dovc P., Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. International Society for Animal Genetics, *Animal Genetics*, 33, 169-177 – 2002.

Jordana J., Folch P., Sanchez A. Genetic variation (protein markers and microsatellites) in

endangered Catalanian donkeys. *Biochemical Systematics and Ecology* 27 (1999) 791-798.

Jordana J., Folch P., Aranguren A. Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed. *J. Anim. Breed. Genet.* 118 (2001), 57-63.

Kimura B., Marshall F.B., Chen S., Rosenbom S., Moehlman P.D., Tuross N., Sabin R.C., Peters J., Barich B., Yohannes H., Kebede F., Teclai R., Beja-Pereira A., Mulligan C.J., Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society* - 2011.

Lai T., Casu M., Valdesalici S., Castelli A., Maltagliati F., Gli ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) come strumento molecolare per l'identificazione tassonomica di ciprinodontiformi mediterranei. XV Congresso della Società Italiana di Ecologia – Torino 2005.

Leclerc Buffon G.L., Roig G., *Los tres reinos de la naturaleza o museo pintoresco de historia natural*, Vol.II – 1853.

Lei C-Z, Ge Q-L, Zhang H-C, Liu R-Y, Zhang W., Jiang Y-Q, Dang R-H, Zheng H-L, Hou W-T, Chen H., African maternal origin and genetic diversity of Chinese domestic donkeys. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* vol. 20, no. 5:645-652 – May 2007.

Liotta L., Negrini R., Fontanesi L., Siclari A., Arcudi D., D'Alessandro E., Genetic variability of Calabrese donkeys by micro satellite analysis. *Italian Journal of Animal Science* vol.10:s1, 2011.

Lucilio G., *Saturae*, lib. VI - in C. *Lucilii Carminum reliquiae*, a cura di Marx Friedrich – 1904.

Luikart G., England P.R., Tallmon D., Jordan S., Taberlet P., The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat Rev Genet* 4:981-94 – 2003.

Madao M., *Dissertazioni storiche, apologetiche critiche delle Sarde Antichità* Vol.I – 1792.

Maltagliati F., Casu M., Lai T., Iraci Sareri D., Casu D., Curini Galletti M., Cantone G., Castelli A., Taxonomic distinction of *Ophelia barquii* and *O. bicornis* (Annelida: Polychaeta) in the Mediterranean as revealed by ISSR markers and the number of nephridiopores. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* (2005), 85, 835-841.

Marcuzzi G., Vannozzi A., *L'origine degli animali domestici - Edagricole* – 1981.

Masseti M., *Uomini e (non solo) topi* - Firenze University Press – 2008.

Matassino D., Bramante A., Cecchi F., Ciani F., Incoronato C., Occidente M., Pasquariello R., Santoro L., Ciampolini R. Comparison of genetic diversity between 'Amiata Donkey' genetic type and donkey autochthonous population from Lazio. 62° annual meeting EAAP Norway - 2011.

Matassino D., Cecchi F., Ciani F., Incoronato C., Occidente M., Santoro L., Ciampolini R., Genetic diversity and variability in two Italian autochthonous donkey genetic types assessed by microsatellite markers. *Italian Journal of Animal Science* 2014; vol. 13:3028.

Mengozi G., de Berardinis T., Guidi G., de Giovanni C., Comparison between five Italian donkey breeds by means of some blood markers (Sardinian, Ragusani, Amiatini, Gubbio and Asinara). In: Current status of equine blood typing –pg 91-98 - Ozieri 1982.

Metzker M.L., Sequencing technologies - the next generation. Review Article. Nature Reviews Genetics 2010 Jan;11(1):31-46.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F., A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research Volume 16 Number 3 – 1988.

Mimaut M., Histoire de la Sardaigne, ou La Sardaigne ancienne et moderne, Vol. II- 1825.

Mitochondrial DNA analysis of donkeys from Bonaire Island – Texas A&M University - Texas Veterinary Medical Center.

Mullis, K.B., F. Falloona., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335 – 1987.

Nagaraju J., Kathirvel M., Subbaiah E. V., Muthulakshmi M., Kumar L. D., FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping. Molecular and Cellular Probes (2002) 16, 67–72.

Nonio M., De compendiosa doctrina per litteras ad filium, Lib. II, a cura di Gerlach. Fr.Dor. e Roth Car. Lud – 1842.

Paddeu A., Cubeddu G.M., Gli equidi (cavalli e asini) dell'isola dell'Asinara – Tesi – 2008.

Pais E., Storia della Sardegna e della Corsica durante il periodo romano – Vol.II - 1923.

Peakall R., Smouse P.E., Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6:288-95 – 2006.

Pellecchia M., Colli L., Bigi D., Zambonelli P., Verini Supplizi A., Liotta L., Negrini R., Ajmone Marsan P., Mitochondrial DNA diversity of five Italian autochthonous donkey breeds. Italian Journal of Animal Science vol.6 (Suppl. 1), 2007.

Pesce A., L'Asino – Dalle origini ai nostri giorni. Rivista di agraria. N.147 1 giugno 2012.

Perez-Pardal L., Grizelj J., Traore A., Cubric-Curik V., Arsenos G., Dovenski T., Markovic B., Fernandez I., Cuervo M., Alvarez I., Beja-Pereira A., Curik I., Goyache F., Lack of mitochondrial DNA structure in Balkan donkey is consistent with a quick spread of the species after domestication. Anim Genet. 2014 Feb;45(1):144-7 2014 Feb;45(1):144-7.

Perrot N., L'Afrique de Marmol – 1667.

Pinna W., Vacca G.M., Lai P., Rilievi etno-demografici sull'asinello bianco dell'Asinara – Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie – Stresa, 27, 28, 29 settembre 1990.

Pinna W., Cappio Borlino, Vacca G.M., Lai Paolino, Rilievi somatometrici sugli asinelli bianchi dell'Asinara – Atti IX Congresso nazionale ASPA, poster, volume I, Roma 3-7 giugno 1991.

Pinna W., Cappio Borlino A., Vacca G.M., Lai G., Morphology of Adult white donkeys of Asinara – Boll.Soc.It.Biol.Sper 1993 n.10 – vol. LXIX – Idelson – Napoli.

Pinna W., Vacca GM., Lai P., Cappio Borlino A., Morphometric analysis of Sardinian breed donkeys. Boll. Soc.Ital.Biol.Sper. 1994 May-Jun; 70(5-6): 171-7.

Pinna W., Calaresu G., Vacca G.M., Scano G., Orrù A., Deiana G, Livelli sierici di progesterone e 17- β -estradiolo in asine bianche dell'Asinara durante il periodo degli accoppiamenti – III Convegno Nazionale dei Biologi della Selvaggina – Bologna 9-11 febbraio 1995.

Pinna W., Vacca G.M., Cubeddu G.M., Pintori G., Andamento demografico e principali patologie degli asinelli bianchi nell'isola dell'Asinara durante il quinquennio 1989-1993 – Biogeographia Vol. XVIII – 1995.

Pinna W., Vacca G.M., Cubeddu G.M., Pintori G., Garippa G., Salvaguardia degli asinelli bianchi dell'Asinara: risultati di un intervento di controllo delle parassitosi – Suppl. Ric. Biol. Selvaggina XXIV (1996): 105-110.

Pinna W., Todde P., Cosseddu G.M., Iannelli P., Moniello G., Gli asinelli bianchi dell'Asinara: una razza di animali albinici? – IV Congresso Nazionale Biodiversità – Alghero 8-11 settembre 1998.

Pinna W., Cosseddu G.M., Moniello G., Zimdars C., L'asinello bianco dell'Asinara: una razza antica o recente di *Equus asinus*? In: Isola dell'Asinara: l'ambiente, la storia, il parco. Ed Poliedro, Nuoro, 1998.

Pinna W., Cosseddu G.M., Moniello G., Genetic analysis of the Sardinian donkey breed using microsatellites. Preliminary results. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie - 1999.

Pinna W., Olek K., Zimdars C., Cosseddu G.M., Moniello G., Analisi genetica preliminare, mediante microsatelliti, della popolazione degli asinelli bianchi dell'Asinara – Atti 2° convegno regionale sullo studio, conservazione e gestione della fauna selvatica in Sardegna, Oristano 12-14 marzo 1999.

Pinna W., Todde P., Cosseddu G.M., Moniello G., and Solarino A., Tyrosinase activity and ocular characteristics in Asinara White Donkeys – 50 th annual meeting of the EAAP, Zurich, Switzerland 22-26 August 1999.

Pinna W., Moniello G., Mura A., Infascelli F., Nutritional and metabolic status in the Sarda breed donkey. 51° Annual meeting of European Association for Animal Production - 2000.

Plinio C.S., *Naturalis Historia* – Libri XXXVII *Historiae Mundi* Ed. Chouet 1615.

Pritchard J.K., Wen W., *Documentation for structure software: version 2.3* University of Chicago Press, Chicago, IL, USA – 2002.

Rizzi R., Tullo E., Cito A.M., Caroli A., Pieragostini E., Monitoring of genetic diversity in the endangered Martina Franca donkey population. *Journal of Animal Science* 2011, 89:1304-1311.

Romagnoli A., Mengozzi G., L'Asino dell'Asinara – Proceedings III international Seminary “Current status of equine blood typing” pg 47-51 – Ozieri 22 maggio 1982.

Rosenbom S, Costa V., Al-Araimi N., Kefena E., Abdel-Moneim A.S., Abdalla M.A., Bakhiet A., Beja-Pereira A., Genetic diversity of donkey populations from the putative centers of domestication. *Anim Genet.* 2015 Feb;46(1):30-6.

Rosenbom S., Costa V., Chen S., Khalatbari L., Yusefi G.H., Abdukadir A., Yangzom C., Kebede F., Teclai R., Yohannes H., Hagos F., Moehlman P.D., Beja-Pereira A., Reassessing the evolutionary history of ass-like equids: Insights from patterns of genetic variation in contemporary extant populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85 (2015) 88–96.

Rossel S., Marshall F., Peters J., Pilgram T., Adams M.D., O'Connor D., Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *PNAS* March 11, 2008 vol.105 no.10 3715-3720.

Royo L.J., Alvarez I., Beja-Pereira A., Molina A., Fernandez J., Jordana J., Gomez E., Gutierrez J.P., Goyache F., The origins of iberian horses assessed via mitochondrial DNA. *Journal of Heredity* 2005;96(6):663-669.

Satta-Branca A., *Giornale della antica Sardegna* – 1968.

Smyth W.H., *Sketch of the present state of the Island of Sardinia* – 1828.

Soddu A., *I Malaspina e la Sardegna – Documenti e testi dei secoli XII-XIV* – CUEC – 2005.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipksi A., Kumar S., MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729 – 2013.

Tautz D, Rentz M., Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12: 4127-4138 – 1984.

Tennant R., *Sardinia and its resources* – 1885.

Tyndale J.W., *The Island of Sardinia Vol.I* – 1849.

Utzeri V. J., Bertolini F., Ribani A., Schiavo G., Dall'Olio S., Fontanesi L., The albinism of the feral Asinara white donkeys (*Equus asinus*) is determined by a missense mutation in a highly conserved position of the tyrosinase (TYR) gene deduced protein. *Animal Genetics* 2015. Article first published online: 19 NOV 2015.

Vacca G.M., Pinna W., Manca M., Lai P. Parametri ematochimici dell'asino di razza Sarda. *Atti della*

Società Italiana delle Scienze Veterinarie. Volume XLVIII. Giardini Naxos, 30 settembre-1 ottobre 1994.

Vacca G.M., Cubeddu G.M., Carcangiu V., Ghibellini A., Bini P.P. – Profilo metabolico di asini bianchi dell'Asinara nel primo anno di vita- IV Congresso Nazionale Biodiversità – Alghero 8-11 Settembre 1998.

Valery, Voyages en Corse, a l'île d'Elbe, et en Sardaigne, Vol .II – 1837.

Vanzi B., Memorie ippiche Sardegna 1914-1923 – Estratto dai n. 7,8,9,10 de "Il Cavallo Italiano" – 1957.

Vila' C., Leonard J.A., Beja-Pereira A., Genetic Documentation of Horse and Donkey Domestication. Da Documenting domestication : new genetic and archaeological paradigms. - Melinda A.Zeder - Chapter 24. – 2006.

Vilstrup J.T., Seguin-Orlando A., Stiller M., Ginolhac A., Raghavan M., Nielsen S. C. A., Weinstock J., Froese D., Vasiliev S.K., Ovodov N.D., Clary J., Helgen K. M., Fleischer R.C., Cooper A., Shapiro B., Orlando L., Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids . Plos One – February 2013 – Vol. 8 – Issue 2.

Voronkova VN, Tsedev T, Sylimova GE., Comparative analysis of the informativeness of ISSR markers for estimating genetic diversity of horse breeds. Genetika. 2011 Aug;47(8):1131-4.

Vranova G., Alloggio I., Qablan M., Vyskocil M., Baumeisterova A., Sloboda M., Putnova L., Vrtkova I., Modry D., Horin P., Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European, Asiatic and African domestic donkeys. Infections, Genetics and Evolution 11 (2011) 1136-1141.

Vuiller M.G., Le tour du monde Vol.II – 1891.

Zedda M., Gli animali della necropoli di S'Elighe Entosu (Usini): analisi dei resti di vertebrati rinvenuti nelle domus de janus III e IV. In: Usini, ricostruire il passato. Delfino Ed., 2010, 165-172.

Wade C.M. et al., Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. Science vol. 326 - 2009.

Walasek O.F., Margoliash E., Trasmission of the Cytochrome c Structural gene in Horse-Donkey crosses. The Journal of Biological Chemistry vol.252, Issue of February 10, pp. 830-834 - 1977.

Wallner B., Piumi F., Brem G., Muller M., Achmann R., Isolation of Y chromosome-specific microsatellites in the horse and cross-species amplification in the genus Equus. Journal of Heredity 2004: 95(2):158-164.

Warmuth V. et al., Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian

steppe. PNAS , May 22, 2012, vol. 109, no. 21, 8202-8206.

Weinstock J., Willerslev E., Sher A., Tong W., Ho S.Y.W., Rubenstein D., Storer J., Burns J., Martin L., Bravi C., Prieto A., Froese D., Scott E., Xulong L., Cooper A., Evolution, Systematics, and Phylogeography of Pleistocene horses in the new world: a molecular perspective. PLoS Biology, August 2005, vol.3, Issue 8, e241 .

Wenjin Z., Yongmei S., Yanfang L., Jing N., Jianhua W., Microsatellite polymorphism analysis of Yang Yuan Donkey in China. Journal of Animal and Veterinary advances 12 (7): 795-797, 2013.

Wilkins B., Delussu F., Wild and domestic mammals in holocenic Sardinia. The new panorama of animal evolution-Proceedings XVIII International Congress of Zoology-2003.

Wilkins B., Archeozoologia. Il mediterraneo, la storia, la Sardegna. Ed. Democratica Sarda. Sassari – 2012.

Xu, X.; Gullberg, A.; Arnason, U., The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs. J. Mol. Evol. 43: 438–446. – 1996.

Yang,B.H., Sun,W.L., Liu,J.B., Liang,C.N. and Guo,J. Origin and genetic diversity of Chinese domestic donkeys using mtDNA D-loop.2006. Non pubblicato.

Yan Sun, Qiang Jiang, Chunhong Yang, Xiuge Wang, Fang Tian, Yinchao Wang, Yong Ma, Zhihua Ju, Jinming Huang, Xiangshan Zhou, Jifeng Zhong, Changfa Wang, Characterization of complete mitochondrial genome of Dezhou donkey (*Equus asinus*) and evolutionary analysis. Curr Genet. 2015 Nov 2.

Yasodha R., Kathirvel M., Sumathi R., Gurusurthi K., Sunil Archak, Nagaraju J., Genetic analyses of Casuarinas using ISSR and FISSR markers. Genetica 122: 161–172, 2004.

Zarbà A.S., Maltese G., L'evoluzione dei flussi commerciali di asini in Italia. L'Informatore Agrario. Ottobre 2006.

Zeder M.A., Emshwiller E., Smith B.D., Bradley D.G. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. Trends in Genetics vol.22 no.3 March 2006.

Zeder M.A., Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. PNAS, August 19,2008, vol.105, no.33, 11597-11604.

Zietckiewicz, E., Rafalsky, A. & Labuda, D., Genome fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176-83 - 1994.

Allegato 1

ASINO SARDO

STANDARD DI RAZZA

1) **AREA DI ORIGINE:** Regione Sardegna.

2) **ATTITUDINE:** soma, tiro, anticamente mola.

3) CARATTERI TIPICI:

a) **mantello:** sorcino con riga mulina crociata, bordo scuro delle orecchie; possono essere presenti zebbrature alla spalla, agli arti e ventre chiaro. Criniera scarsa e più scura del colore del mantello, coda lunga e con scarsi crini.

b) conformazione:

- Testa: pesante, quadrangolare a profilo rettilineo, orecchie lunghe e dritte;
- Collo: corto;
- Spalla: dritta e corta;
- Garrese: poco pronunciato;
- Dorso: leggermente disteso, dritto;
- Lombi: forti e ben attaccati;
- Groppa: corta e lievemente inclinata;
- Petto: sufficientemente largo;
- Torace: stretto e basso;
- Arti: robusti;
- Andature: corte, poco elastiche, ma sicure;
- Appiombi: regolari;
- Piede: piccolo e duro.

c) **temperamento:** vivace.

d) **altre caratteristiche:** rustico e frugale.

4) DATI BIOMETRICI (espressi in cm.)

| | Maschi | Femmine |
|---------------------|----------|----------|
| altezza garrese | 80 - 110 | 80 - 110 |
| circ. minima torace | 137 | 137 |
| circ. stinco | 15 - 18 | 15 - 18 |

5) DIFETTI CHE COMPORTANO L'ESCLUSIONE DAL REGISTRO ANAGRAFICO:

- **Mantello:** diverso da quello tipico;
- **Occhi:** occhio gazuolo.
- **Altezza:** superiore a 110 cm.

ASINO DELL'ASINARA

STANDARD DI RAZZA

1) **AREA DI ORIGINE:** Isola dell'Asinara (Regione Sardegna).

2) **CARATTERI TIPICI:**

a) **mantello:** bianco con cute rosa e occhi rosa-celesti

b) **conformazione:**

- Testa: quadrangolare;
- Collo: corto;
- Spalla: dritta e corta;
- Garrese: poco pronunciato;
- Dorso: leggermente disteso, lievemente depresso;
- Lombi: forti e ben attaccati;
- Groppa: corta e lievemente inclinata;
- Petto: sufficientemente largo;
- Torace: stretto e basso;
- Arti: robusti;
- Articolazioni: spesse e larghe;
- Andature: corte;
- Appiombi: regolari;
- Piede: bianco, piccolo e poco resistente.

c) **altre caratteristiche:** rustico e frugale.

3) **DATI BIOMETRICI** (espressi in cm.)

| | Maschi | Femmine |
|----------------------|----------|----------|
| altezza al garrese | 80 - 105 | 80 - 105 |
| circonferenza torace | 100 | 100 |
| circonferenza stinco | 11 - 13 | 11 - 13 |

4) **DIFETTI CHE COMPORTANO L'ESCLUSIONE DAL REGISTRO ANAGRAFICO:**

- **Mantello:** diverso da bianco o con cute pigmentata;
- **Occhi:** occhi scuri.
- **Taglia:** diversa dallo standard o comunque superiore a 105 cm.

