

Il Museo Efisio Noussan e le biotecnologie come strumento al servizio dell'ambiente e del territorio

Fabio Guglielmo, Santa Tutino

Struttura Biodiversità, sostenibilità e aree naturali protette, Assessorato Opere pubbliche, Territorio e Ambiente, Regione Autonoma Valle d'Aosta / Vallée d'Aoste, Località Le Grand Chemin, 46. I-11020 Saint-Christophe (AO). Museo regionale di Scienze naturali Efisio Noussan, Frazione Chez Borgne, 3. I-11015 La Salle (AO). E-mail: museoscienze@regione.vda.it

RIASSUNTO

Le innovazioni tecnologiche che mettono la scienza al servizio dell'ambiente e del territorio sono tra le priorità del Museo regionale di Scienze naturali Efisio Noussan. Il Museo è infatti dotato di un laboratorio di biotecnologie per analisi del DNA finalizzate prevalentemente a identificare tracce biologiche a un livello specifico e/o individuale, a condurre studi di genetica di popolazione e a individuare target genici di interesse. Con quasi 3500 campioni e oltre 30.000 determinazioni, il Museo è a oggi una piattaforma di riferimento regionale per analisi del DNA a supporto di servizi e collaborazioni in tre ambiti: (i) natura e biodiversità, per il monitoraggio e lo studio di specie animali e vegetali protette; (ii) agri-food e salute delle piante, per la caratterizzazione genetica e la valorizzazione di risorse agroalimentari autoctone, nonché per i monitoraggi fitosanitari; (iii) conservazione dei beni culturali, per indagini biologiche su monumenti e siti archeologici.

Parole chiave:

DNA, monitoraggio genetico non invasivo, conservazione ex situ, fitopatogeni.

ABSTRACT

The Efisio Noussan Museum and the biotechnologies for the environment and territory

Technological innovations promoting science for the environment and the field are among the priorities of the Efisio Noussan regional Museum of natural Sciences. Indeed, the Museum is equipped with a biotechnology lab for DNA assays mainly addressed to identify biological traces at a specific and/or individual rank, to perform genetic population studies and to detect genomic targets of interest. At present, with almost 3,500 samples and over 30,000 assays, the Museum is a regional reference platform for DNA assays supporting services and collaborations in three areas: (i) nature and biodiversity, for monitoring and study wild protected animal and plant species; (ii) agri-food and plant health, for genetic characterization and exploitation of local agri-food resources, as well as for phytosanitary monitoring; (iii) conservation of cultural heritage, for biological investigations on historical monuments and archaeological sites.

Key words:

DNA, non-invasive genetic monitoring, ex situ conservation, plant pathogens.

INTRODUZIONE

Oltre agli aspetti più strettamente legati alla comunicazione, all'educazione e alla ricerca nell'ambito delle scienze naturali, il Museo regionale di Scienze naturali Efisio Noussan in questi ultimi anni ha dedicato particolare attenzione a tutte quelle innovazioni tecnologiche che mettono la scienza al servizio dell'ambiente e del territorio.

È in quest'ottica che il Museo si è dotato di un laboratorio di biotecnologie specializzato nell'analisi della molecola della vita per eccellenza: il DNA. Questa molecola, oltre a essere il depositario di tutta l'informazione genetica che si trasmette di generazione in generazione, rappresenta una carta di identità biologica presente in tutti gli organismi viventi e rilevabile anche da tracce o residui di essi. L'analisi del DNA può dunque essere un potente e versatile strumento di identificazione e di studio per tutto ciò che è, o è stato, un organismo vivente.

Il laboratorio del Museo ha dunque acquisito tecnologie e competenze principalmente rivolte all'esecuzione di differenti prove analitiche, tra le quali: la PCR, sia in end-point sia in real-time; il sequenziamento di tipo Sanger; la fragment analysis; la digestione enzimatica. Le prove di PCR, essenziali per amplificare in modo specifico una o più porzioni di DNA, sono spesso preliminari ad altre prove analitiche ma, soprattutto in real-time PCR, possono anche essere metodi diagnostici molto sensibili per valutare la presenza di un determinato organismo in una matrice biologica; il sequenziamento di tipo Sanger, che permette di "leggere" la sequenza nucleotidica di frammenti di DNA, è alla base di prove di DNA barcoding, per l'identificazione specifica di un organismo, anche partendo da tracce, e di analisi filogenetiche, per studiare l'origine e l'evoluzione di un insieme di organismi appartenenti a una specie; le prove di fragment analysis, impiegate per stimare l'esatta taglia di porzioni di DNA contenenti motivi ripetuti (simple

sequence repeats - SSR), sono usate come tecniche di DNA genotyping o fingerprinting, per l'identificazione a livello individuale e per effettuare studi di parentela e di genetica di popolazione; la digestione enzimatica, che sfrutta endonucleasi di restrizione per tagliare porzioni di DNA contenenti determinati siti, può essere utile per



Fig. 1. Esemplari di lupo (a) e di biancone (b): specie animali protette sottoposte a monitoraggio genetico in Valle d'Aosta.



Fig. 2. *Astragalus alopecurus*, esempio di specie vegetale spontanea protetta conservata nella Banca del germoplasma vegetale della Valle d'Aosta, con relativi semi puliti e visualizzati allo stereomicroscopio e semi germinati dopo apposite prove su substrato agar/acqua.

l'esecuzione di prove di sessaggio o di identificazione a livello sub-specifico.

Tre aree distinte e ben attrezzate con le tecnologie più avanzate e consolidate presenti sul mercato, destinate a specifiche fasi analitiche; circa 3500 campioni biologici processati; più di 30.000 determinazioni effettuate; la partecipazione a cinque progetti finanziati con fondi europei e/o nazionali; 124 rapporti di prova redatti: sono questi alcuni dei numeri che attestano come, dal 2016 al 2022, il laboratorio di biotecnologie del Museo sia diventato una piattaforma tecnologica regionale di riferimento per analisi del DNA a supporto di servizi e collaborazioni multidisciplinari.

Sono dunque qui di seguito riportati approfondimenti su alcune delle attività e degli studi svolti in questi anni dal Museo in tre principali aree di riferimento: natura e biodiversità, agri-food e salute delle piante, conservazione dei beni culturali.

BIOTECNOLOGIE PER LA NATURA E LA BIODIVERSITÀ

In coerenza con le finalità tipiche di un museo di scienze naturali, le attività del laboratorio di biotecnologie sono prevalentemente indirizzate verso tematiche inerenti all'ambiente, alla natura e alla conservazione della biodiversità. A tal proposito, il laboratorio è attivamente impegnato nello sviluppo e nell'implementazione di strumenti a supporto del monitoraggio e dello studio di specie animali protette, in particolare di quelle incluse nelle direttive Habitat (92/43/CEE) e Uccelli (2009/147/CE), e dell'identificazione e della conservazione ex situ di specie vegetali spontanee rare e minacciate della Valle d'Aosta (figg. 1 e 2).

Il Museo, in collaborazione con il Dipartimento Risorse naturali e Corpo forestale della Regione Valle d'Aosta e all'interno del progetto LIFE WOLFALPS EU (2019-2024), è incaricato del monitoraggio genetico non invasivo della specie *Canis lupus* (lupo), i cui risultati confluiscono nei report regionali e nazionali coordinati dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA). Le analisi genetiche rappresentano infatti uno degli strumenti essenziali per valutare l'abbondanza, le dinamiche di diffusione e la struttura di popolazione del lupo sul territorio di competenza, nonché l'eventuale presenza di individui ibridi. La conoscenza di questi dati è fondamentale per pianificare una gestione che garantisca la salvaguardia di questa specie e, al contempo, tenga in considerazione le problematiche a essa associate. Le tecniche analitiche, implementate dopo prove comparative con il National Genomics Center for Wildlife and Fish Conservation di Missoula (MT, USA), prevedono due principali fasi: partendo da campioni di differente origine, quali tracce biologiche, come feci, peli, urine e tamponi salivari da predazioni, o porzioni carnee da individui trovati morti, il laboratorio, dopo aver estratto il DNA, procede con una prima fase di identificazione specifica, tramite sequenziamento di

una porzione della regione di controllo del DNA mitocondriale (Fabbri et al., 2007; Caniglia et al., 2013), per valutare l'appartenenza del campione alla specie *Canis lupus italicus*, seguita, in caso di riscontro positivo, da una seconda fase di identificazione individuale, tramite fragment analysis di 17 loci SSR (Francisco et al., 1996; Neff et al., 1999; Marucco et al., 2020), e di sessaggio, tramite digestione enzimatica di una porzione di DNA sui cromosomi sessuali (Lucchini et al., 2002; Ortega et al., 2004). Dai 724 campioni analizzati dal 2018 al 2022, sono stati identificati 191 differenti individui (88 femmine e 103 maschi) e determinati nove branchi distribuiti in differenti aree della Valle d'Aosta, oltreché numerosi individui in dispersione o di passaggio. L'efficienza analitica del laboratorio per questo tipo di prove è risultata elevata sia in termini di successo per l'identificazione specifica, pari all'87,6%, sia in termini di successo per l'identificazione individuale e il sessaggio, pari al 63,1%. In collaborazione con il Parco naturale Mont Avic, il Museo ha inoltre intrapreso un progetto, inizialmente finanziato con fondi FESR, finalizzato alla messa a punto di un protocollo molecolare per l'identificazione individuale e lo studio di genetica di popolazione del rapace *Circus gallicus* (biancone). Questo rapace migratore, che nidifica in foreste xerothermiche dell'Europa centro-meridionale e dell'Asia e da dove si sposta, tra agosto e ottobre, verso le regioni subsahariane (Maffei et al., 2018), è inserito in Allegato I della Direttiva Uccelli (79/409/CEE) poiché minacciato prevalentemente da uccisioni illegali e dal declino delle popolazioni di rettili, che sono il principale costituente della sua dieta. Studi inerenti all'ecologia e alla biologia del biancone possono fornire utili indicazioni per migliorarne la gestione e la conservazione. In quest'ottica, il laboratorio ha sviluppato una metodica basata sull'analisi di 9 loci SSR che, partendo dall'estrazione del DNA da penne e/o sterco raccolti presso i siti di nidificazione, si è già dimostrata efficace nell'identificazione di alcuni individui presenti in Valle d'Aosta. L'applicazione di questa metodica sugli oltre 300 campioni biologici raccolti, dal 2005 a oggi, potrà dunque fornire utili indicazioni sulla fedeltà ai siti di nidificazione di questa specie e sull'eventualità che questa caratteristica sia tramandata di generazione in generazione. Questa metodica potrà inoltre essere utile per pianificare la migliore strategia di reintroduzione di individui ricoverati in centri di recupero.

Sempre per quanto riguarda lo studio e la conservazione di specie animali protette, il Museo è poi impegnato nella caratterizzazione genetica di esemplari di chiroteri afferenti alle specie *Myotis* e *Plecotus*, tramite l'analisi filogenetica di loci mitocondriali e nucleari (García-Mudarra et al., 2009; Galimberti et al., 2012), e nell'implementazione di protocolli molecolari per il monitoraggio genetico non invasivo di felidi, quali *Felis silvestris* (gatto selvatico) e *Lynx lynx* (lince), e di mustelidi, quali *Martes martes* (martora) e *Martes foina* (faina).

Non è infine da dimenticare l'impegno del Museo per lo studio e la conservazione di specie vegetali spontanee

rare e minacciate della Valle d'Aosta. In coerenza con gli obiettivi strategici del documento programmatico Global Strategy for Plant Conservation (GSPC, 2012), nel 2016 è stata infatti istituita, all'interno del Museo e in collaborazione con il Parco Nazionale Gran Paradiso, la prima Banca del germoplasma vegetale della Valle d'Aosta. Seguendo protocolli analitici e gestionali condivisi a livello internazionale (ENSCONET, 2012), sono a oggi state raccolte e preparate 156 accessioni afferenti a 75 specie vegetali, per un totale di oltre un milione di semi conservati, e, su una parte di esse, sono state effettuate prove di germinazione per valutarne la vitalità. L'attività di conservazione ex situ, oltre a essere complementare a quella in situ per garantire il mantenimento delle risorse genetiche di una determinata specie, può essere essenziale per ripristinare o rafforzare, con progetti di reintroduzione, popolazioni estinte localmente in natura. Prove di DNA barcoding, basate sul sequenziamento di tre porzioni di DNA plastidiale e di una porzione di DNA ribosomiale nucleare (Fazekas et al., 2012), sono inoltre regolarmente svolte sulle specie vegetali conservate in Banca. Le sequenze ottenute, che a oggi ammontano a 445, oltre a essere depositate in database internazionali, quali Barcode of Life Data System (v. sito web 1), sono utili a confermare, o eventualmente a rivedere, le identificazioni svolte a livello morfologico. A tal proposito, tre popolazioni, storicamente identificate come *Potentilla pensylvanica*, non hanno avuto la conferma da un punto di vista genetico e necessitano dunque di ulteriori approfondimenti per l'attribuzione del taxon corretto. Infine, per tre specie vegetali, i.e. *Aethionema thomasianum*, *Astragalus alopecurus* ed *Epipatis palustris*, sono in fase di messa a punto protocolli basati sulla fragment analysis di loci SSR. Questi protocolli potranno essere utili per studi di genetica di popolazione, per ottimizzare le strategie di campionamento dei semi per la Banca del germoplasma e per verificare che le risorse genetiche delle accessioni conservate siano rappresentative della variabilità presente sul territorio per quella specie.

BIOTECNOLOGIE PER IL SETTORE AGROALIMENTARE E PER LA SALUTE DELLE PIANTE

In un'ottica di conservazione e valorizzazione della biodiversità agroalimentare locale, il Museo è stato coinvolto, in collaborazione con l'Institut Agricole Régional, nel progetto HEART VDA, finanziato con fondi FESR, per la caratterizzazione e la certificazione genetica di fermenti lattici autoctoni e di vecchie varietà frutticole e viticole (fig. 3). Più in dettaglio, una parte del progetto era finalizzata a individuare e selezionare fermenti autoctoni, appartenenti alle specie *Lactobacillus delbrueckii* e *Streptococcus thermophilus*, a partire da prodotti e sottoprodotti lattiero-caseari, quali latte, siero e formaggio, per la produzione di uno yogurt con determinate proprietà organolettiche

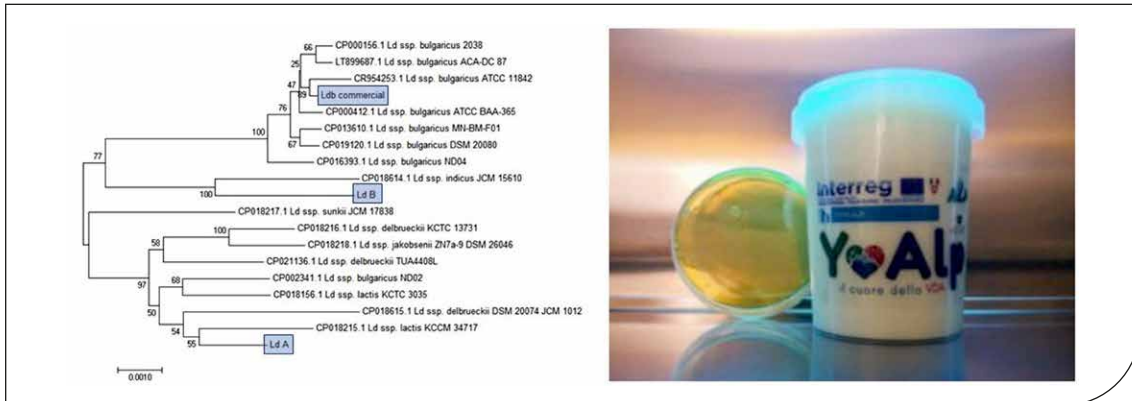


Fig. 3 Albero filogenetico basato sul sequenziamento di nove differenti loci genici, con evidenziati i ceppi di *Lactobacillus delbrueckii* autoctoni e yogurt YoAlp prodotto dall'Institut Agricole Régional con una miscela di fermenti autoctoni caratterizzati geneticamente.

e interamente legato al territorio valdostano. Tramite l'analisi Multi Locus Sequence Tagging (MLST), basata sul sequenziamento e l'analisi di loci genici (Yu et al., 2015; Song et al., 2016), di 57 isolati batterici, il laboratorio ha dunque potuto individuare e caratterizzare due aplotipi di *Lactobacillus delbrueckii* e 13 aplotipi di *Streptococcus thermophilus*, che si sono dimostrati unici, da un punto di vista genetico, rispetto ad altri ceppi commerciali e isolati conspecifici analizzati in altri studi. Questo lavoro ha quindi permesso, da una parte, di selezionare tre ceppi di batteri lattici autoctoni per la produzione di un latte fermentato con caratteristiche nutrizionali di particolare interesse e, dall'altra, di depositare un brevetto nazionale ed europeo per un nuovo ceppo di *Lactobacillus* e suoi impieghi su siero ultrafiltrato da caseificazione per potenziali applicazioni in campo dermatologico. Per ciascuno di questi ceppi, il laboratorio ha sviluppato e sta mettendo a punto un protocollo basato su real-time PCR, con sonde Simple Probe, per la loro identificazione/tracciabilità genetica da differenti matrici agroalimentari.

Il progetto HEART VDA ha inoltre previsto uno studio focalizzato sulla caratterizzazione genetica del melo Ravèntse, antica varietà autoctona della Valle d'Aosta dotata di interessanti caratteristiche organolettiche, e delle viti Fumin e Petit-Rouge, vitigni autoctoni alla base di pregiati vini valdostani. Dall'approfondita analisi di 24 loci SSR per il melo e di 12 loci SSR per la vite, è stato possibile mettere a punto un protocollo molecolare rapido per l'identificazione di queste varietà autoctone che si è dimostrato efficace anche da succo e mosto, nelle prime fasi di fermentazione. Accurati metodi di certificazione e tracciabilità genetica possono essere alla base dello sviluppo di un marchio genetico di garanzia utile a salvaguardare e valorizzare varietà agrarie autoctone che hanno caratteristiche organolettiche e/o nutraceutiche di particolare interesse. All'interno di questo stesso progetto è infine da ricordare che è stato sviluppato e messo a punto un metodo basato sull'analisi di 12 loci SSR utile per la caratterizzazione genetica di ecotipi locali di *Thymus vulgaris*. Sempre in collaborazione con l'Institut Agricole Rég-

ional e all'interno dei progetti CRT "Sei nell'alveare" e RestHalp (ALCOTRA), il Museo ha inoltre eseguito uno studio volto alla sicurezza alimentare e finalizzato alla messa a punto di un protocollo molecolare per l'identificazione della specie invasiva ed epatotossica *Senecio inaequidens* (Senecione sudafricano). Il miele prodotto in siti ubicati nell'areale di diffusione di questa specie invasiva è infatti esposto al rischio di contaminazione da polline di *S. inaequidens* e potrebbe, dunque, contenere alcaloidi tossici potenzialmente pericolosi per la salute umana. Il metodo basato su real-time PCR con sonde a idrolisi sviluppato dal Museo si è dimostrato efficace nell'individuare il DNA di questa specie da campioni di miele che, da analisi chimica, presentavano concentrazioni, seppur minime, di alcaloidi pirrolizidinici riconducibili a *S. inaequidens*.

Nell'ambito della salute delle piante, è inoltre da sottolineare che il Museo, in collaborazione con il laboratorio del Dipartimento Agricoltura, rappresenta il laboratorio ufficiale di riferimento per il monitoraggio obbligatorio di fitopatogeni da quarantena svolto annualmente dal servizio fitosanitario regionale. Il laboratorio esegue infatti prove molecolari, prevalentemente basate su real-time PCR e seguendo i protocolli diagnostici descritti dalla European and Mediterranean Plant Protection Organization (v. sito web 2), per l'identificazione di 11 differenti fitopatogeni da quarantena. Dal 2018, le prove fitosanitarie sono state svolte su oltre 450 campioni e hanno permesso di ottenere quasi 800 determinazioni. In questo contesto, il laboratorio sta inoltre procedendo all'accreditamento ISO/IEC 17025 delle prove per la diagnosi di *Grapevine flavescence dorée phytoplasma* e di *Xylella fastidiosa*. Da ricordare, infine, il coinvolgimento del laboratorio per l'identificazione, tramite DNA barcoding, di funghi coinvolti nel deperimento di foreste di *Pinus* spp. in Valle d'Aosta.

BIOTECNOLOGIE PER LA CONSERVAZIONE DEI BENI CULTURALI

Per quanto concerne l'ambito della conservazione dei beni culturali, con il Dipartimento soprintendenza per

i beni e le attività culturali della Regione, sono state attivate differenti collaborazioni sia per indagini di tipo conservativo su monumenti e aree di interesse storico, sia per indagini biologiche in siti archeologici. Per quanto concerne le indagini di tipo conservativo, è da evidenziare un approfondito lavoro di monitoraggio delle briofite presenti sull'Arco d'Augusto, monumento datato 25 a.C. e simbolo dell'Aosta romana. Dai 48 campioni raccolti e analizzati, sia tramite analisi micromorfologica sia tramite DNA barcoding di due loci plastidiali e di un locus nucleare (Fazekas et al., 2012), sono state individuate 19 differenti specie di muschi, per molte delle quali è risultato essenziale l'esito dell'identificazione su base molecolare. Tra le altre indagini di tipo conservativo è da ricordare l'identificazione tramite DNA barcoding di taxa fungini contaminanti propagatisi nell'importante sito dell'Area megalitica di Saint-Martin-de-Corléans ad Aosta.

Il Museo si è infine cimentato in prove di archeobiologia, identificando, tramite DNA barcoding, le specie di appartenenza di residui vegetali ritrovati in due differenti siti archeologici.

PROSPETTIVE

Nell'ottica di rafforzare i servizi offerti al territorio e di creare nuove sinergie e collaborazioni con enti regionali ed extraregionali, il Museo si sta inoltre impegnando nell'acquisire competenze e tecnologie nell'ambito del sequenziamento di nuova generazione (NGS). Questa tipologia di prove permetterà di effettuare studi più approfonditi, basati su whole genome sequencing e target amplicon sequencing, e di offrire nuovi servizi, in particolare quelli basati sull'analisi del DNA ambientale (eDNA). A tale proposito, in collaborazione con l'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), sono già stati intrapresi progetti legati al sequenziamento di genomi interi di razze bovine valdostane e di *Rhinolophus ferrumequinum*, specie di chiroterro di particolare interesse conservazionistico, ed è in previsione l'implementazione di un protocollo di high throughput sequencing per velocizzare e rendere più efficiente il monitoraggio genetico non invasivo del lupo.

BIBLIOGRAFIA

CANIGLIA R., FABBRI E., MASTROGIUSEPPE L., RANDI E., 2013. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Science International: Genetics*, 7(3): 397-404.

ENSCONET, 2012. Curation Protocols and Recommendations. *Studi Trentini di Scienze Naturali*, 90: 249-289.

FABBRI E., MIQUEL C., LUCCHINI V., SANTINI A., CANIGLIA R., DUCHAMP C., WEBER J.-M., LEQUETTE B., MARUCCO F., BOITANI L., FUMAGALLI L., TABERLET P., RANDI E., 2007. From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16(8): 1661-1671.

FAZEKAS A.J., KUZMINA M.L., NEWMASER S.G., HOLLINGSWORTH P.M., 2012. *DNA Barcoding Methods for Land Plants*. In: Kress W.J., Erickson D.L. (eds.), *DNA Barcodes. Methods and Protocols*. Humana Press, pp. 223-252.

FRANCISCO L.V., LANGSTON A.A., MELLERSH C.S., NEAL C.L., OSTRANDER E.A., 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7(5): 359-362.

GALIMBERTI A., SPADA M., RUSSO D., MUCEDDA M., AGNELLI P., CROTTINI A., FERRI E., MARTINOLI A., CASIRAGHI M., 2012. Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in Echolocating Bats: A Bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. *PLoS One*, 7(6): e40122.

GARCÍA-MUDARRA J.L., IBÁÑEZ C., JUSTE J., 2009. The Straits of Gibraltar: barrier or bridge to IberoMoroccan bat diversity? *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(2): 434-450.

GSPC, 2012. *Global Strategies for Plant Conservation. A guide to the GSPC. All the targets, objectives and facts*. Botanic Gardens Conservation International, Richmond (UK), 36 pp.

LUCCHINI V., FABBRI E., MARUCCO F., RICCI S., BOITANI L., RANDI E., 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11(5): 857-868.

MAFFEI G., BARONI D., BOCCA M., 2018. *Uccelli nidificanti in Valle d'Aosta. Distribuzione, ecologia, fenologia, conservazione*. Testolin Editore, Sarre (AO), 421 pp.

MARUCCO F., LA MORGIA V., ARAGNO P., SALVATORI V., CANIGLIA R., FABBRI E., MUCCI N., GENOVESI P., 2020. *Linee guida e protocolli per il monitoraggio nazionale del lupo in Italia. Realizzate nell'ambito della convenzione ISPRA - Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare per "Attività di monitoraggio nazionale nell'ambito del Piano di Azione del lupo"*. ISPRA e Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, 98 pp.

NEFF M.W., BROMAN K.W., MELLERSH C.S., RAY K., ACLAND G.M., AGUIRRE G.D., ZIEGLE J.S., OSTRANDER E.A., RINE J., 1999. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics*, 151(2): 803-820.

ORTEGA J., FRANCO M.R., ADAMS B.A., RAILS K., MALDONADO J.E., 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics*, 5(5): 715-718.

SONG Y., SUN Z., GUO C., WU Y., LIU W., YU J., MENGHE B., YANG R., ZHANG H., 2016. Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. *Scientific Reports*, 6: 22704.

YU J., SUN Z., LIU W., XI X., SONG Y., XU H., LV Q., BAO Q., MENGHE B., SUN T., 2015. Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC Microbiology*, 15: 236.

Siti web (ultimo accesso 01.08.2023)

- 1) BoldSystems, Barcode of Life Data System
<https://www.boldsystems.org/>
- 2) European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO Standards
https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards