

Le isole come capsule temporali per la conservazione della diversità genetica: Il caso del muflone dell'Isola del Giglio

Mario Barbato ¹, Marco Masseti ^{2*}, Monica Pirastru ³, Nicolò Columbano ⁴, Monica Scali ⁵, Rita Vignani ⁵
e Paolo Mereu ³

¹ Department of Animal Sciences, Food and Nutrition (DIANA), Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, via Emilia Parmense 84, 29122 Piacenza, Italy; mario.barbato@unicatt.it

² International Union for the Conservation of Nature Species Survival Commission (IUCN SSC), Rue Mauverney 28, 1196 Gland, Switzerland

³ Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Viale S. Pietro 43b, 07100 Sassari, Italy; pirastru@uniss.it (M.P.); pmereu@uniss.it (P.M.)

⁴ Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Via Vienna 07100 Sassari, Italy; ncolumbano@uniss.it

⁵ Department of Life Sciences, University of Siena, Via Aldo Moro 53100 Siena, Italy; monica.scali@unisi.it (M.S.); rita.vignani@unisi.it (R.V.)

* Corrispondenza: marcomasseti55@gmail.com

Abstract: L'uso di approcci di indagine multidisciplinari, che includono analisi biologiche, biogeografiche, storiche, morfologiche e genetiche, può essere utile per identificare e preservare la biodiversità. Il presente studio si concentra sulla caratterizzazione e la conservazione di una popolazione di mufloni (*Ovis gmelini musimon*) dell'isola mediterranea del Giglio. Forniamo i primi dati molecolari sulla popolazione del Giglio e la confrontiamo con i mufloni della Sardegna, dell'Elba e della Corsica utilizzando marcatori nucleari e mitocondriali. I nostri risultati suggeriscono che il muflone del Giglio ospita una variabilità genetica di probabile origine sarda, ma non rappresentata nell'attuale diversità dei mufloni sardi. Pur non presentando le caratteristiche tipiche di una specie aliena invasiva, il muflone del Giglio è sottoposto a eradicazione tramite abbattimento o cattura e sterilizzazione chirurgica. Le prove molecolari che riportiamo evidenziano come tali azioni stiano causando la perdita irrimediabile di varianti genetiche ancestrali del genere *Ovis*. Infine, sottolineiamo come sia necessario un approccio multidisciplinare per favorire la conservazione e la gestione delle popolazioni antropofile dei mammiferi mediterranei.

Parole chiave: muflone; conservazione; insularità; eradicazione; biodiversità

Citazione: Barbato, M.; Masseti, M.; Pirastru, M.; Columbano, N.; Scali, M.; Vignani, R.; Mereu, P. Islands as Time Capsules for Genetic Diversity Conservation: The Case of the Giglio Island Mouflon. *Diversity* **2022**, *14*, 609. <https://doi.org/10.3390/d14080609>

Editore accademico: Michael Wink

Ricevuto: 10 Luglio 2022

Accettato: 27 Luglio 2022

Pubblicato: 28 Luglio 2022

Nota dell'editore: MDPI rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e alle affiliazioni istituzionali.



Copyright: © 2022 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Il muflone tirrenico, *Ovis gmelini musimon* (Pallas, 1811), è un ungulato di medie dimensioni presente in Sardegna e Corsica, dove è stato introdotto dall'uomo nel Neolitico [1-4]. In queste isole del Mediterraneo, la specie è protetta dalla legge. Nel presente lavoro, seguiamo la definizione tassonomica della specie *Ovis gmelini* Blyth, 1841 [5,6]. A causa dell'intenso bracconaggio e della perdita di habitat, la popolazione sarda ha subito un pericoloso declino censuario nel corso del XX secolo, che si è protratto fino agli anni '70 [7], periodo in cui si stimava che sopravvivevano solo poche centinaia di individui [8,9].

Su iniziativa di alcune autorità italiane in campo zoologico (tra cui A. Ghigi, A. Toschi e R. Videsott), a metà degli anni Cinquanta un piccolo gruppo di mufloni fu trasferito all'Isola del Giglio (2.380 ettari), nell'Arcipelago Toscano, per scongiurare la prevista estinzione in Sardegna e Corsica [10-12]. Questa piccola popolazione era ospitata in una proprietà privata recintata di circa 90 ettari, sul promontorio del Franco (Figura 1A). Il nucleo iniziale si è formato nel 1955 con sette animali: quattro femmine e tre maschi, di cui un giovane maschio e due femmine raccolti in Germania "...da ceppi di Corso-Sardegna, importati per la prima volta in Ungheria intorno al 1800 e fortificati,

mantenendo la purezza della razza in Germania" [10]. Gli altri individui sono stati tutti raccolti da riserve in Sardegna. Gli animali hanno prosperato nel clima mediterraneo dell'Isola del Giglio e nel 1960-1961 hanno raggiunto i 24 individui. A causa di alcune breccie nella recinzione originaria, all'inizio degli anni '80 i mufloni hanno iniziato a essere avvistati al di fuori della riserva, prima nella parte settentrionale del promontorio del Franco e poi nella porzione sud-occidentale dell'isola (Figura 1B). Sebbene non esista una stima ufficiale delle dimensioni attuali della popolazione, le testimonianze aneddotiche suggeriscono una dimensione della popolazione compresa tra 24 e 96 individui [13]. Attualmente, il muflone del Giglio è oggetto di un progetto di eradicazione delle specie introdotte mediato dal governo locale [13]. Tuttavia, non sono stati intrapresi studi biologici ed ecologici precedenti, né valutazioni genetiche per valutare il valore di questa popolazione in termini di biodiversità. In questa sede, forniamo i risultati preliminari ottenuti dalla caratterizzazione genetica del muflone del Giglio attraverso l'indagine del DNA mitocondriale (mtDNA) e dei marcatori microsatelliti.

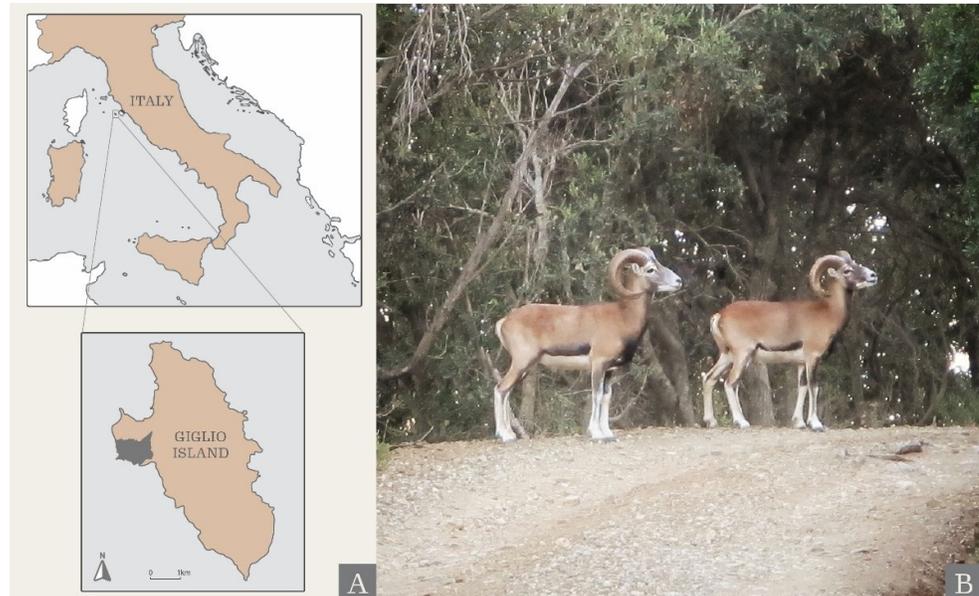


Figura 1. Posizione geografica dell'Isola del Giglio. **(A)** L'area grigio scuro rappresenta l'areale del recinto originario nel promontorio del Franco. **(B)** Due maschi adulti di muflone che vagano nel promontorio di Franco. Foto per gentile concessione di Amy Bond, 2021.

2. Materiali e metodi

Complessivamente sono stati campionati 24 esemplari di muflone, di cui 15 provenienti dall'Isola del Giglio, uno dall'Elba, sette dalla Sardegna e sette dalla Corsica. Gli individui sardi sono stati selezionati da uno studio precedente [14] per massimizzare la rappresentatività della diversità dei mufloni sardi e contrastare la piccola dimensione del campione. Inoltre, sono stati inclusi due individui di Sarda, una moderna razza domestica sarda. Il sangue periferico intero è stato raccolto da veterinari competenti dagli esemplari della Sardegna e della Corsica. Il campionamento non invasivo dei peli è stato effettuato su individui dell'Elba e del Giglio traslocati in riserve naturali situate nella Toscana continentale, in Italia. Il DNA genomico è stato estratto dal sangue e dai capelli utilizzando rispettivamente i kit GenElute Blood genomic DNA e GenElute Mammalian genomic DNA Minipreps (Merck), secondo il protocollo del produttore. La qualità del campione e la concentrazione del DNA sono state determinate con uno spettrofotometro ND-8000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

La coppia di primer CR1-CR2 (Tabella S2, Materiali Supplementari) è stata utilizzata per amplificare l'intera regione D-loop dell'mtDNA, seguendo il protocollo descritto da Satta e

colleghi. (2021). I prodotti di PCR sono stati purificati con un kit di estrazione su gel Montage (Merck Millipore), sequenziati mediante chimica di terminazione (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) e sottoposti a elettroforesi capillare su un analizzatore genetico ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). L'allineamento di sequenze multiple è stato eseguito con Bioedit v7.2.5 [15].

Il set di dati è stato esteso includendo 88 sequenze di *O. gmelini* recuperate da Satta e colleghi [14] per coprire meglio la distribuzione geografica della specie. Abbiamo incluso sequenze rappresentative di mufloni provenienti dalle isole di Sardegna (54) e Corsica (2) e dall'Europa continentale (3). Altre tre sequenze omologhe di uriali (*O. vignei*) sono state incluse come outgroup. I dati delle sequenze sono stati analizzati con DnaSP v6.10.03 per valutare la diversità genetica [16]. La relazione genetica tra gli aplotipi è stata studiata mediante una rete di giunzione mediana utilizzando PopART v1.750 [17]. Le distanze genetiche a coppie sono state stimate con il software MEGA v11 [18].

Per valutare la diversità e la struttura della popolazione, i campioni sono stati genotipizzati su 14 loci Simple Sequence Repeats (SSR) recuperati dalla letteratura [14]. I prodotti di amplificazione sono stati ottenuti secondo le indicazioni di Scali e colleghi [19] e sottoposti a calibrazione fine mediante elettroforesi capillare utilizzando un analizzatore di DNA ABI 3130 (Applied Biosystems). Il singolo campione dell'Isola d'Elba non è stato sottoposto ad analisi mirate alla popolazione. Per studiare la relazione ordinale tra popolazioni e individui, abbiamo eseguito un'analisi delle componenti principali (PCA) come implementato nel pacchetto R ade4 v1.7-19 [20]. Per ogni locus SSR, abbiamo valutato se un allele fosse riservato alla popolazione del Giglio piuttosto che condiviso tra le popolazioni.

3. Risultati

La reazione di sequenziamento della regione D-loop è fallita per sei campioni del Giglio, che sono stati quindi esclusi da ulteriori analisi. Il sequenziamento nucleotidico dei prodotti PCR ha fornito nove sequenze del Giglio, una dell'Elba e otto della Corsica di lunghezza eterogenea, compresa tra 630 e 1.180 nucleotidi (GB#ON960213-22). L'intero set di dati contava 109 sequenze. Le analisi sono state condotte sul dominio ipervariabile I della regione D-loop mitocondriale per stimare la variabilità genetica sul campione di popolazione disponibile. Tra i nove campioni del Giglio sono stati individuati due nuovi aplotipi, Hpt-6 trovato in otto campioni e Hpt-7 nel restante, separati da mutazioni a tre stadi, con diversità aplotipica $H_d = 0,222$ e diversità nucleotidica $\pi = 0,0021$. Gli Hpt-6 e Hpt-7 sono stati riscontrati al Giglio con una frequenza rispettivamente dell'89% e dell'11%. Tra gli otto campioni corsi analizzati nel presente studio, sei condividevano gli stessi aplotipi identificati in un campione di muflone corso (h11) da Sanna e colleghi [21], mentre due mostravano un nuovo aplotipo (Hpt-8). Nei dieci campioni corsi, abbiamo trovato tre aplotipi di mtDNA separati da mutazioni di un passo ($H_d = 0,511$; $\pi = 0,0018$). Il campione elbano ospitava un aplotipo privato (Hpt-9). Per quanto ne sappiamo, nessuno di questi

di questi aplotipi è stato descritto in precedenza in razze ovine domestiche.

La rete di giunzione mediana ha individuato tre principali cluster di aplotipi mtDNA caratterizzati da una forte componente geografica (Figura 2). Le 18 sequenze di muflone si sono raggruppate in cinque aplotipi (Hpt-6-9 e h11), secondo i risultati desunti dall'analisi della variabilità genetica e della diversità aplotipica precedentemente riportata. Hpt-6 e Hpt-7 sono risultati strettamente correlati agli aplotipi Hpt-1 e Hpt-4, entrambi precedentemente descritti nel muflone sardo [14], mentre Hpt-9 è apparso più vicino ai mufloni dell'Europa continentale.

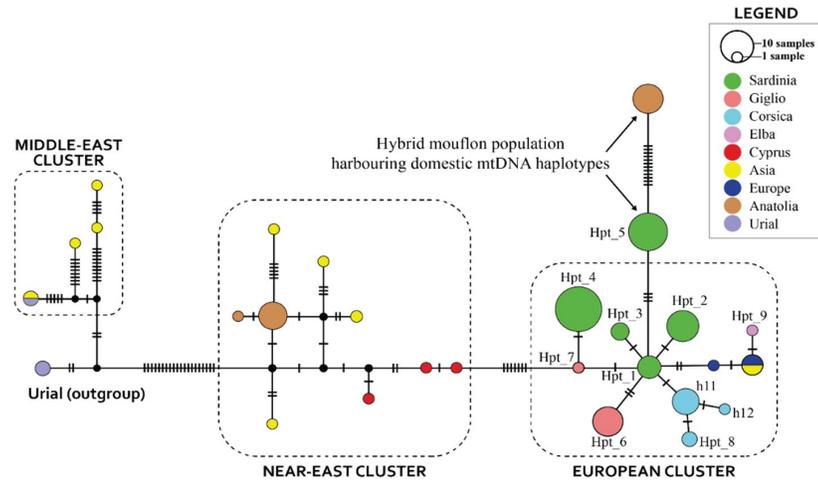


Figura 2. Rete di giunzione mediana che mostra la relazione tra gli aplotipi mtDNA dei mufloni.

Per quantificare le differenze tra gli aplotipi all'interno del cluster europeo ($n = 62$), sono state calcolate le distanze genetiche a coppie tra i gruppi. L'Hpt-6 è risultato più correlato all'Hpt-1 ($0,0063 \pm 0,005$) rispetto all'Hpt-7 ($0,0096 \pm 0,005$), mentre quest'ultimo è equidistante dall'Hpt-1 e dall'Hpt-4 ($0,0032 \pm 0,003$). Sia per Hpt-6 che per Hpt-7, la distanza massima è stata registrata da Hpt-9 ($0,0193 \pm 0,003$).

La PCA eseguita sui genotipi SSR ha discriminato il set di dati in tre cluster distinti, sovrapposti all'origine geografica dei campioni: Sardegna, Corsica e Isola del Giglio (Figura 3), con gli individui domestici inclusi nel cluster sardo. È importante notare che dieci individui del Giglio presentavano due alleli SSR privati in due loci (MCM150-112 e MNS5-185; Tabella S1, Materiali supplementari).

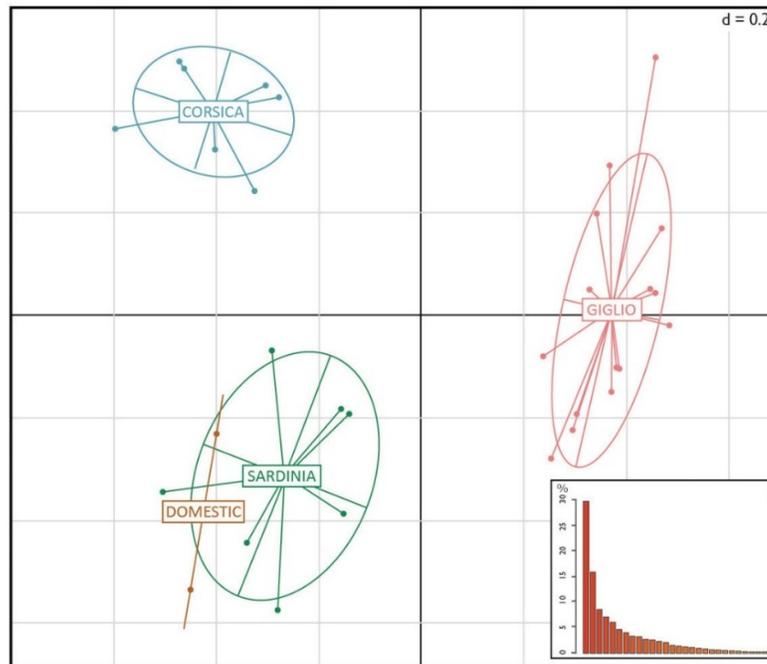


Figura 3. P PCA di quattro popolazioni di mufloni e una domestica; gli assi X e Y rappresentano rispettivamente la prima e la seconda PC. Il riquadro mostra l'importanza di ciascuna PC in termini di percentuale della varianza totale spiegata.

4. Discussione

La biodiversità esistente sulle isole può essere estremamente ricca, poiché l'isolamento geografico può promuovere contemporaneamente la diversità evolutiva e ospitare lignaggi di specie precedentemente diffuse [22-24]. I nostri risultati confermano il ruolo delle isole del Mediterraneo come serbatoio genetico, come già evidenziato per: il toporagno e il passero cretesi [25,26], il toporagno siciliano [27], il daino rodiese [28,29], il topo cipriota e il muflone [21,30], il grifone europeo [31], i cavallini sardi e il cervo rosso [32,33], la lepre di Pianosa [34], la vipera e la capra di Montecristo [35,36].

I due aplotipi del mtDNA, Hpt-6 e Hpt-7, si sono raggruppati all'interno del cluster del muflone europeo e non sono stati descritti in precedenza nelle razze ovine domestiche. Hpt-6 è apparso strettamente correlato a Hpt-1, che è l'aplotipo mtDNA più antico identificato all'interno del cluster del muflone europeo e forse quello da cui ha avuto origine l'attuale diversità del muflone [37]. Hpt-7 è posizionato tra Hpt-1 e Hpt-4 nella rete di giunzione mediana (Figura 2). Sia Hpt-1 che Hpt-4 sono di origine sarda, il che suggerisce che Hpt-7 rappresenti una traccia residua della variabilità originaria del muflone sardo [14]. Allo stesso modo, le analisi SSR hanno evidenziato alleli privati nei mufloni del Giglio, indicando che questa popolazione ospita una variabilità genetica esclusiva. La bassa incidenza dell'Hpt-7 nella popolazione del Giglio evidenzia la sua intrinseca fragilità, che richiede quindi adeguate e urgenti misure di protezione per evitarne la scomparsa irreversibile. L'aplotipo ospitato dal campione elbano discende dall'antenato di linea degli aplotipi europei; ciò è coerente con le fonti storiche che fanno risalire l'origine della colonia elbana all'introduzione, nel 1975, di sei femmine e tre maschi provenienti dall'Europa continentale [12].

La traslocazione dei mufloni sardi al Giglio è avvenuta a metà degli anni '50, quando la popolazione sarda stava subendo un grave

la popolazione sarda stava subendo un grave collo di bottiglia a causa dell'erosione dell'habitat e del bracconaggio estensivo, con solo ~300 individui rimasti registrati intorno al 1978 [8,38]. Secondo le analisi disponibili sulla diversità del muflone sardo [14,21], i lignaggi sardi traslocati al Giglio non sono sopravvissuti nella popolazione di origine. La presenza di isolati genetici derivanti da una specie diffusa non è rara, come nel caso dell'attuale popolazione di daini che abita l'isola di Rodi, nel Mar Egeo orientale, che conserva alcuni tratti genetici assenti sia nell'attuale popolazione turca vicina, sia nella restante popolazione mondiale della specie [28,29]. Nei decenni successivi, l'emanazione di diverse leggi volte a proteggere la fauna locale, insieme all'istituzione di riserve naturali, ha permesso al muflone sardo di aumentare di numero. Tuttavia, la strozzatura della popolazione verificatasi nella prima metà del XX secolo ha eroso una parte della diversità originaria, una parte della quale si è fortunatamente conservata all'Isola del Giglio.

L'eradicazione può essere uno strumento utile per prevenire la diffusione di specie esotiche invasive e mitigarne l'impatto sulla biodiversità autoctona.

mitigare il loro impatto sulla biodiversità autoctona, sulle funzioni dell'ecosistema, sulla salute di animali e piante e sulle economie umane [39-41]. Tuttavia, oltre a valutare gli impatti della rimozione di una specie da un ecosistema, la natura irreversibile dell'eradicazione dovrebbe imporre anche una valutazione approfondita del valore genetico della popolazione focale e se essa rappresenta un isolato genetico di una popolazione precedentemente diffusa [39]. I nostri risultati suggeriscono che la popolazione di muflone del Giglio ha un'alta priorità di conservazione in quanto rappresenta una risorsa genetica inestimabile e insostituibile.

Nel 2014, l'Unione Europea ha fornito le linee guida per definire le "specie o razze esotiche invasive" (IAS; Regolamento UE 1143/2014). Le IAS, spesso introdotte a seguito della globalizzazione, sono definite come quelle specie o razze inserite al di fuori del loro areale geografico naturale, inteso come macroarea, accidentalmente o intenzionalmente, magari per scambi commerciali. È noto che le IAS influenzano negativamente il biota insulare a causa della loro tendenza a diventare demograficamente fuori controllo in un periodo di tempo relativamente breve e ad alterare la struttura e il funzionamento di interi ecosistemi [42,43]. Le principali conseguenze sono impatti economici significativi e gravi problemi per la salute umana [42,44]. Tuttavia, non è stato valutato alcun impatto negativo sull'ambiente o su altre specie attraverso studi solidi e documentati per stabilire misure di contenimento del Giglio.

muflone del Giglio. L'unico disturbo notificato dovuto al muflone sembra essere qualche danno trascurabile alle colture (pari a poche centinaia di euro negli ultimi 19 anni).

Questo studio dimostra che la popolazione di mufloni dell'Isola del Giglio ospita una diversità genetica non rilevata nel patrimonio sardo. Come una capsula del tempo, l'isola del Giglio potrebbe aver conservato una parte del DNA ancestrale del muflone sardo, poiché la popolazione attuale rappresenta un'istantanea del pool autoctono sardo al momento della traslocazione. I nostri risultati suggeriscono l'urgente necessità di interrompere le attività di eradicazione e di concepire contemporaneamente piani di conservazione per preservare ciò che resta della popolazione del Giglio, consentendo al contempo indagini genomiche su larga scala per confermare e aggiungere dettagli a questa risorsa genetica perduta. Il recinto originario del promontorio di Franco potrebbe essere ripristinato per consentire il monitoraggio della popolazione, mentre si potrebbero svolgere indagini solide e documentate sull'impatto del muflone all'Isola del Giglio [45]. È importante notare che la strategia di conservazione in situ consentirebbe alle autorità dell'Isola del Giglio di sfruttare la presenza della popolazione locale di mufloni per promuovere la consapevolezza della biodiversità come elemento aggiuntivo dell'economia locale altamente basata sul turismo, convertendo in definitiva la presenza del muflone da un presunto fastidio a un elemento di arricchimento dell'Isola del Giglio. I dati ottenuti sulla popolazione rinchiusa consentirebbero di compiere scelte ponderate per riportare il muflone del Giglio in condizioni non gestite o per sviluppare piani alternativi di conservazione in situ ed ex situ. A lungo termine, dopo le necessarie valutazioni genomiche e l'attuazione di un programma di ripopolamento dedicato, sarebbe possibile reintegrare i lignaggi un tempo perduti rappresentati dal muflone del Giglio nella popolazione di mufloni della Sardegna. Inoltre, la disponibilità di queste varianti genetiche inesplorate del muflone è promettente per aggiungere dettagli alla comprensione generale dell'evoluzione sotto il controllo culturale umano del genere *Ovis* [46-48]. Queste informazioni aggiuntive aumenteranno probabilmente il potere di rilevazione degli studi volti a valutare i livelli di selezione, l'adattamento genomico alle sfide ambientali [49-52], l'ascendenza a grana fine e la presenza di incroci [3,53,54].

5. Conclusioni

Il Mediterraneo è stato intensamente influenzato dall'attività umana per un periodo prolungato, senza che nessun ecosistema sia rimasto intatto. Negli ultimi 12.000 anni, quest'area geografica è stata caratterizzata dalla stratificazione multipla di eventi culturali antropici successivi che hanno alterato profondamente la composizione delle biocenosi originarie. Tali eventi complessi hanno portato alla comparsa multipla di popolazioni introdotte, probabilmente portatrici di una diversità genetica unica, come quella qui discussa. Il caso del muflone del Giglio suggerisce che, ogni volta che si prendono in considerazione azioni di conservazione irreversibili, è necessario adottare il principio di precauzione e condurre indagini multidisciplinari approfondite per valutare il rapporto benefici/rischi [45].

Materiale supplementare: Le seguenti informazioni di supporto possono essere scaricate all'indirizzo: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/d14080609/s1>, Table S1: SSR scores, Table S2: CR1-CR2 primers sequence

Contributi degli autori: Concettualizzazione, M.B., M.M., M.S., R.V. and P.M.; analisi formale, M.B., M.S., R.V. and P.M.; indagine, M.B., M.M., M.P., M.S., R.V. and P.M.; risorse, M.M., M.S., N.C., R.V. and P.M.; scrittura — preparazione della bozza originale, M.B., M.M., M.P., M.S., R.V. and P.M.; revisione e revisione della scrittura, M.B., M.M., M.P., M.S., R.V. and P.M.; visualizzazione, M.B., M.P., M.S., R.V. and P.M.; supervisione, M.M. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Il supporto parziale al costo delle analisi è stato fornito da Barbara Arienti, Pietro Baffigi, Emilio Bancalà, Emanuela Bancalà, Teresa Bancalà, Romina Bancalà, Mario Bancalà, Alessandra Bancalà, Anna Bardelli, Annamaria Barosi, Ilaria Becchino, Andrea Biscaro, Luigi Bonacchi, Amy Bond, Maurizio Brothel, Gianni Caverio, Fiorella Colosi, Dales D'Alessandro, Novalba Danei, Andrea Danese, Argentina Dell'Amico, Silvia Facheris, Gherardo Felloni, Giovanni Felloni, Alessio Guarnieri, Michele Guastafierro, Piero Landini, Paolo Landini, Diletta Landini,

Laura Lenzi, Francesca Mattera, Massimiliano Mazzoni, Flora Miliani, Daniele Modesti, Alessandra Modesti, Maria Zita Palavisini, Antonio Pappacena, Federigo Pardini, Andrea Rum, Stefano Rum, Cesare Scarfo, Giovanni Battista Scarfo, Giorgia Schiaffino, Eufemia Schiaffino, Libero Schiaffino, Francesco Scordamaglia, Aldo Scotto, Palma Silvestri, Carlo Solari, Domenico Solari, Biagio Stagno, Angelo Stefani, Argentino Stefanini, Angelo Stefanini, Alessandro Stella, Marco Zocco, Giuliana Zoppi, and Patrizia Zottola.

Dichiarazione del comitato di revisione istituzionale: I campioni di sangue sono stati raccolti in stretta conformità con le linee guida del Comitato Etico dell'Università di Sassari, Italia, e del Gabinetto Veterinario Les Deux Iles Santa Maria Siché, Corse du Sud, Francia.

Dichiarazione di disponibilità dei dati: Le sequenze di mtDNA generate in questo lavoro sono pubblicamente disponibili in GenBank al numero ON960213-22; i punteggi SSR sono riportati nella Tabella supplementare S1.

Ringraziamenti: Siamo grati a Roberta Deiana del "cabinet vétérinaire Les Deux Iles Santa Maria Siché" (Corse du Sud) per aver fornito i campioni di mufloni corsi utilizzati in questo studio, a Salvatore Naitana per le utili discussioni e ai redattori ospiti per il supporto a questo articolo.

Conflitti di interesse: Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interessi. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta, nell'analisi o nell'interpretazione dei dati, nella stesura del manoscritto o nella decisione di pubblicare i risultati.

Riferimenti

1. Poplin, F. Origine Du Mouflone de Corse Dans Une Nouvelle Perspective Paléontologique: Par Marronnage. *Ann. Genet. Sel. Anim.* **1979**, *11*, 133–143.
2. Masseti, M. The Prehistoric Diffusion of the Asiatic Mouflon, Ovis Gmelini Blyth, 1841, and the Bezoar Goat, Capra Aegagrus Erxleben, 1777, in the Mediterranean Area beyond Their Natural Distributions. In *Proceedings of the Second International Symposium on Mediterranean Mouflon "The Mediterranean mouflon: Management and conservation"*; Hadjisterkotis, E., Ed.; Game Fund of Cyprus/IUCN Species Survival Commission, Caprinae Specialist Group: Nicosia, Cyprus, 1997.
3. Barbato, M.; Hailer, F.; Orozco-terWengel, P.; Kijas, J.W.; Mereu, P.; Cabras, P.; Mazza, R.; Pirastru, M.; Bruford, M.W. Genomic Signatures of Adaptive Introgression from European Mouflon into Domestic Sheep. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07382-7>.
4. Ciani, E.; Mastrangelo, S.; da Silva, A.; Marroni, F.; Ferencaković, M.; Ajmone-Marsan, P.; Baird, H.; Barbato, M.; Colli, L.; Delvento, C.; et al. On the Origin of European Sheep as Revealed by the Diversity of the Balkan Breeds and by Optimizing Population-Genetic Analysis Tools. *Genet. Sel. Evol.* **2020**, *52*, 25. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00545-7>.
5. Cugnasse, J.-M. Révision Taxonomique Des Mouflons Des Îles Méditerranée. *Mammalia* **1994**, *58*, 507–512.
6. Michel, S.; Ghoddousi, A. *Ovis Vignei. The IUCN Red List of Threatened Species 2020*; E. T54940655A54940728; International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: Gland, Switzerland, 2020.
7. Perco, F. *Ungulati*; Carlo Lorenzini editore: Udine, Italy, 1987.
8. Cassola, F. *Il Muflone Di Sardegna: Importanza, Stato Attuale e Problemi Di Conservazione*; World Wildlife Fund: Roma, Italy, 1976.
9. Perco, F. *Il Muflone*; Edagricole: Bologna, Italy, 1977.
10. Masserini, V. *Diana*. Editoriale Olimpia, Firenze, Italy, 1958, pp. 11–14.
11. Baldacci, U. *La riserva di Caccia*; Ente Produttori Selvaggina, Roma, Italy, 1975, pp. 1–4.
12. Masseti, M. *Fauna Toscana. Galliformi Non Migratori, Lagomorfi e Artiodattili*; Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale (ARSA): Firenze, Italy, 2003; ISBN 8882950441.
13. LifeGoGiglio. Available online: <https://www.lifegogiglio.eu/en/highlights/actions/> (accessed on 8 July 2022).
14. Satta, V.; Mereu, P.; Barbato, M.; Pirastru, M.; Bassu, G.; Manca, L.; Naitana, S.; Leoni, G.G. Genetic Characterization and Implications for Conservation of the Last Autochthonous Mouflon Population in Europe. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 14729. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94134-3>.
15. Hall, T. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
16. Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
17. Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohl, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
18. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

19. Scali, M.; Vignani, R.; Quintetti, M.; Bigliuzzi, J.; Paolucci, E.; Cresti, M. Genetic Traceability of Cinta Senese Pig (*Sus scrofa domestica* L.): A Study of the Meat and Processed Products by Microsatellite Markers. *Food Nutr. Sci.* **2015**, *06*, 712–726. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.68074>.
20. Dray, S.; Dufour, A.-B. The Ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J. Stat. Softw.* **2007**, *22*, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>.
21. Sanna, D.; Barbato, M.; Hadjisterkotis, E.; Cossu, P.; Decandia, L.; Trova, S.; Pirastru, M.; Leoni, G.G.; Naitana, S.; Francalacci, P.; et al. The First Mitogenome of the Cyprus Mouflon (*Ovis Gmelini* Ophion): New Insights into the Phylogeny of the Genus *Ovis*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144257>.
22. Drake, D.R.; Mulder, C.P.H.; Towns, D.R.; Daugherty, C.H. The Biology of Insularity: An Introduction. *J. Biogeogr.* **2002**, *29*, 563–569. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00706.x>.
23. Hébert, K.; Millien, V.; Lessard, J.-P.; Masters, J. Source Pool Diversity and Proximity Shape the Compositional Uniqueness of Insular Mammal Assemblages Worldwide. *J. Biogeogr.* **2021**, *48*, 2337–2349. <https://doi.org/10.1111/jbi.14156>.
24. Fernández-Palacios, J.M.; Kreft, H.; Irl, S.D.H.; Norder, S.; Ah-Peng, C.; Borges, P.A.V.; Burns, K.C.; de Nascimento, L.; Meyer, J.Y.; Montes, E.; et al. Scientists' Warning—The Outstanding Biodiversity of Islands Is in Peril. *Glob. Ecol. Conserv.* **2021**, *31*, e01847. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01847>.
25. Reumer, J.W.F. Shrews (Soricidae) on Islands, with Special Reference to *Crocidura Zimmermanni* from Crete. In *Pleistocene and Holocene Fauna of Crete and its First Settlers*; Prehistory Press: Madison, WI, USA, 1996; pp. 173–179.
26. Masseti, M. Mammals of the Mediterranean Islands: Homogenisation and the Loss of Biodiversity. *Mammalia* **2009**, *73*, 169–202.
27. Sarà, M.; Vitturi, R. *Crocidura* Populations (Mammalia, Soricidae) from the Sicilian-Maltese Insular Area. *Hystrix Ital. J. Mammal.* **1996**, *8* (1-2), 121–132. <https://doi.org/10.4404/hystrix-8.1-2-4101>.
28. Masseti, M.; Vernesi, C. Historic Zoology of the European Fallow Deer, *Dama dama*: Evidence from Biogeography, Archaeology and Genetics. In *Deer and People. Oxbow books, Oxford*, 2014; pp. 13–22.
29. Masseti, M.; Pecchioli, E.; Vernesi, C. Phylogeography of the Last Surviving Populations of Rhodian and Anatolian Fallow Deer (*Dama dama dama* L., 1758). *Biol. J. Linn. Soc.* **2008**, *93*, 835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00951.x>.
30. Cucchi, T.; Orth, A.; Auffray, J.-C.; Renaud, S.; Fabre, L.; Catalan, J.; Hadjisterkotis, E.; Bonhomme, F.; Vigne, J.-D. A New Endemic Species of the Subgenus *Mus* (Rodentia, Mammalia) on the Island of Cyprus. *Zootaxa* **2006**, *1241*, 1–36.
31. Mereu, P.; Satta, V.; Frongia, G.N.; Berlinguer, F.; Muzzeddu, M.; Campus, A.; Decandia, L.; Pirastru, M.; Manca, L.; Naitana, S.; et al. The Complete MtDNA Sequence of the Griffon Vulture (*Gyps Fulvus*): Phylogenetic Analysis and Haplotype Frequency Variations after Restocking in the Sardinian Population. *Biol. Conserv.* **2017**, *214*, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.08.017>.
32. Morelli, L.; Useli, A.; Sanna, D.; Barbato, M.; Contu, D.; Pala, M.; Cancedda, M.; Francalacci, P. Mitochondrial DNA Lineages of Italian Giara and Sarcidano Horses. *Genet. Mol. Res.* **2014**, *13*, 8241–8257. <https://doi.org/10.4238/2014.October.20.1.ABSTRACT>.
33. Doan, K.; Zachos, F.E.; Wilkens, B.; Vigne, J.-D.; Piotrowska, N.; Stanković, A.; Jedrzejewska, B.; Stefaniak, K.; Niedziałkowska, M. Phylogeography of the Tyrrhenian Red Deer (*Cervus elaphus corsicanus*) Resolved Using Ancient DNA of Radiocarbon-Dated Subfossils. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2331. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02359-y>.
34. Hobohm, C. Nature-Culture Dichotomy and Environmental Consciousness: Do We Fear the Right Things? In *Perspectives for Biodiversity and Ecosystems*; Springer: Cham, Switzerland, 2021; pp. 17–41.
35. Masseti, M.; Zuffi, M.A.L. On the Origin of the Population of Asp Viper, *Vipera Aspis* Hugi Schinz, 1833, of the Island of Montecristo, in the Northern Tyrrhenian Sea (Tuscan Archipelago, Italy). *Herpetol. Bull.* **2011**, *117*.
36. Somenzi, E.; Senczuk, G.; Ciampolini, R.; Cortellari, M.; Vajana, E.; Tossier-Klopp, G.; Pilla, F.; Ajmone-Marsan, P.; Crepaldi, P.; Colli, L. The SNP-Based Profiling of Montecristo Feral Goat Populations Reveals a History of Isolation, Bottlenecks, and the Effects of Management. *Genes* **2022**, *13*, 213. <https://doi.org/10.3390/genes13020213>.
37. Mereu, P.; Pirastru, M.; Barbato, M.; Satta, V.; Hadjisterkotis, E.; Manca, L.; Naitana, S.; Leoni, G.G. Identification of an Ancestral Haplotype in the Mitochondrial Phylogeny of the Ovine Haplogroup B. *PeerJ* **2019**, *7*, e7895. <https://doi.org/10.7717/peerj.7895>.
38. CASSOLA, F. Management and Conservation of the Sardinian Moufflon (*Ovis Musimon*). In *The Biology and Management of Mountain Ungulates*; Croom-Helm: London, UK, 1985; p. 197.
39. Myers, J.H.; Simberloff, D.; Kuris, A.M.; Carey, J.R. Eradication Revisited: Dealing with Exotic Species. *Trends Ecol. Evol.* **2000**, *15*, 316–320. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01914-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01914-5).
40. Hess, S.C.; Kawakami, B.; Okita, D.; Medeiros, K. *A Preliminary Assessment of Mouflon Abundance at the Kahuku Unit of Hawai'i Volcanoes National Park*; U.S. Geological Survey: Reston, VA, USA, 2006.
41. Bertolino, S.; Sciandra, C.; Bosso, L.; Russo, D.; Lurz, P.W.W.; di Febbraro, M. Spatially Explicit Models as Tools for Implementing Effective Management Strategies for Invasive Alien Mammals. *Mammal Rev.* **2020**, *50*, 187–199. <https://doi.org/10.1111/mam.12185>.
42. Sundseth, K. *Invasive Alien Species: A European Union Response*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2014; ISBN 9279354868.
43. Hadjisterkotis, E.; Konstantinou, G.; Sanna, D.; Pirastru, M.; Mereu, P. First Mtdna Sequences and Body Measurements for *Rattus Norvegicus* from the Mediterranean Island of Cyprus. *Life* **2020**, *10*, 136. <https://doi.org/10.3390/life10080136>.
44. Bani, L.; Orioli, V.; Trasforini, S.; Puzzi, C.M.; Sibilia, A.; Dondina, O.; Tirozzi, P. The Spread of Exotic Fish Species in Italian Rivers and Their Effect on Native Fish Fauna since 1990. *Biodiversity* **2021**, *22*, 4–12. <https://doi.org/10.1080/14888386.2020.1837014>.

45. Shackleton, D. *Objectives, Format and Limitations of the Caprinae Survey and Action Plan*; IUCN International Union for Conservation of Nature: Gland, Switzerland, 1997; ISBN 2-8317-0353-0.
46. Kijas, J.W.; Lenstra, J.A.; Hayes, B.J.; Boitard, S.; Porto Neto, L.R.; San Cristobal, M.; Servin, B.; McCulloch, R.; Whan, V.; Gietzen, K.; et al. Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001258>.
47. Dotsev, A. v.; Kunz, E.; Shakhin, A.V.; Petrov, S.N.; Kostyunina, O.V.; Okhlopkov, I.M.; Deniskova, T.E.; Barbato, M.; Bagirov, V.A.; Medvedev, D.G.; et al. The First Complete Mitochondrial Genomes of Snow Sheep (*Ovis nivicola*) and Thinhorn Sheep (*Ovis dalli*) and Their Phylogenetic Implications for the Genus *Ovis*. *Mitochondrial DNA Part B* **2019**, *4*, 1332–1333. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1535849>.
48. Cao, Y.-H.; Xu, S.-S.; Shen, M.; Chen, Z.-H.; Gao, L.; Lv, F.-H.; Xie, X.-L.; Wang, X.-H.; Yang, H.; Liu, C.-B.; et al. Historical Introgression from Wild Relatives Enhanced Climatic Adaptation and Resistance to Pneumonia in Sheep. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, *38*, 838–855. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa236>.
49. Lv, F.-H.; Cao, Y.-H.; Liu, G.-J.; Luo, L.-Y.; Lu, R.; Liu, M.-J.; Li, W.-R.; Zhou, P.; Wang, X.-H.; Shen, M.; et al. Whole-Genome Resequencing of Worldwide Wild and Domestic Sheep Elucidates Genetic Diversity, Introgression and Agronomically Important Loci. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *39*, msab353. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab353>.
50. Alberto, F.J.; Boyer, F.; Orozco-terWengel, P.; Streeter, I.; Servin, B.; de Villemereuil, P.; Benjelloun, B.; Librado, P.; Biscarini, F.; Colli, L.; et al. Convergent Genomic Signatures of Domestication in Sheep and Goats. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 813. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03206-y>.
51. Cortellari, M.; Barbato, M.; Talenti, A.; Bionda, A.; Carta, A.; Ciampolini, R.; Ciani, E.; Crisà, A.; Frattini, S.; Lasagna, E.; et al. The Climatic and Genetic Heritage of Italian Goat Breeds with Genomic SNP Data. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 10986. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89900-2>.
52. Passamonti, M.M.; Somenzi, E.; Barbato, M.; Chillemi, G.; Colli, L.; Joost, S.; Milanese, M.; Negrini, R.; Santini, M.; Vajana, E.; et al. The Quest for Genes Involved in Adaptation to Climate Change in Ruminant Livestock. *Animals* **2021**, *11*, 2833. <https://doi.org/10.3390/ani11102833>.
53. Somenzi, E.; Ajmone-Marsan, P.; Barbato, M. Identification of Ancestry Informative Marker (AIM) Panels to Assess Hybridisation between Feral and Domestic Sheep. *Animals* **2020**, *10*, 582. <https://doi.org/10.3390/ani10040582>.
54. Lorenzini, R.; Cabras, P.; Fanelli, R.; Carboni, G.L. Wildlife Molecular Forensics: Identification of the Sardinian Mouflon Using STR Profiling and the Bayesian Assignment Test. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2011**, *5*, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.012>.