



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari

Indirizzo: Agrometeorologia ed ecofisiologia dei sistemi agrari e forestali

CICLO XXVIII

**STUDIO DELL' INFLUENZA DELLE VARIABILI
AGROMETEOROLOGICHE SULLA DIVERSITÀ GENETICA
IN *MYRTUS COMMUNIS***

dr. Caterina Mele

Direttore della Scuola

prof. Antonello Cannas

Referente di Indirizzo

prof. Donatella Spano

Docente Guida

prof. Maurizio Mulas

Co-tutor

dott.ssa Lucia Corona

Anno accademico 2014-2015



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari



Indirizzo: Agrometeorologia ed ecofisiologia dei sistemi agrari e forestali

CICLO XXVIII

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in “Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari” dell’Università degli Studi di Sassari, a.a. 2014/2015 - XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Caterina Mele gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1.)

Anno accademico 2014-2015

Caterina Mele

*Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in Myrtus communis.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali*

INDICE

1. <u>Riassunto</u>	1
2. <u>Abstract</u>	2
3. <u>Introduzione</u>	3
3.1. La specie <i>Myrtus communis</i> L.	3
3.2. La classificazione botanica	5
3.3. Utilizzo del mirto	8
3.4. Il percorso di domesticazione della specie	11
3.5. I marcatori molecolari per la caratterizzazione delle risorse genetiche	14
3.6. Caratterizzazione della diversità genetica del mirto	21
3.7. Variabilità genetica ed influenza degli ecosistemi	26
4. <u>Obiettivi della ricerca</u>	30
5. <u>Materiali e Metodi</u>	32
5.1. Campionamento del materiale vegetale	32
5.2. Analisi genetiche	33
5.3. Dati climatici	42
6. <u>Risultati</u>	47
6.1. Dati climatici	47
6.2. Analisi statistica dati genetici	54
6.3. Influenza dei fattori ambientali sulla variabilità genetica	61
7. <u>Discussione</u>	66
8. <u>Conclusioni</u>	77
9. <u>Bibliografia</u>	80

1. Riassunto

Il *Myrtus communis* L., è un arbusto sempreverde tipico della macchia Mediterranea. In questo lavoro viene descritto l'utilizzo di 14 coppie di marcatori SSR (Simple Sequence Repeat) per valutare la diversità genetica presente in alcune popolazioni di mirto sarde e la sua correlazione con alcune caratteristiche ambientali e climatiche. Sono stati definiti i profili genetici di 22 suddiviso in 400 accessioni selvatiche e 65 candidate cultivar. L'analisi con gli SSR ha dimostrato la presenza di un elevato polimorfismo (il 93% dei loci era polimorfico).

L'analisi con STRUCTURE ha determinato la distribuzione delle popolazioni di mirto in due principali gruppi genetici ($K=2$). L'analisi della distribuzione della diversità genetica nelle popolazioni esaminate mostra un gradiente di distribuzione del mirto da nord a sud, che sembra condizionato dalla forma allungata del territorio della Sardegna, e uno da ovest a est, che riflette la distribuzione delle montagne sarde nell'area centrale.

Il Mantel test parziale ha mostrato una correlazione positiva tra la distanza genetica e la temperatura media, mentre non vi è nessuna correlazione della distanza genetica con la temperatura minima e quella massima e le precipitazioni medie.

In conclusione le accessioni selvatiche sono risultate ben differenziate da quelle coltivate. Il livello della variabilità genetica era complessivamente alto. I dati genetici sono compatibili con il sistema di impollinazione del mirto che include sia l'impollinazione da parte di insetti che l'autoimpollinazione.

Questo lavoro rappresenta il primo passo per caratterizzare da un punto di vista genetico e ambientale, il germoplasma di mirto sardo.

2. Abstract

Myrtus communis L. is an evergreen shrub of the Mediterranean maquis. This work reported the use of Simple Sequence Repeats (SSR) markers (14 primers pair) to assess the genetic diversity within some Sardinian population and the correlation of this diversity with some environmental and climate characteristics. I defined the genetic profiles of 22 population divided in 400 wild accessions and 65 candidate cultivar. SSR analysis attested an high polymorphism level (93% of the loci analyzed).

STRUCTURE analysis divided the myrtle population into two main genetic groups (K=2). The analysis of the genetic diversity distribution in the populations examined, displayed a geographical gradient from north to south, which reflects the Sardinian shape, and from west to east, which reflects the Sardinian mountain distribution.

The partial Mantel test found a positive correlation between mean temperature and genetic distance, but none between minimum and maximum temperature and mean precipitation.

In conclusion, the wild accessions were well differentiated than candidate cultivars. The level of genetic variability was high. The genetic data confirmed that myrtle has a mixed pollination system, including both out-pollination by insects and self-pollination. This work represents the first attempt to characterize the myrtle Sardinian germplasm from a genetic and environmental point of view.

3. Introduzione

1.1 La specie *Myrtus communis* L.

Il nome “mirto” deriva dal greco *myrtos*, *myrtus* in latino, che significa essenza profumata (Bubani, 1869). Tutta la tradizione mediterranea è intessuta di leggende e di credenze su questa pianta. Nella mitologia i nomi di molte eroine o amazzoni avevano la stessa radice del mirto: Myrtò, Myrine, Myrsine, Myrtilla.

Myrtò era un’amazzone che, secondo la tradizione, combatté, insieme ad altre compagne, l’eroe attico Teseo (Dimundo, 2000). Lo era anche un’altra donna-mirto, Myrine, regina delle amazzoni di Libia, di cui Diodoro Siculo narra una serie d’imprese compiute lungo la fascia costiera mediterranea (Ferretti, 2008).

Non come amazzone, ma come guerriera veniva ricordata Myrsine, la coraggiosa fanciulla attica che venne uccisa per invidia dal giovane battuto nei giochi ginnici. Atena, dea della sapienza, della saggezza, della arti e della guerra, impietosita dalla triste morte della fanciulla, la trasformò in un arbusto odoroso (Rocchi, 2002).

Accanto alle eroine amazzoni appare anche una profetessa del santuario di Dodona, Myrtilla, che per un incauto responso, finì in un lebete pieno di acqua bollente (Prestianni Giallombardo, 2002).

Questo rapporto, tra mirto e amazzoni, è solo uno dei tanti esempi del legame esistente tra questa pianta e la femminilità. Il mirto, infatti, fu associato, dall’Italia fino al vicino Oriente, a divinità femminili come Ishtar, Afrodite, Artemide, Soteira e alla dea etrusca Turan (Cellini, 2004).

Il mirto non era solo legato alla femminilità, ma era il simbolo dell’amore per eccellenza, nelle sue varie manifestazioni: l’amore passionale, quello coniugale, quello casto e innocente e quello spirituale (Cattabiani, 1996).

Roma era considerata la “città del mirto” per eccellenza, in quanto questa pianta esisteva già sul territorio su cui essa fu fondata. Secondo Plinio: “*Per questo motivo la*

tradizione dice che i Romani e i Sabini, dopo la battaglia causata dal rapimento delle vergini, deposte le armi, si purificarono con rami di mirto nel luogo dove ora sorgono le

statue di Venere Cluacina. Infatti presso gli antichi, cluere significa purificare". Sempre Plinio reputa che il mirto sia stato il primo albero ad essere piantato nei luoghi pubblici, poiché Venere sovrintendeva non solo alle unioni coniugali, ma anche a quelle politiche, offrendo la sua benefica energia di pace.

Il mirto era anche una pianta funeraria. Nell'antica Grecia si diceva che quando Dionisio scese nell'Ade per liberare sua madre Semele, incenerita dalla folgore di Zeus, aveva dovuto lasciare in cambio una pianta di mirto. Questo è il motivo per cui qualcuno attribuisce al mirto un significato funereo e usa decorare i sepolcri con i suoi rami (Cattabiani, 1996).

Il mirto accompagnava, quindi, l'uomo dalla nascita alla morte, simboleggiando il prolungamento della vita nell'aldilà.

Nel corso dei secoli, alle varie preparazioni delle foglie e dei frutti del mirto, sia per uso interno che esterno, sono state attribuite diverse proprietà. L'infuso delle foglie raccolte tra giugno e luglio, vantava proprietà stimolanti la digestione, disinfettanti, balsamiche, curative delle bronchiti e delle diarree infantili. Per uso esterno veniva utilizzato per irrigazioni vaginali, per le stomatiti e le piaghe cutanee, mentre l'infuso, il decotto e il vino medicato dei frutti raccolti in autunno avevano proprietà rinfrescanti, balsamiche, astringenti ed emostatiche. Dall'intera pianta poi si ricavava, per distillazione, un preparato denominato "acqua d'oro" che veniva utilizzata per le gengiviti, pelli screpolate e contusioni.

Ippocrate prescrive alle donne affette da afte ed ulcere ai genitali, irrorazioni con acqua di mirto o con vino che sia stato cotto nel mirto (Gréco, 1995).

Plinio ricorda l'olio di mirto con cenere di lepre per arrestare la caduta dei capelli, o con cenere di zoccolo di mulo per chiudere le chiazze alopeciche (Baraldi *et al.*, 2004).

L'uso del mirto in cucina è diffuso sin dagli antichi romani. Plinio indica la salsa di bacche di mirto come perfetta per accompagnare il maiale arrosto. E' lo stesso Plinio, insieme a Dioscoride e Columella, a citare il "vino di mirto" descritto come un "*macerato di bacche in un buon mosto d'uva, con aggiunta di miele*". Questa miscela aromatica e

dolcissima si usava a volte per migliorare uve poco zuccherine e ottenere vini più alcolici. In Sardegna il brodo di mirto veniva usato anticamente per cucinare il pesce. In questo modo si conservava meglio e lo si poteva trasportare per il commercio.

Già nella Mesopotamia del II millennio a.C. si era soliti ungersi con olio profumato al mirto in quanto considerato fonte di salute e di benessere. In epoca romana Plinio annota l'utilizzo dell'olio di mirto con cenere di corno di capra contro l'eccessiva sudorazione. Successivamente nel Medioevo, gli speziali, ricavavano dalle cortecce, dalle foglie e dai fiori del mirto un distillato chiamato "acqua angelica" che veniva utilizzata come lozione cosmetica nella preparazione delle saponette. Infine lo stesso legno del mirto, duro, compatto e di grana fine, veniva utilizzato per lavori di torneria ed intaglio oppure come buon combustibile in quanto fornisce un ottimo carbone.

1.2 La classificazione botanica

La specie *Myrtus communis*, dialipetala e dialisepala, appartiene alla famiglia delle Myrtaceae, che comprende 75 generi e circa 3000 specie ed è inquadrata nell'ordine delle Myrtales (Camarda e Valsecchi, 2008). Tra quelli appartenenti alla famiglia delle Myrtaceae, il genere *Myrtus*, con la sola specie *Myrtus communis*, è l'unico ad essere presente, allo stato spontaneo, in Europa (Fiori, 1925; Picci e Atzei, 1996).

Nell'ambito della specie *Myrtus communis* vengono distinte due sottospecie: subsp. *communis* (= *M. communis sensu Parlato*, = var. *typical* Paoletti, = subsp. A. Fiori); subsp. *tarentina* (L.) Nyman (= *Myrtus communis* varietà *tarentina*, = *Myrtus tarentina* L., = *Myrtus tarentina* (L.) Miller).

Myrtus communis subsp. *communis* rappresenta la sottospecie tipica. Si caratterizza per avere internodi lunghi, foglie non decussate di grandi dimensioni, fiori lungamente pedicellati, calice a lobi acuti, corolla più grande, bacca ellissoidale o ovoidale (Parlato, 1842; Paoletti, 1900; Fiori, 1925).

A tale sottospecie appartengono le diverse varietà che sono state distinte per la dimensione e la forma delle foglie e dei fiori:

- la varietà *communis* (= varietà *italica*). Si caratterizza per avere rami suberetti o dritti, foglia largamente ovato-acuta o ovato-lanceolata ad apice acuminato larga 10-15 mm, petali per lo più 7-8; e stami lungamente sporgenti. Questa varietà comprende inoltre, tra le altre, due forme che sono la v. *albo-malginata* (a foglia variegata di bianco) e la v. *nana-multiflora* (forma nana, ricca di fiori);
- la varietà *romana*. Presenta foglie ovate, brevemente acute, grandi e di colore verde chiaro. Sono spesso disposte in verticilli e sono larghe 30-35 mm. Questa varietà comprende solo la forma *f. variegata* caratterizzata dall'aver foglie marginate di colore bianco argento;
- la varietà *boetica*. Le sue caratteristiche sono i rami corti, la foglia ovato-lanceolata di circa 20 mm, i petali grandi, gli stami lungamente sporgenti e il frutto grande;
- la varietà *lusitanica*. Si presenta come un arbusto basso a rami patenti, con foglie ovato-lanceolate, strette e con fiori aventi cinque o sei petali e stami appena sporgenti.

Myrtus communis subsp. *tarentina* è un arbusto più basso della sottospecie *communis*, caratterizzato dalla presenza di internodi più corti, foglie addensate e decussate su 4 file di dimensioni più piccole (10-15 x 3-7 mm). I fiori si presentano pedicellati con calice a lobi arrotondati e cigliati, la corolla è piccola con petali cigliati e le bacche sono sferiche o sub globose (Fiori, 1925). Questa comprende le seguenti varietà: la varietà *tarentina*, che presenta rami irti e foglie ovali o ovato-lanceolate; la varietà *microphylla*, caratterizzata da foglie lanceolate o lineari-lanceolate e di colore verde scuro.

In base al colore della bacca sono state distinte altre due varietà appartenenti alla varietà *communis* o *tarentina*: la varietà *melanocarpa*, che si caratterizza per avere le bacche di colore nero bluastra o rossicce a completa maturazione; la varietà *leucocarpa* che si caratterizza per avere le bacche bianche a completa maturazione.

Nell'area di Macchiarèddu (Cagliari), nell'ambito della varietà *communis* sono state descritte altre due sub varietà, distinguibili per la forma e per il colore della bacca: sub varietà *globosa*, a bacca sub-globosa (o globosa o ovato-oblunga), che comprende a sua volta due forme: la forma *genuina*, a bacca nero-bluastra (6.5-7,5 x 6,5-8,5 mm), e la forma *macrocarpa* a bacca nero-bluastra grande (9-10 x 10-11 mm); sub varietà *oblonga* a bacca ellittica, comprendente a sua volta la forma *vera* a bacca nero-bluastra (6-8 x 8-11 mm) e la forma *grandis*, a bacca nero-bluastra grande (7-10 x 12-15 mm) (Pampanini, 1940).

Il mirto ($2n=22$) è un arbusto cespuglioso o alberello sempreverde di altezza variabile da 0,5 a 5 m con portamento assurgente (Canhoto *et al.*, 1999). I rami sono eretti e da giovani sono tetragoni. La corteccia è di colore marrone scuro o rossastro e con l'invecchiamento tende ad assumere un colore cenerino. Le foglie sono coriaceo-persistenti, opposte e talvolta decussate su 4 file, più raramente in verticilli trimeri con le inferiori talvolta alterne. Sono di colore verde intenso, lucide sulla pagina superiore, più chiare in quella inferiore. La nervatura centrale è bene evidente, mentre quelle laterali sottili e ricche di ghiandole aromatiche e le stipole sono sostituite da un cuscinetto di setole rossastre.

I fiori sono ermafroditi, pedicellari, bianchi o rosati, isolati all'ascella delle foglie e profumati, il ricettacolo è obconico e il calice è dialisepalo costituito da cinque sepali patenti, dove sono presenti numerose ghiandole aromatiche. La corolla è dialipetala ed è costituita da cinque petali (talvolta si può arrivare fino a 15 per trasformazione degli stami) di forma obovato-rotundata, concavi, cigliato-ghiandolosi al margine con ghiandole aromatiche, lunghi il doppio del calice. Gli stami sono numerosi e appariscenti di colore bianco, con antera di colore giallo. L'ovario è infero ed è costituito da tre logge e lo stilo è filiforme (Mulas *et al.*, 2000; Mulas *et al.*, 2001).

Il frutto è una bacca carnosa di varia forma (globosa, ellittica, ovoidale, piriforme, globoso-ellittica) ed è sormontata da residui dei lobi calicini. Questi ultimi possono essere più o meno evidenti con aspetto chiuso, semiaperto o aperto. La buccia è pruinosa, sottile, di colore nero, brunastra-rossastra o bianca e a maturità, facilmente separabile dalla polpa. La polpa è bianco crema, consistente, di sapore acidulo ed astringente nei frutti non completamente maturi, aromatica con retrogusto resinoso in quelli maturi. All'interno della bacca sono presenti da 1 a 8 semi per loggia. Essi sono di colore biancastro, aspetto lucente, reniforme e sono facilmente separabili dalla polpa (Scortichini, 1986; Picci e Atzei, 1996).

La ripresa vegetativa avviene, generalmente, tra la fine di marzo e i primi di aprile con un anticipo di due-tre settimane nelle regioni a clima mite. Essa ha inizio con la schiusura delle gemme apicali, cui segue la formazione delle nuove foglioline e l'allungamento dei germogli neoformati. Nel contempo la parte inferiore del rametto conserva le foglie formatesi l'anno precedente. La loro caduta avviene una volta

completato il ciclo. L'accrescimento vegetativo continua nei mesi di aprile, maggio e giugno. Nei mesi estivi, a seguito delle temperature elevate e la mancanza di precipitazioni, le piante cessano di accrescersi e vanno in stasi. Questa viene interrotta a settembre-ottobre quando si verificano abbondanti precipitazioni e temperature miti. L'accrescimento vegetativo interessa le parti distali dei germogli dell'anno e si protrae fino alla prima quindicina di novembre. Con l'approssimarsi dell'inverno le temperature si abbassano, le piante cessano la crescita della parte epigea e vanno in riposo (Mulas *et al.*, 2000; Mulas *et al.*, 2001; Mulas, 2012).

La differenziazione a fiore avviene sui rami dell'anno ancora in accrescimento ed interessa le porzioni medio basali. L'emissione dei peduncoli fiorali inizia verso metà maggio; da giugno ad agosto avviene la schiusura dei fiori, la loro allegazione e la formazione dei frutticini. In alcuni casi si può avere una fioritura autunnale o invernale che avviene sulle porzioni apicali dei germogli dell'anno. Questi fiori possono dare origine a frutti in grado di maturare regolarmente.

L'impollinazione è sia anemofila che entomofila (González-Varo *et al.*, 2009). I fiori originano frutti inizialmente di colore verde. Tra fine agosto e i primi di settembre si ha la loro invaiatura e in seguito assumono un colore violaceo. La maturazione della maggior parte dei frutti avviene in novembre-dicembre, quattro o cinque mesi dopo la fioritura (Picci e Atzei, 1996; Chessa e Nieddu, 2005).

La disseminazione dei semi avviene ad opera degli uccelli che si alimentano con le bacche mature (Traveset *et al.*, 2001).

1.3 Utilizzo del mirto

Il Mirto è stato tradizionalmente impiegato per una grande varietà di usi. Presenta caratteristiche interessanti in termini di rinaturalizzazione delle aree degradate, come mangime per il bestiame e come pianta ornamentale. Recentemente, infatti, è stato riscoperto l'uso di piante autoctone, come è il mirto in Sardegna, nella riprogettazione delle aree verdi, dovuto al loro elevato adattamento alle condizioni ambientali, con ridotto fabbisogno di acqua e manutenzione, resistenza alle malattie e all'inquinamento. Il suo

valore ornamentale è dato dall'alto grado di ramificazione che lo porta ad avere una forma compatta e una ricchezza di fiori e frutti che lo rendono piacevole alla vista. Risulta quindi adatto alla coltivazioni in vaso o in piccoli spazi (Cervelli e De Lucia, 2004).

Quest'arbusto denota anche un uso multifunzionale che permette un impiego aggiuntivo nella produzione di sostanze come cosmetici e medicinali grazie alla ricchezza in oli essenziali, resine e antiossidanti (Cannas *et al.*, 2013; Zomorodian *et al.*, 2013; Al Lahame e Al Fadel, 2013; Ben Ghnaya *et al.*, 2013; Sepici-Dincel *et al.*, 2007). L'olio essenziale di mirto è noto per le sue proprietà antisettiche e balsamiche ed è particolarmente adatto per la cura delle malattie respiratorie. L'olio essenziale viene utilizzato nella formulazione di sciroppi per la tosse e gocce balsamiche. Un uso cosmetico è anche menzionato per la produzione di profumi (Magherini *et al.*, 1988). Estratti e olio di mirto mostrano una interessante attività antiossidante, soprattutto durante la fase di piena fioritura (Yadegarinia *et al.*, 2006). Nella medicina popolare si utilizzano le foglie per le proprietà balsamiche, antinfiammatorie, antiemorroidiche, diuretiche e cicatrizzanti.

Nell'industria le foglie, ricche di tannino, sono utilizzabili per la concia di pelli e cuoio; l'essenza derivante dalla distillazione ed ebollizione si può usare per colorare stoffe e lane. Dalle foglie e dal legno si estrae il furfurolo impiegato nella produzione di materie plastiche. Il legno di mirto è resistente e viene usato per produrre cestini, nasse per la pesca e ceste per conservare il pesce.

Nel campo della cosmesi, l'essenza di mirto è usata come tonico per la pelle e per prevenire la caduta dei capelli. Infine, le fronde sono usate per ornare pietanze o per la composizione dei mazzi floreali.

In Sardegna, la principale utilizzazione industriale del mirto è la produzione del tipico liquore. L'infusione in alcol delle bacche mature (Mirto rosso), o delle foglie (Mirto bianco) ha registrato nell'ultimo trentennio una costante crescita. Oggi la produzione di queste bevande alcoliche è una risorsa economica importante per l'Isola, data dai 4 milioni di bottiglie prodotte ogni anno in modo artigianale o industriale (Mulas, 2012).

Allo stato attuale, la raccolta delle bacche viene effettuata su popolazioni spontanee presenti nel territorio nazionale. Tuttavia, ciò non riesce a soddisfare pienamente il costante aumento della domanda di bacche e foglie da parte dell'industria liquoristica sarda. Per questo motivo, alcune industrie di trasformazione, in passato, hanno fatto ricorso

all'importazione da alcuni Paesi dell'Africa Settentrionale (Marocco, Tunisia). Nell'annata 1992-93, ad esempio, l'Osservatorio Fitopatologico ha registrato un'importazione di 100 q di bacche di mirto, verso la Sardegna.

Nel 1994, con il patrocinio dell'Unione Europea e della Confindustria Sardegna, quattro produttori di liquore di Mirto hanno fondato l'"Associazione Produttori Liquore di Mirto Tradizionale". Tale Associazione ha lo scopo di *“tutelare, razionalizzare e valorizzare la produzione del liquore di Mirto, sia come materia prima sia come metodo di lavorazione, nell'interesse del consumatore finale”*. A tal fine, avvalendosi della collaborazione di due enti scientifici quali l'Università degli Studi di Sassari e l'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, si è dato inizio ad un lavoro di ricerca lungo e complesso, la cui fase finale è rappresentata dalla redazione di un "Disciplinare di Produzione" che definisce i parametri qualitativi del liquore di mirto (<http://www.produttorimirtodisardegna.it/html/associazione-e-ricerca-it.html>).

1.4 Il percorso di domesticazione della specie

Anche se il Mirto non è classificato come una specie in pericolo di estinzione, la raccolta indiscriminata di biomassa da piante spontanee di mirto, insieme al vincolo, da parte dei produttori certificati, di utilizzare esclusivamente mirto sardo, ha stimolato una conseguente pressione antropica nei confronti dell'evoluzione naturale di questo arbusto (Mulas *et al.*, 1998a). Spesso, infatti, il raccogliitore occasionale, con lo scopo di massimizzare la materia prima raccolta nel più breve periodo possibile, effettua dei tagli considerevoli sulla chioma della pianta in modo non razionale. Questi interventi, se effettuati senza precisi criteri, influenzano negativamente lo sviluppo vegetativo e produttivo delle popolazioni spontanee e le interazioni con le altre specie della macchia mediterranea. A ciò si aggiungono altri elementi di rischio ecologico delle formazioni spontanee di mirto: gli incendi che interessano vaste aree della macchia Mediterranea, il pascolamento, in particolare delle capre che si nutrono dei teneri germogli, l'utilizzo da parte di erbivori selvatici e l'uso della pianta per la raccolta di legna da ardere (Mulas *et al.*, 1998b)

Tutte queste considerazioni fanno emergere la necessità di avere maggiori produzioni con un livello di qualità elevato e costante. E' chiaro, dunque, che non è possibile fare affidamento sul materiale spontaneo, ma è necessario intraprendere la strada della domesticazione di questa pianta, e quindi della sua coltivazione, in modo da salvaguardare le risorse naturali che costituiscono una importante fonte di germoplasma per la domesticazione, oltre ad assicurare standard quantitativi e qualitativi alle imprese di trasformazione (Mulas, 2012)

Il programma di domesticazione del mirto prevede diversi obiettivi specifici (Mulas *et al.*, 1999; Mulas, 2007; 2009; 2012):

- migliorare le conoscenze sulla biologia del *Myrtus communis*, in particolare riguardo la fenologia e il ciclo di allegazione e maturazione dei frutti;
- ottimizzare la tecnica di propagazione per seme e agamica;
- valutare gli elementi di variabilità presenti nelle popolazioni spontanee, con lo scopo di individuare i caratteri morfologici più utili per la coltivazione intensiva del mirto, attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari;

- avviare una selezione di individui “prescelti” per particolari pregi, inizialmente in situ e successivamente propagati per via agamica in campo collezione.

La propagazione

La messa a punto di un'adeguata tecnica di propagazione è uno degli strumenti fondamentali per lo sviluppo di un programma di selezione varietale e domesticazione di una specie vegetale. La propagazione del mirto viene fatta: per seme, per talea legnosa o semilegnosa e tramite micropropagazione.

La propagazione per seme è l'unica tecnica utilizzata per la produzione di piante per la forestazione. La temperatura ottimale di germinazione del seme è compresa tra 20 e 27,5 °C. Con quest'ultima temperatura l'emissione dell'epicotile avviene tra i 7 e i 17 giorni con una percentuale di germinazione del 95-100%. In Sardegna tale temperatura si riscontra a partire da aprile-maggio fino a settembre-ottobre, tuttavia, nei mesi primaverili-estivi la germinazione è contrastata dalla scarsa umidità del suolo, per cui il periodo ottimale di geminazione allo stato spontaneo coincide con settembre-ottobre, alla ripresa delle piogge autunnali (Khosh-Khui e Bassiri, 1976; Mitrakos, 1981).

Per garantire al seme una più pronta germinazione ed eliminare fenomeni di dormienza, questo viene sottoposto a vari trattamenti (Ellis *et al.*, 1985; Khosh-Khui e Bassiri, 1976). Tra questi si ricordano: pretrattamento al freddo (1-5 °C) per 30-60 giorni; scarificazione con carta abrasiva; immersione in acqua per 24 ore; scarificazione con acido solforico a freddo: immersione in acido solforico (soluzione al 100%) per 60 minuti e immersione in acido solforico (soluzione all'80%) per 120 minuti. La progenie che si ottiene è caratterizzata da una elevata variabilità nel portamento, nel periodo di maturazione delle bacche, nella forma e nel colore delle stesse.

La propagazione per talea è utilizzata per scopi ornamentali. Si possono propagare talee legnose prelevate in novembre-dicembre (Dahab *et al.*, 1975) oppure talee semilegnose prelevate a fine luglio-primi di agosto (Kapelev e Kirmanova, 1977). Una tecnica di moltiplicazione per talea legnosa prevede un trattamento con acido clorofenossiacetico, crescita in ambiente con temperatura media di 22 °C su substrato al 21% della sua capacità di ritenzione idrica. Con l'uso di talee semilegnose, prelevate nel periodo primaverile-estivo, la radicazione avviene con una temperatura dell'aria e del

substrato di 21 °C, con un intensità luminosa di 5000-6000 lux (Komissarov, 1962). Il substrato per la radicazione deve essere costituito da sabbia; anche substrati di terriccio di corteccia hanno fornito buoni risultati (Wisnieska e Marcinkowsky, 1976). L'uso del *mist* con talee prelevate a fine luglio e trattamento con Acido Indol Butirrico (IBA) in soluzione idroalcolica su substrato di agriperlite fornisce buoni risultati di radicazione (60-70%). La subirrigazione con soluzione nutritiva nel substrato di radicazione incrementa la percentuale di radicazione (Riehl, 1962).

Il mirto si propaga facilmente anche mediante micropopagazione (Khosh-Khui *et al.*, 1984). I meristemi crescono bene anche nel mezzo di coltura MS (Murashige e Skoog, 1962) costituito da macro e microelementi, acido nicotinico 0,5 mg/l, piridossina 0,5 mg/l, tiamina 0,1 mg/l, glicina 2.0 mg/l, inositolo 100 mg/l, saccarosio 30 mg/l, benziladenina 1,5 mg/l, acido naftalenacetico (NAA) 0,1 mg/l, e Bacto-agar 8 g/l, pH 5,6-5,8.

Per la crescita dei germogli sono particolarmente adatti i meristemi prelevati dalle porzioni nodali rispetto a quelli apicali.

Per la differenziazione delle radici i germogli neoformati vengono trapiantati nel substrato MS (mezza forza 50% MS più 50% di acqua distillata sterile) con l'aggiunta di vitamine e di ormoni di radicazione (dibenziladenina, BA, 0,5 mg/l e di acido naftalenacetico 0,4-0,6 mg/l) (Ruffoni *et al.*, 1994).

Per l'adattamento delle piantine radicate in vitro all'esterno, queste vengono trapiantate in un terreno sterilizzato, trasferite in serra cercando di tenere l'umidità relativa prossima al 100%. Dopo due settimane inizia la fase di adattamento all'ambiente esterno per poter poi essere trasferite in pieno campo.

La selezione varietale

Il lavoro di selezione, iniziato nel 1995, ha riguardato una popolazione di oltre 130 accessioni provenienti dalla flora spontanea, da cui sono state ottenute 40 linee varietali attraverso i passaggi della propagazione agamica, valutazione delle pre-selezioni in campo di confronto varietale e successiva descrizione e caratterizzazione bio-morfologica e agronomica (Mulas *et al.*, 2002a). Molte di queste selezioni sono oggi sufficientemente coltivate in campi di confronto e per alcune è stato realizzato un programma di diffusione commerciale attraverso la propagazione in vitro.

Un ulteriore gruppo di selezioni, è stato ottenuto da una popolazione di semenzali derivanti da libera impollinazione, da cui sono state selezionate e descritte 20 piante madri. Anche in questo caso da ciascuna delle piante madri sono state ottenute linee clonali pure attraverso la propagazione agamica, sulle quali sono in corso ulteriori verifiche di tipo bioagronomico.

Le cultivar sono state allevate con forma libera nel campo collezione dell'Azienda Didattico Sperimentale di Ateneo "Antonio Milella" del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università degli Studi di Sassari, situato a Oristano nella zona centro-occidentale della Sardegna, con una distanza tra le file di 3,15 m sulla fila di 1 m, con irrigazione di soccorso (1200 m³) e gestito con l'inerbimento totale (Mulas, 2012; Mulas *et al.*, 2002b).

1.5 I marcatori molecolari per la caratterizzazione delle risorse genetiche

I marcatori genetici

Un marcatore genetico ideale deve presentare un alto livello di variabilità, deve essere multiallelico, codominante (in grado di discriminare gli omozigoti dagli eterozigoti), non epistatico (la manifestazione di un locus non deve essere influenzata dall'informazione genetica presente in un'altra zona del genoma) e non deve essere influenzato dall'ambiente (Tanksley, 1983).

Sulla base delle diverse caratteristiche i marcatori genetici vengono classificati in:

- marcatori morfo-fenologici;
- marcatori biochimici;
- marcatori molecolari.

Il primo gruppo viene utilizzato per analisi fenotipiche. Questo tipo di marcatori non risponde alle caratteristiche sopra elencate e infatti presentano degli svantaggi: hanno un basso livello di polimorfismo; sono influenzati dall'azione dell'ambiente e perciò difficilmente stabili; molti di essi necessitano di un determinato stadio della pianta, per poter essere rilevati (Tanksley, 1983).

L'unico vantaggio dei marcatori morfologici consiste nella semplicità del

rilevamento, che non richiede strutture di laboratorio, attrezzature sperimentali e reagenti.

I marcatori biochimici o proteici si basano sull'analisi di isoenzimi e proteine enzimatiche. Gli isoenzimi sono forme diverse di un medesimo enzima con la stessa specificità di substrato. Tale polimorfismo dipende da mutazioni che hanno portato alla formazione di serie alleliche multiple allo stesso locus (Barcaccia *et al.*, 2000).

I marcatori molecolari si basano sull'analisi del DNA, rivelando punti di variabilità dello stesso (Jones *et al.*, 1997; Winter e Kahl, 1995). Essi rappresentano, per la ricerca, degli strumenti eccezionali, poiché consentono di identificare specifiche sequenze nucleotidiche e pertanto di analizzare i polimorfismi di particolari geni o regioni cromosomiche.

Tali differenze (polimorfismi) sono dovute ad inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni e mutazioni puntiformi (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Il potere discriminante di questi loci si basa sull'individuazione di variazioni a livello della sequenza nucleotidica, maggiore è il numero dei polimorfismi, maggiore sarà il potere discriminante del marcatore (Barcaccia e Falcinelli, 2006). Rispetto ad altri marcatori genetici i marcatori molecolari presentano numerosi vantaggi, in quanto: I) coprono qualsiasi parte del genoma (trascritta e non, comprendente quindi anche regioni di regolazione) e consentono pertanto di rilevare differenze anche tra individui geneticamente molto simili ma indistinguibili fenotipicamente; II) non subiscono interferenza da parte dell'ambiente e dallo stadio di sviluppo della pianta, trattandosi di differenze a livello del DNA; III) non presentano effetti epistatici o pleiotropici e in molti casi sono codominanti, consentendo di distinguere gli omozigoti dagli eterozigoti; VI) nella maggior parte dei casi i polimorfismi molecolari sono neutri, vale a dire che non hanno effetti a livello fenotipico se non quello di permettere di determinare il genotipo; VII) le analisi sono automatizzabili; VII) presentano eredità Mendeliana (Sias, 2006).

Se i marcatori molecolari permettono di identificare individui omozigoti ed eterozigoti si dicono codominanti; quelli che danno invece luogo solo a situazioni di presenza/assenza si dicono dominanti.

Pur possedendo tutti questi vantaggi, presentano alcuni limiti: I) difficoltà di analisi; II) costo in alcuni casi ancora elevato; III) tempi a volte troppo lunghi; IV) necessità di conoscenze preliminari (sequenze).

Un buon marcatore molecolare deve essere polimorfico, codominante, facilmente individuabile, ripetibile e possedere un meccanismo di trasmissione semplice (mendeliano o uniparentale).

Negli ultimi decenni, i progressi nella biologia molecolare, tra cui lo sviluppo della tecnica della PCR (Mullis *et al.*, 1987), hanno contribuito allo sviluppo di nuovi marcatori molecolari. La PCR consente di amplificare *in vitro* segmenti specifici di DNA situati tra due sequenze nucleotidiche note, producendone un numero elevato di copie, attraverso una serie di reazioni di denaturazione del DNA, ibridazione dei primers e polimerizzazione di nuovi filamenti. Tale tecnica prevede l'utilizzo di un termociclatore, uno strumento in grado di realizzare numerosi cicli termici di amplificazione. Questa procedura si presenta eccellente per velocità, sensibilità, semplicità e selettività e per esaminare la struttura e la funzione di un gran numero di alleli diversi in campioni di DNA quantitativamente limitati.

I principali marcatori che si basano sulla tecnologia della PCR sono gli SSR (Simple Sequence Repeat), i RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA, Williams *et al.*, 1990), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Vos *et al.*, 1995) e gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism), mentre gli RFLP sfruttano la tecnica dell'ibridazione, sviluppata da Southner nel 1975 e il taglio del DNA con enzimi di restrizione.

Inoltre, è possibile un'altra distinzione:

- marcatori multi-locus, basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici, che implicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con inneschi oligonucleotidici a sequenza nota arbitraria (ad es. RAPD, I-SSR, AFLP);
- marcatori singolo-locus, che invece prevedono l'ibridazione o l'amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l'utilizzo di sonde o inneschi specifici per determinati loci (ad es. RFPL, SSR).

RFLP

Questi marcatori sono stati i primi ad essere utilizzati nell'analisi del genoma vegetale. L'analisi con gli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste nella valutazione delle differenze in peso molecolare dei frammenti che si ottengono dalla digestione del DNA genomico da parte di enzimi di restrizione (Botstein *et al.*, 1980;

Beckman e Soller, 1983). Questi frammenti vengono poi denaturati e trattati con sonde a sequenza nota che, legate ad isotopi radioattivi o sostanze fluorescenti o colorate, permettono di evidenziare solo quei frammenti che contengono la sequenza complementare a quella della sonda utilizzata. I principali vantaggi di questa tecnica sono l'elevata riproducibilità dei risultati, la trasferibilità delle informazioni e la codominanza. Purtroppo presentano numerosi svantaggi, primo fra tutti la laboriosità della tecnica, l'impossibilità di automatizzare le procedure, i costi elevati e naturalmente l'utilizzazione di traccianti radioattivi.

RAPD

I marcatori RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) prevedono l'impiego di corti primers con sequenza casuale, avente un contenuto di G+C (Guanina+Citosina) superiore al 60% per massimizzare la specificità di appaiamento e, per questo motivo, sono in grado di trovare molti siti complementari di appaiamento (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). Ogni prodotto di amplificazione include un tratto cromosomico di sequenza non nota, le cui regioni fiancheggianti sono complementari alla regione del primer in un filamento e omologhe nell'altro filamento. I prodotti di amplificazione sono prima separati su gel d'agarosio e poi evidenziati con delle molecole intercalanti come il bromuro d'etidio. Un elevato potere discriminante, la rapidità operativa, la necessità di basse quantità di DNA per l'analisi, i bassi costi e l'elevato numero di loci indipendenti esplorati con ogni primer, sono i vantaggi di questa tecnica. Di contro essa presenta dei limiti nella riproducibilità dei risultati ottenuti con l'amplificazione. Questi, infatti, sono legati alla qualità del DNA estratto, alla concentrazione dei reagenti impiegati durante l'amplificazione e alle basse condizioni di "stringenza" delle reazioni di amplificazione (la temperatura di *annealing* adottata con i primers decamerici può variare solamente tra i 37 e i 40 °C).

SNP

Gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Jordan e Humphries, 1994) sono una classe di marcatori molecolari che consente di mettere in evidenza il polimorfismo riconducibile a differenze per singoli nucleotidi. Possono essere isolati a partire sia da

sequenze codificanti che non codificanti, ma essendo quelle introniche non sottoposte a pressione selettiva, poiché non codificanti, esse si presentano più ricche di SNP. Per la rilevazione di questi marcatori è necessario conoscere la sequenza che si vuole studiare, in modo da poter disegnare i primers specifici per la loro identificazione. Se la sequenza genica non è conosciuta, per la rilevazione dei marcatori è necessario passare attraverso una libreria genomica di cDNA. Una volta disegnati i primers specifici, si procede con l'amplificazione mediante PCR. L'amplificato viene sequenziato e poi allineato in modo da mettere in evidenza le differenze dovute alle mutazioni puntiformi (inserzioni, delezioni o sostituzioni). Tra gli SNP, gli EST (Expressed Sequence Tag) sono definiti i marcatori del futuro. Infatti, con questi marcatori è possibile individuare polimorfismi di tratti di DNA che vengono normalmente espressi e dunque, è possibile risalire alle sostituzioni amminoacidiche e di conseguenza alle modifiche delle proteine.

ISSR

La tecnica degli ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), basata sulla PCR, è riportata per la prima volta da Zietkiewicz *et al.* (1994). Essa coinvolge l'amplificazione di segmenti di DNA tra due regioni microsatellite ripetute, identiche, orientate in direzioni opposte, usando primers disegnati per la regione centrale microsatellite. Da allora, a seguito di una rapida diffusione, la tecnica è stata applicata allo studio di numerose specie vegetali (Godwin *et al.*, 1997).

Tali primers sono costituiti da ripetizioni di-nucleotidiche, tri-nucleotidiche, tetra-nucleotidiche o penta-nucleotidiche lunghe di solito dalle 16 alle 25 bp. Possono essere “*unanchored*” (Meyer *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1994) o più comunemente “*anchored*” all'estremità 3' o 5' con 1 o 4 basi degenerate che si estendono all'interno delle regioni fiancheggianti (Zietkiewicz *et al.*, 1994). I primers ISSR generano un polimorfismo ogni volta che in un genoma manca una sequenza ripetuta o presenta una delezione, un inserzione o una traslocazione che modifica la distanza tra le ripetizioni. I marcatori ISSR sono generalmente considerati come marcatori dominanti che seguono un'eredità di tipo Mendeliano (Tsumura *et al.*, 1996; Ratnaparkhe *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Questi marcatori presentano diversi vantaggi quali la semplicità di utilizzo, il costo non elevato, hanno un'alta riproducibilità e non necessitano di una conoscenza a priori del genoma da

analizzare, quindi possono essere universalmente utilizzati per l'analisi del genoma vegetale. La tecnica ISSR può essere applicata su tutte quelle specie che contengono un numero sufficiente di sequenze ripetute a distribuzione casuale lungo il genoma. La percentuale di loci polimorfici analizzabile è però inferiore a quella riscontrabile con i marcatori codominanti, infatti la loro natura dominante fa sì che con questi marcatori non sia possibile risalire né al numero di loci saggiati né alle forme alleliche di un dato locus (Wang *et al.*, 1998).

AFLP

La tecnica degli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), introdotta nel 1995 da Vos e collaboratori, si basa sul polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione amplificati mediante PCR e consente di studiare fino ad un centinaio di loci contemporaneamente con una sola corsa elettroforetica. Essa associa la digestione del DNA mediante enzimi di restrizione, all'amplificazione dei frammenti per PCR, senza la necessità di conoscere le sequenze da amplificare (Vos *et al.*, 1995).

Questa tecnica si basa sulla possibilità di attaccare, mediante una ligasi, brevi sequenze note di DNA (adattatori) agli estremi dei frammenti ottenuti dalla digestione. In questo modo è possibile eseguire una PCR semplicemente utilizzando primers complementari alle sequenze ligate. Si può ottenere un'amplificazione selettiva se i primers terminano all'estremità 3' con pochi nucleotidi (1-3) arbitrariamente scelti in modo che l'appaiamento sia possibile solo con una parte di frammenti, con quelli cioè che hanno agli estremi i nucleotidi complementari.

I prodotti della PCR possono essere analizzati su gel di acrilamide o tramite elettroforesi capillare che necessita dell'utilizzo di primers marcati. Il grosso vantaggio di questa tecnica è che consente di studiare molti loci contemporaneamente e quindi ottenere facilmente un elevato polimorfismo tra i genomi. Questi, inoltre, riescono a saggiare anche le regioni telomeriche, laddove gli altri marcatori danno scarsi risultati, nonostante i risultati ottenuti siano strettamente dipendenti dal tipo di enzima di restrizione utilizzato.

Gli AFLP possono essere marcatori di tipo codominante, quando il polimorfismo dipende dalla diversa lunghezza dei frammenti tra due siti di restrizione, o di tipo

dominante, per la presenza o assenza di un sito di restrizione in genomi diversi. Tale tecnica ha dimostrato di essere in grado di discriminare, quindi, tra genotipi strettamente connessi all'interno di una specie, ed è stata ampiamente utilizzata come metodologia di genotipizzazione per numerose piante ornamentali (Tomkins *et al.*, 2001; Carr *et al.*, 2001; Portis *et al.*, 2004). Nonostante presenti tutti questi vantaggi, la metodica degli AFLP presenta anche numerosi svantaggi. Infatti risulta essere lunga e laboriosa, necessita di una grande quantità di DNA ad elevata qualità, privo cioè di contaminanti che possono inibire gli enzimi di restrizione, ha una bassa riproducibilità inter-laboratorio e perciò presenta anche numerose difficoltà interpretative (Mueller and Wolfenbarger, 1999).

SSR

I marcatori molecolari SSR (Single Sequence Repeats) vengono anche definiti microsatelliti in quanto costituiti da piccole sequenze, ripetute in tandem, da 2 a 6 bp, disperse apparentemente a caso per tutto il genoma degli organismi superiori (Schlötterer, 2000). Il polimorfismo tra diversi individui ad un dato locus microsatellite dipende dalla sua variazione di lunghezza, data da quante volte viene ripetuto il motivo di base. Si ritiene che questa variabilità sia dovuta in vivo ad uno slittamento (*slippage*) della DNA polimerasi durante il processo di replicazione (Levinson e Gutman, 1987) e/o da *crossing-over* ineguale durante la meiosi. Questi marcatori sono, inoltre, considerati ideali per la mappatura genica e per la caratterizzazione della diversità genetica sia delle specie forestali che delle colture a livello inter e intra specie e anche inter e intra varietale a causa dell'alto tasso di mutazione (Lee *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1997; Matus e Hayes, 2002).

Le differenze di lunghezza degli alleli di un locus microsatellite sono analizzabili utilizzando il gel di poliacrilammide che ha il vantaggio di avere un elevato potere di risoluzione (Lagoda *et al.*, 1998). L'uso di sequenziatori si è dimostrata una soluzione ancora più efficiente. Anche in questo caso, come detto per gli AFLP, l'utilizzo del sequenziatore necessita, a priori, dell'utilizzo di *primers* marcati. I vantaggi dei microsatelliti sono notevoli: sono ripetibili, hanno un elevato polimorfismo, possibilità di automazione e sono codominanti. Gli SSR sono stati proposti per lo studio nei vegetali nel 1993 da Morgante e Olivieri. Da allora hanno trovato applicazioni in moltissimi campi con

un notevole impatto nel miglioramento genetico. In particolare sono stati utilizzati per il *fingerprinting* varietale, per la costruzione di mappe genetiche, negli studi di associazione con i geni di importanza agraria (*gene tagging*, analisi QTL) e in programmi di selezione assistita (Marker Assisted Selection MAS) (Gupta e Varshney, 2000). Grazie alla codominanza e al multiallelismo hanno trovato larghissimo impiego anche in studi di ecologia e genetica delle popolazioni (Bowers *et al.*, 1996; Provan *et al.*, 1999; Turpeinen *et al.*, 2001).

1.6 Caratterizzazione della diversità genetica del mirto

Da un'analisi sullo stato dell'arte, è emerso che molti sono gli studi che interessano la specie *Myrtus communis*. La maggior parte riguardano l'ambito chimico-farmaceutico, in particolare sono notevoli gli studi sugli oli essenziali estratti dalle foglie di questa pianta (Sepici-Dincel *et al.*, 2007; Al Lahame e Al Fadel, 2013; Cannas *et al.*, 2013; Ben Ghnaya *et al.*, 2013; Zomorodian *et al.*, 2013). Meno numerosi, ma fondamentali, sono invece i lavori che vedono l'utilizzo dei marcatori molecolari al fine di caratterizzare questa specie dal punto di vista genetico, in relazione all'habitat in cui essa si sviluppa. Gli studi sul mirto hanno visto l'utilizzo dei più importanti marcatori molecolari quali RAPD, AFLP e gli I-SSR.

Il gruppo di Messaoud e collaboratori nel 2006, è stato il primo ad utilizzare i RAPDs su mirto. Sono stati impiegati settantanove marcatori RAPDs amplificati da cinque *primers* decameri casuali, insieme a nove isoenzimi. Con questi sono state analizzate sei diverse popolazioni di mirto provenienti da tre aree geografiche e climatiche distinte della Tunisia. Queste tre aree erano rappresentative dei tre bioclimi presenti all'interno della regione: subumido, umido inferiore e semiarido superiore. Il livello di diversità genetica riscontrata differiva in base alla zona bioclimatica di appartenenza della popolazione, nonostante la diversità genetica riscontrata con i marcatori RAPD fosse più alta rispetto a quella ottenuta con gli isoenzimi. Le popolazioni raccolte nel bioclina subumido presentavano un più alto livello di polimorfismo rispetto a quelle coltivate nella zona a bioclina semiarido superiore, presentando degli alleli specifici che appartenevano a

specifiche popolazioni bioclimatiche. Inoltre, la differenziazione tra gruppi ecologici si è dimostrata più alta rispetto a quella rilevata all'interno dei gruppi. Ciò indica che le dinamiche e l'evoluzione delle popolazioni durante i decenni passati sono state determinate principalmente dalla pressione antropica (Messaoud *et al.*, 2006).

Nello stesso anno sono stati utilizzati gli AFLP per discriminare delle popolazioni sarde e calabresi di mirto in base alla loro origine geografica (Agrimonti *et al.*, 2007). La variabilità genetica è stata studiata tra ed entro 10 popolazioni sarde e 4 calabresi, scelte tra gli ecotipi che maggiormente differivano in termini caratteristiche morfologiche e fitochimiche. La variabilità genetica è stata correlata con parametri quali la produzione e la germinabilità dei semi. Essa rappresenta un importante parametro per la conservazione della specie ed ne descrive il potenziale di espressione e la sua capacità di adattamento ai cambiamenti ambientali. In popolazioni piccole e isolate, il flusso genico è limitato e l'incrocio avviene più frequentemente causando una perdita di eterozigoti che sono favoriti in condizioni estreme. In questo lavoro, l'analisi AFLP ha dimostrato che esisteva una separazione spaziale tra i campioni di mirto provenienti da queste due regioni, permettendo di dividere le due aree campionate in due distinti gruppi. Le popolazioni calabresi e sarde sono state raggruppate in accordo con la loro origine geografica, mostrando un'origine differente o che esse possono essersi differenziate come risultato di un limitato flusso genico dovuto alla barriera fisica rappresentata dal mare. Al contrario, invece, non sembrano esserci correlazioni significative tra germinabilità, numero di semi per frutti e condizioni ambientali (tipo di suolo, altitudine, piogge annuali) dell'area in cui queste popolazioni crescono. Un decremento della diversità e una correlata perdita di fitness è stata osservata all'interno di queste popolazioni che presentano dimensioni ridotte, in particolare quelle localizzate vicino alla costa. Questo lavoro ci fornisce una possibile indicazione dell'origine del mirto in Sardegna. Infatti, il centro di biodiversità in Sardegna sembra essere localizzato nel sud-ovest dell'Isola, dove tre popolazioni geograficamente chiuse (Tertenia, San Basilio e Dolianova) possiedono un'alta variabilità genetica. In Calabria, la ridotta dimensione delle popolazioni suggerisce che in questa regione il mirto è sottoposto ad un più alto rischio di estinzione. Le popolazioni della Calabria mostrano una differenziazione genetica, tra le popolazioni, più elevata a confronto con quelle della

Sardegna. La ridotta diversità del mirto della Calabria non è sorprendente: anche se non è così intensamente sfruttato come il mirto sardo, negli anni passati è stato sottoposto a gravi eventi ambientali, come fuochi e inondazioni, che ne hanno ridotto l'estensione.

Gli AFLP sono stati utilizzati anche in un altro importante lavoro che ha avuto come oggetto una particolare collezione di germoplasma. Nel periodo che va dal 1998 al 2000 è stata assemblata, nell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura, una raccolta di germoplasma selvatico del mirto raccolto da varie zone del Mediterraneo, al fine di evidenziare la variabilità presente nei caratteri morfologici (Cervelli, 2003). Sono stati studiati trentasei individui provenienti da sei diverse regioni italiane (Liguria, Campania, Toscana, Sardegna, Puglia e Sicilia) e circa dieci accessioni di materiale da seme provenienti dagli orti botanici di sei differenti Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Spagna, Portogallo, Francia, Croazia, Grecia e Israele). L'analisi con gli AFLP ha messo in evidenza una variabilità intraspecifica all'interno delle popolazioni esaminate; in particolare le popolazioni, appartenenti a due regioni italiane, formano dei cluster all'interno della regione piuttosto che un gruppo specifico per ogni paese, mostrando un basso livello di diversità genetica all'interno delle popolazioni, a conferma di quanto detto da Agrimonti e collaboratori (Agrimonti *et al.*, 2007). Le principali differenze sono state rilevate tra popolazioni provenienti dalle aree ovest ed est. L'analisi molecolare ha rilevato che la maggior parte della variabilità genetica era dovuta proprio alle popolazioni italiane; questo suggerisce che l'Italia si trovi sulla linea di demarcazione tra i gruppi genetici est e ovest del Mediterraneo (Bruna *et al.*, 2007).

In Sardegna, il programma di domesticazione ha portato alla creazione di un campo collezione, localizzato nell'azienda didattico-sperimentale sita a Fenosu, in provincia di Oristano. Le accessioni presenti in questo campo, prelevate su tutto il territorio regionale, sono state scelte in quanto interessanti dal punto di vista della produzione di biomassa e di frutti (Mulas, 2012; Mulas *et al.*, 2002c). Le varietà presenti in questo campo sono oggetto di tre lavori che hanno fornito importanti informazioni riguardo la struttura genetica della popolazione del mirto sardo.

Nel 2005 il lavoro portato avanti da Chessa e collaboratori ha visto l'utilizzo di 9 marcatori molecolari I-SSR, tra i quali ne sono stati scelti 6 che hanno mostrato profili riproducibili certi, e 10 cpSSR (*chloroplastic-SSR*). L'analisi ha rilevato una similarità tra i

genotipi studiati, individuando due gruppi di cui il primo comprende due selezioni, entrambe a bacca nera ed origine geografica comune; il secondo mostra numerosi subgruppi nei quali è evidenziabile una dispersione delle selezioni, ad eccezione dell'ultimo gruppo che comprende le varietà a bacca bianca. L'analisi condotta ha evidenziato che non vi è un'elevata ampiezza della base genetica. Tale risultato è imputabile, oltre che all'appartenenza delle selezioni alla stessa regione, che, trattandosi di un'Isola, è caratterizzata da un proprio isolamento geografico, anche dalla pressione selettiva esercitata del processo di domesticazione della specie. Infatti, la selezione per caratteri fenotipici comuni, quali quelli importanti ai fini della coltivazione, potrebbe aver comportato una riduzione della variabilità intraspecifica, rispetto a quella ipotizzabile per le popolazioni spontanee (Chessa *et al.*, 2005).

Sempre sull'utilizzo dei marcatori molecolari I-SSR, è stata effettuata una caratterizzazione della diversità genetica su mirto proveniente da quattro differenti aree geografiche: Corsica, Asinara, Surigheddu e la collezione presente nell'Azienda Didattico Sperimentale di Fenosu (Melito *et al.*, 2013a). L'obiettivo era di esplorare la diversità genetica presente in una serie di candidate cultivar rispetto a quella detenuta dalle popolazioni selvatiche. Dall'analisi dei dati è risultata evidente la suddivisione di questi campioni in due grandi gruppi: uno a cui appartengono tutte le varietà coltivate presenti presso l'azienda di Fenosu e il secondo a cui appartiene tutto il materiale selvatico (Asinara, Corsica e Surigheddu). Le analisi hanno mostrato che la diversità è stata maggiore nelle cultivar coltivate piuttosto che nel materiale selvatico, ma allo stesso tempo hanno fornito prove dell'esistenza di un flusso genico tra la Corsica e le popolazioni sarde. Secondo Melito e collaboratori, la maggiore quota di diversità genetica nelle cultivar coltivate è dovuta al fatto che la selezione fenotipica può essere efficace nel massimizzare la variabilità genetica delle popolazioni selvatiche, almeno durante le fasi iniziali della domesticazione. Dall'altro canto, invece, il basso livello di differenziazione tra il germoplasma sardo e quello corso, può essere dovuto diversi fattori, quali la condivisione di un pool genetico ancestrale, l'assenza di una differente pressione selettiva o una limitata separazione generazionale tra le due popolazioni. I reperti fossili, infatti, confermano che il genere *Myrtus* ha goduto di un'ampia distribuzione nel bacino del Mediterraneo durante il tardo Miocene (dai 23,03 ai 5,332 milioni di anni fa). E' probabile quindi che le

popolazioni che sono state in grado di resistere alle grosse fluttuazioni climatiche delle epoche passate, abbiano trovato rifugio nei luoghi dove la pianta vive ancora oggi (Migliore *et al.*, 2012). Allo stesso modo la mancanza di una significativa correlazione tra il genotipo e la provenienza geografica, indica la presenza di un alto tasso di flusso genico tra le popolazioni, dovuto, in questo caso, alla vicinanza geografica delle due isole.

Il gruppo che ha mostrato la minore quota di diversità genetica è il gruppo proveniente dall'Asinara. L'Asinara è una piccola isola posta a nord-ovest della Sardegna e la popolazione risulta tagliata fuori dall'introggressione e quindi più vulnerabile all'erosione genetica.

I risultati contrastanti di questi due lavori, che hanno sfruttato entrambi la tecnica dei marcatori molecolari I-SSR, può essere dovuto all'impiego di un ridotto numero di marcatori molecolari nel lavoro di Chessa e collaboratori che quindi ha ridotto in qualche modo la fase interpretativa dei risultati. E' necessario inoltre ricordare che con i marcatori molecolari I-SSR, per loro stessa natura, non è possibile risalire né al numero di loci saggiati né alle forme alleliche di un dato locus (Wang *et al.*, 1998).

In un lavoro più recente, sono state studiate le relazioni che intercorrono tra le condizioni ambientali e le caratteristiche genetiche delle accessioni di mirto sardo, tramite l'utilizzo dei marcatori molecolari AFLP, (Melito *et al.*, 2014). Nel caso del mirto, i dati dell'impatto dei parametri ecologici sulla variabilità genetica forniscono informazioni riguardo all'adattabilità dei genotipi alle differenti condizioni ambientali. Una delle condizioni ambientali che influisce maggiormente sulla distribuzione delle specie è l'altitudine. Questa, infatti, genera una barriera fisica ai flussi di geni tra popolazioni diverse. In Sardegna il mirto si sviluppa fino ad un'altitudine di 800 metri s.l.m (Mulas *et al.*, 2002a), tuttavia le piante, oggetto di questo studio, crescono ad un'altitudine massima di 637 m s.l.m. Per questo motivo la distribuzione genetica è stata messa in relazione con tre differenti fasce di altitudine (<100 m, da 100 a 200 m e >200 m s.l.m.). I risultati mostrano come la distribuzione della variabilità genetica sia parzialmente influenzata dalla presenza delle montagne (distribuzione ovest-est) e dalla lunga distanza da nord a sud che caratterizza quest'isola, che quindi hanno contribuito a limitare il flusso genico. Questi risultati sono diversi da quelli ottenuti da Agrimonti e collaboratori (2007) che, al contrario, non hanno trovato correlazioni significative tra la variabilità genetica e la

distanza geografica tra le popolazioni di mirto campionato in Sardegna. Queste differenze probabilmente sono dovute alla ridotta dimensione del campione preso in considerazione da questi autori.

Anche in questo lavoro, come nei precedenti che hanno riguardato il germoplasma sardo, il più alto livello di diversità si è dimostrato all'interno delle popolazioni, piuttosto che tra le popolazioni.

Recentemente sono stati sviluppati dei marcatori microsatelliti (SSR) per valutare i livelli di diversità genetica tra piante di mirto presenti nel sud della Spagna. Sono state disegnate 14 coppie di *primers* con un elevato polimorfismo che hanno permesso di migliorare la comprensione delle conseguenze genetiche dovute alla frammentazione cronica del paesaggio del Mediterraneo (Albaladejo *et al.*, 2010).

1.7 Variabilità genetica ed influenza degli ecosistemi

La distribuzione dei vegetali è strettamente legata al tipo di clima. Il mirto risulta essere un arbusto sempreverde tipico della macchia mediterranea. L'ecosistema Mediterraneo è uno degli ecosistemi più ricchi di biodiversità in Europa (Mooney, 1988) e per questa ragione ha ricevuto moltissima attenzione da parte di tutta la letteratura scientifica (Blondel e Aronson, 1999; Trabaud, 2000).

Il genere *Myrtus* è l'unico spontaneo in Europa con la specie *M. communis* (Fiori, 1925; Picci e Atzei, 1996). La specie in oggetto, insieme a *Pistacia lentiscus* L., *Arbutus unedo* L. e *Quercus ilex* L., è una tra le specie più rappresentative della macchia mediterranea, costituita da foreste di latifoglie sempreverdi, dominata da arbusti o alberi con foglie sclerificate. Questo tipo di ecosistema è presente in determinati ambienti, caratterizzati da un certo clima e una particolare vegetazione che sono ampiamente distribuiti in diverse parti del mondo.

E' bene ricordare che esiste una distinzione tra climatologia, che è la scienza che si occupa del clima, e bioclimatologia che si occupa delle interrelazioni tra il clima e la distribuzione degli organismi viventi, in particolare delle piante, considerando le maggiori variabili che sono rilevanti per la loro distribuzione (Gavilàn, 2005; Rivas-Martinez e Loidi, 1999).

La diffusione del clima mediterraneo è limitata ad aree molto ristrette del globo e tali condizioni climatiche si sarebbero venute a creare relativamente di recente, a partire dal Pleistocene (compreso tra 2,58 e 11.700 milioni di anni fa), in dipendenza dalle correnti oceaniche (Di Castri *et al.*, 1981). A dispetto del nome, che farebbe pensare ad un luogo geograficamente definito, Myers (1988, 1990) ha individuato 5 bioclimi mediterranei distribuiti in altrettante parti del mondo. Tale ecosistema è distribuito infatti, oltre che attorno al Mar Mediterraneo, anche in California, Cile, Sud Africa, e persino in Australia, a latitudini comprese tra i 30° N e i 45° S (Médail e Quézel, 1999). Il clima di queste zone è di tipo temperato, caratterizzato da estati calde e aride e inverni miti e piovosi (Camarda, 2004). E' proprio il lungo periodo arido estivo che ha portato molte delle specie di queste zone ad un adattamento particolare. Le aree che nel mondo hanno clima mediterraneo presentano infatti una elevata eterogeneità dal punto di vista floristico. Questo dipende, oltre dal fatto che spesso si tratta di zone di transizione tra ecosistemi diversi, anche dalle profonde differenze nella natura dei substrati, dalle diverse origini biogeografiche degli esseri viventi e, non meno importante, dall'influenza dell'uomo che, in ogni ambiente, adotta differenti strategie di gestione del territorio.

Le piante mediterranee sono per lo più delle sclerofille, cioè le loro foglie, persistenti e di ridotte dimensioni, sono dotate di una spessa cuticola, la cui funzione è di limitare l'evapotraspirazione, trattenendo così più acqua possibile all'interno della pianta (Mooney e Dunn, 1970).

Il clima della Sardegna viene generalmente classificato come Mediterraneo Interno, caratterizzato da inverni miti e relativamente piovosi ed estati calde e secche. L'intensità della stagione caldo-arida aumenta da nord a sud e dalle montagne verso il mare. Al contrario la stagione freddo-umida rafforza l'intensità procedendo da sud a nord e dal mare verso la montagna. La piovosità varia da 411 a più di 1215 mm nelle regioni montagnose interne (Canu *et al.*, 2014). Le temperature medie annue variano tra i 17-18°C nelle zone costiere e i 10-12 °C delle zone montane situate intorno a 1000 m. Esistono quindi due fattori climatici contrapposti, sulle stesse direttrici, che fanno sì che, al periodo più caldo maggiormente favorevole allo sviluppo della vegetazione, corrisponda un periodo arido con deficit idrico che lo limita, mentre, al periodo di maggiore disponibilità idrica, ugualmente favorevole allo sviluppo della vegetazione, corrisponda un periodo di basse

temperature. Si determinano così due periodi favorevoli allo sviluppo della vegetazione spontanea che possiamo individuare nella fase di crescita vegetativa del periodo primaverile e in quella di fruttificazione a cavallo della tarda estate e primo autunno (Arrigoni, 1968). Da un punto di vista più generale, il Bacino del Mediterraneo può essere considerato come una fascia di transizione tra le zone tropicali, dove le stagioni sono definite in accordo alla quantità di pioggia, e le zone temperate, dove le stagioni sono caratterizzate dalle variazioni di temperatura. Di conseguenza si ha a che fare con grandi variazioni interstagionali di precipitazione accompagnate da variazioni di temperatura, senza che però le une e le altre raggiungano i valori estremi tipici delle due aree climatiche (Critchfield, 1983; Martyn, 1992).

Un'altra particolarità del clima mediterraneo è legata fortemente alla presenza e disposizione di sistemi orografici di grande estensione, oltre che al mare stesso. Questo permette di avere a che fare con un mare chiuso e relativamente poco profondo che smorza gli eccessi di temperatura meno di quanto facciano gli Oceani Atlantico e Pacifico a latitudini analoghe e, allo stesso tempo, protegge parzialmente dalle intense perturbazioni, tipiche di altre aree del Pianeta, poste alle medesime latitudini, ma in zone continentali o lambite dagli oceani.

Lo sviluppo e l'accrescimento degli organismi vegetali sono fenomeni regolati da meccanismi piuttosto complessi e solo in parte conosciuti. E' noto però che l'insieme delle attività che li determinano, a livello cellulare e molecolare, è fortemente influenzato da numerosi fattori esterni alla pianta, quali gli eventi climatici e le caratteristiche chimiche e fisiche del suolo. Si comprende, quindi, come gli eventi fenologici siano legati a numerose variabili ambientali mediante relazioni complesse e non sempre dirette.

Il mirto è una pianta particolarmente adatta all'ambiente di tipo mediterraneo, riuscendo a sopravvivere alle condizioni più estreme. Disponibilità luminosa, temperatura, disponibilità idrica del suolo, composizione gassosa dell'atmosfera e caratteristiche fisico-chimiche del suolo costituiscono i principali elementi che interagiscono con la pianta. Come accade per diverse specie, anche per il mirto, le conoscenze sui legami esistenti tra parametri climatici e genetici sono ancora piuttosto limitate; sicuramente le variabili ambientali condizionano l'efficienza produttiva della pianta ed incidono sulla quantità e qualità del suo prodotto.

4. Obiettivi della ricerca

Il crescente interesse nei confronti delle risorse genetiche vegetali, in particolare per le specie endemiche e officinali che presentano un'utilità economica attuale e/o potenziale, come il mirto, ha reso necessario incentivare ed aumentare le conoscenze relative a quest'arbusto. Nello specifico l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare e definire le informazioni sul mirto attraverso lo studio della variabilità genetica e degli aspetti ambientali che caratterizzano il luogo in cui questa pianta si sviluppa.

Le risorse genetiche prese in esame sono state di due tipi: da una parte le varietà selezionate e domestiche, disponibili nel campo collezione dell'Università di Sassari; dall'altra, accessioni provenienti dalla flora spontanea che sono state raccolte in tutto il territorio regionale sardo. Il fine ultimo è stato quello di valutare le correlazioni esistenti tra alcune variabili ambientali dei siti di provenienza delle accessioni analizzate e il profilo genetico di queste popolazioni.

Per le variabili ambientali, sono state prese in considerazione le serie storiche di dati relative alle temperature e pluviometria dei siti di origine delle accessioni. Questo ha rappresentato uno strumento importante per meglio comprendere le relazioni intraspecifiche che intercorrono tra distribuzione degli organismi vegetali e il clima. Questi dati sono stati successivamente messi in relazione con i dati genetici ottenuti con l'analisi attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari SSR che hanno fornito un codice identificativo dell'individuo e della popolazione a cui appartiene.

Il presente lavoro si sviluppa nell'ambito di un progetto finanziato dalla Legge Regionale 7 Agosto 2007, N. 7: "Promozione della Ricerca Scientifica e dell'innovazione Tecnologica in Sardegna", dal titolo: "Il Mirto: genomica e metabolomica, un approccio integrato per la valorizzazione industriale", che vede la partecipazione del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università di Sassari (DipNeT) e il Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari (DISVA).

Caterina Mele

*Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali*

Un'analisi di questo tipo fornirà gli strumenti necessari per comprendere appieno il tipo di pressione selettiva che la specie ha subito nei diversi contesti del territorio regionale e permetterà quindi di fornire utili indicazioni al percorso di domesticazione del mirto tuttora in atto.

5. Materiali e Metodi

3.1 Campionamento materiale vegetale

Il campionamento del materiale vegetale è stato effettuato nel periodo compreso tra maggio e luglio 2014 e ha riguardato 265 piante di mirto (tabella 2):

- 200 piante spontanee prelevate in diverse località della Sardegna (Arbus, Budoni, Bosa, Capo Pecora, Cuglieri, Loiri Porto San Paolo, Laconi, Modolo, Monti, Olia Speciosa, Parco dei Sette Fratelli, Porto Ferro, Riola Sardo, Rumanedda, Siliqua, Siniscola, San Priamo, Telti, Uta, Villaurbana). Per ogni località sono stati raccolti 10 individui (tabella 1)

- 65 cultivar selezionate, descritte e raccolte in apposito campo collezione (Mulas *et al.*, 2002), situato nell'azienda didattica-sperimentale dell'Università di Sassari "Antonio Milella", con sede a Fenosu (provincia di Oristano, Sardegna) (tabella 2). Queste cultivar provengono da diverse località della Sardegna, raccolte e selezionate, nel campo collezione in base ad alcuni caratteri morfologici quali la buona produzione di biomassa e di frutti.

Il campionamento delle piante spontanee è stato di tipo casuale, in maniera tale che tutte le unità della popolazione avessero una uguale probabilità di fare parte del campione e che ogni individuo avesse la stessa probabilità di essere rappresentato nelle analisi. Tutti i siti di campionamento sono stati individuati attraverso delle coordinate geografiche determinate con l'ausilio di un sistema GPS.

Il materiale vegetale, prelevato dalle zone apicali della pianta, tenendo conto dei nuovi getti fogliari, è stato raccolto e catalogato per poi essere trasferito nel laboratorio di analisi. Le foglie sono state pulite con H₂O mQ ed etanolo 100% per eliminare eventuali contaminanti e conservate a -80 °C sino al momento del loro utilizzo.

3.2 Analisi genetiche

Estrazione del DNA

Il DNA genomico totale, è stato estratto da 100 mg di foglie giovani, utilizzando il kit di estrazione Dneasy® Plant mini kit (Qiagen, Germany), secondo il protocollo della casa produttrice.

Il materiale vegetale è stato posto in delle Eppendorf® da 2 ml insieme a due sfere di tungsteno. In questo modo il campione è stato polverizzato, in azoto liquido, mediante un omogeneizzatore elettrico “Tissuelyser” che frantuma il campione rendendolo omogeneo.

Alla polvere così ottenuta, sono stati aggiunti 400 µl di Buffer AP1 (buffer di lisi) e 4 µl di RNasi. I campioni sono stati quindi posti ad incubare per 10 min a 65 °C, invertendoli ogni 2-3 min durante l’incubazione. Questo passaggio serve per lisare la parete cellulare e facilitare l’estrusione del DNA.

Trascorsi i 10 minuti sono stati aggiunti 130 µl di Buffer AP2, e i campioni sono stati posti in ghiaccio per 5 minuti in modo da facilitare la precipitazione delle proteine e dei polisaccaridi. Al fine di rimuovere i lisati più grossolani, quali i componenti della parete e delle membrane cellulari, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 14000 rpm.

Il lisato è stato trasferito nella colonnina QIA shredder del kit ed è stato nuovamente centrifugato a 14000 rpm per rimuovere i detriti cellulari più piccoli.

Al surnatante, trasferito in una nuova Eppendorf®, sono stati aggiunti 1,5 volumi di Buffer AW1 al fine di precipitare il DNA. 650 µL della soluzione così ottenuta sono stati prelevati e trasferiti in una colonnina DNeasy del kit che è stata sottoposta a centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm. 500 µl di Buffer AW2 sono stati aggiunti alla colonnina, posizionata in una provetta, che ora contiene il DNA legato alla membrana. Successivamente la colonna è stata sottoposta a centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm. In questo modo il DNA legato alla membrana viene ulteriormente lavato da eventuali residui. Questo passaggio è stato ripetuto due volte. Un secondo passaggio in centrifuga, effettuato per 2 minuti a 14000 rpm, ha permesso - l’eliminazione totale dell’etanolo che potrebbe influire sui successivi passaggi.

A questo punto il DNA viene eluito dalla colonna in seguito all'aggiunta di 100 µl di Buffer AE (buffer di eluizione) e successivamente sottoposto a centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm. Quest'ultimo passaggio è stato ripetuto due volte al fine di recuperare tutto il DNA legato alla membrana.

Il DNA estratto è stato sottoposto a determinazione quali-quantitativa mediante analisi spettrofotometrica a 260 e 280 nm mediante Biophotometer (Eppendorf) e conservato a -20 °C.

Per verificare l'integrità del DNA estratto è stata anche effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. Il gel di agarosio è stato preparato sciogliendo un grammo di agarosio in polvere in 100 ml di soluzione tampone TBE 1X (Tris/Borate/EDTA). Per consentire la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il bromuro di etidio che ha la capacità di intercalarsi tra le basi di DNA ed emettere luce fluorescente in seguito all'esposizione di raggi ultravioletti (Figura 1).

Per tutti i campioni è stato estratto un DNA concentrato e puro, come mostrato nella Figura 1.

Il DNA estratto è stato utilizzato successivamente per la caratterizzazione molecolare mediante l'utilizzo di marcatori microsatelliti (SSR).

Analisi con i marcatori molecolari SSR

Complessivamente sono stati analizzati 14 loci SSR che sono stati amplificati in PCR mediante l'utilizzo di altrettante coppie di primers. Questi primers, disegnati da Albaladejo *et al.* (2010), sono stati modificati in modo tale che il *primer forward* di ogni coppia fosse marcato all'estremità 5' con un fluorocromo (6-FAM, HEX e NED), per permetterne la successiva analisi, dei frammenti marcati, mediante elettroforesi capillare. Un controllo positivo e uno negativo sono stati inclusi in tutte le reazioni.

Il protocollo utilizzato per l'analisi SSR è suddiviso in tre fasi principali: 1) amplificazione mediante PCR; 2) risoluzione degli amplificati mediante elettroforesi capillare; 3) Analisi statistica.

1) Amplificazione mediante PCR

Un μl di ciascun campione di DNA totale è stato utilizzato in 25 μl di una reazione standard di PCR costituita da 2,5 μl di PCR buffer 10X (Roche) + 1,5mM MgCl_2 , 1 μl di reverse e forward primer per ciascun locus alla concentrazione di 25 pmoli/ μl , 0,5 μl di 1,25 mM dNTP, 0,2 μl di 5 U/ μl Taq polymerase (Roche) e 18,8 μl di H_2O mQ. Le reazioni di PCR sono state effettuate in un Thermal Cycler 9700 dell'Applied Biosystems utilizzando tre diversi programmi di amplificazione (A, B e C), a seconda delle coppie di primers utilizzate (Tabella 3):

A: denaturazione iniziale a 94 °C per 4 minuti seguita da 10 cicli touchdown a 94 °C per 30 secondi, annealing per 30 secondi a 60 °C (-1 °C/ciclo), estensione per 1 minuto a 72 °C; 30 cicli a 94 °C per 30 secondi, 50 °C per 30 secondi, 72 °C per 1 minuto; estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

B: denaturazione iniziale a 94 °C per 4 minuti seguita da 10 cicli touchdown a 94 °C per 30 secondi, annealing per 30 secondi a 60 °C (-0.5 °C/ciclo), estensione per 1 minuto a 72 °C; 30 cicli a 94 °C per 30 secondi, 55 °C per 30 secondi, 72 °C per 1 minuto; estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

C: denaturazione iniziale a 94 °C per 4 minuti seguita da 30 cicli a 94 °C per 30 secondi, 59 °C per 30 secondi, 72 °C per 1 minuto; estensione finale a 72 °C per 7 minuti.

Tabella 1. Popolazioni prese in esame con relativo numero di individui.

Popolazioni	N. individui	Popolazioni	N. individui
Fenosu Campo 11	40	Parco Sette Fratelli	10
Fenosu Campo 54	25	Porto Ferro	10
Arbus	10	Riola Sardo	10
Budoni	10	Rumanedda	10
Bosa	10	Siliqua	10
Capo Pecora	10	Siniscola	10
Cuglieri	10	San Priamo	10
Loiri Porto San Paolo	10	Santa Sofia	10
Modolo	10	Telti	10
Monti	10	Uta	10
Olia Speciosa	10	Villaurbana	10
		Tot	265

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

Tabella 2. Località di provenienza degli individui presenti nei due campi collezione di Fenosu (Oristano)

Fenosu Campo 11		Fenosu Campo 54	
Località	Codice	Località	Codice
Bosa	BOS_1/95	Asinara	ASIN
Bosa	BOS_2	Budoni	BDD1
Budoni	BUD_1	Budoni	BDD2
Cuglieri	CUG_11	Cuglieri	CUG11
Isili	ISL_3	Isili	ISL1
Isili	ISL_1	Rumanedda	V2
Laconi	LAC_31	Rumanedda	V9
Laconi	LAC_1	Rumanedda	V12
Laconi	LAC_11	Rumanedda	V15
Laconi	LAC_3	Rumanedda	V16
Laconi	LAC_10	Rumanedda	V1
Laconi	MON_2	Rumanedda	V3
Monti	MON_4	Rumanedda	V4
Monti	MON_5	Rumanedda	V7
Olia Speciosa	SBD_1	Rumanedda	V10
Olia Speciosa	6_2	Rumanedda	V17
Orosei	ORS_3	Rumanedda	V14
Orosei	ORO_2	Rumanedda	V5
Orosei	ORS_1	Rumanedda	V6
Orosei	ORS_2	Rumanedda	V8
Parco Sette Fratelli	PSF_4	Rumanedda	V11
Parco Sette Fratelli	SPF_1	Rumanedda	V13
Rumanedda	RUM_4B	Rumanedda	V19
Rumanedda	RUM_12	Rumanedda	V20
Rumanedda	RUM_4	Telti	TEL2
Rumanedda	RUM_6		
Rumanedda	RUB		
Rumanedda	RUM_13		
Rumanedda	RUM_14		
Rumanedda	RUM_15		
Rumanedda	RUM_20		
Rumanedda	RUM_10		
Rumanedda	RUM_3		
Sassari	SAS_1		
Siniscola	SIN_2		
Telti	TEL_2		
Uta	CPT_3		
Uta	CPT_4		
Uta	CPT_6		
Uta	CPT_5		
Tot.	40	Tot.	25

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

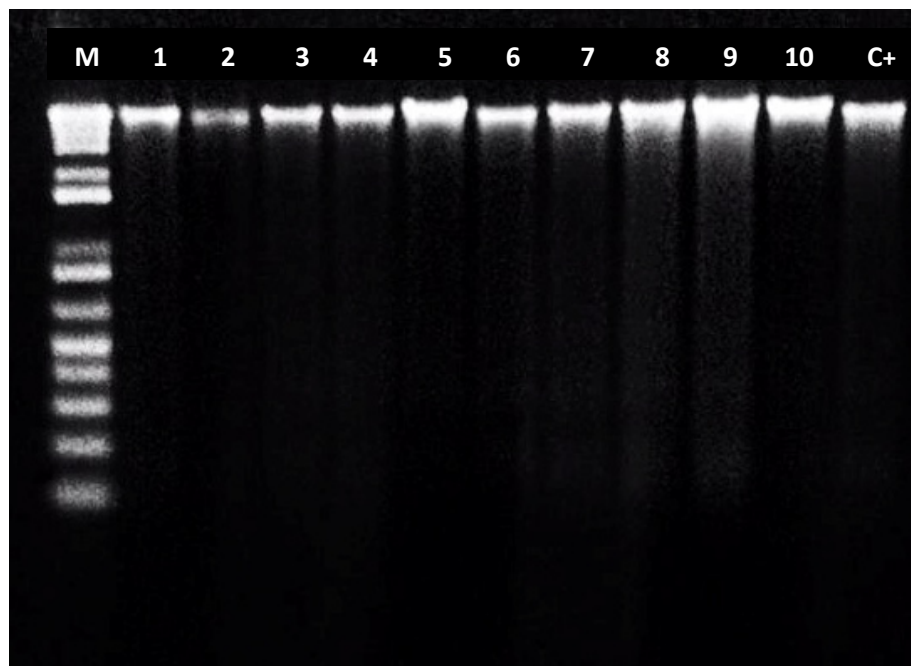


Figura 1. Corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% di 5 μ l di DNA totale di mirto estratto con il kit commerciale Dneasy Plant mini kit (Qiagen). Linea M: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); linee 1-10: DNA genomico campioni di mirto; C+: controllo positivo di estrazione.

Tabella 3. Primers utilizzati per l'amplificazione e disegnati da Albaladejo et al. (2010).

Nome locus	Sequenza primer 5' - 3'	Marcatura	Motivo ripetuto	Programma PCR	Ampliconi (bp)
<i>Myrcom 1</i>	CGTGATGCACACTGAACTGA AACCCCTTTTGCCAACATTT	NED	(AC) ₆	B	213
<i>Myrcom 2</i>	ATAGCTCTACCCGCCATTG GTGCATGGTCCTCGATAGGT	HEX	(TC) ₁₈	B	175
<i>Myrcom 3</i>	GGCAGCTACCAATCATAACC TTTGCAGCATTTCAAAGTGG	FAM	(CT) ₁₃	B	161
<i>Myrcom 4</i>	CAACCACATCCACCCATAGA CCACAGTCAAGAGGGAGAGC	HEX	(TC) ₂₀	C	187
<i>Myrcom 5</i>	TGAGAGATCAGCAACCAAAAAG CATGAATGGCAACGATGAAA	HEX	(Ct) ₈	A	250
<i>Myrcom 6</i>	AAATGAAAAAGCTAAAAGTTAAACA AACAGGAAGAGCAAGCCAAG	FAM	(A) ₁₂ (CA) ₁₀	B	172
<i>Myrcom 7</i>	AGACATGCTCAAACCTTGTATGC AATGTATCCCAACATGTCAGA	FAM	(GA) ₁₉	B	170
<i>Myrcom 8</i>	TGCTCGGTCATTAATTGGTGT TCAAAACCGTCTCCATGAAA	HEX	(TA) ₆	B	232 – 270
<i>Myrcom 9</i>	GAAAGTTGCACTGTTTATTTC TCTCCTTCCAATCCTCATCA	FAM	(A) ₁₅ GG(GA) ₉	B	181 - 186
<i>Myrcom 10</i>	TTAAGTGCCTTTGGCATTGT AGAGGACCTCGCGATAGACA	NED	(CT) ₁₇	B	216 – 248
<i>Myrcom 11</i>	GCAAATAAAAAGCGAGTTAAATGA CCACACTTTAAGAATTTGTGGTC	FAM	(TA) ₉	B	232 - 250
<i>Myrcom 12</i>	CCCTCCATTTTCCCTTCTC AGCCGAAGCTCCAAGAAAC	NED	(GA) ₉	A	168
<i>Myrcom 13</i>	TCCACTTTGCTCACACAAGC ATCTCTCACCTGCTACC	NED	(AAG) ₄ (AAC) ₃	A	207
<i>Myrcom 14</i>	TCATCATCTAAACCGCACCA TTACTGTTCATGCCACAC	NED	(TC) ₃ TG(TC) ₃ TG(TC) ₂ TG(TC) ₂ TG(TC) ₂ TG(TC) ₆	A	290

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

Per verificare l'avvenuta amplificazione, i prodotti di PCR (5 μ l) sono stati fatti correre per 45 minuti a 100 V in un gel di agarosio all'1,5%, colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto i raggi ultravioletti di un transilluminatore. Le dimensioni attese degli ampliconi, ottenuti mediante l'utilizzo dei primers forward e reverse, sono indicate nella Tabella 3.

2) Risoluzione degli amplificati mediante elettroforesi capillare

Una volta assicurata l'avvenuta amplificazione, i campioni sono stati inviati alla ditta MacroGen, Inc. (Seoul, Korea) che si è occupata dell'analisi delle dimensioni dei frammenti (bp) mediante elettroforesi capillare su sequenziatore ABI 3730XL. I campioni sono stati portati alla concentrazione di 50 ng/ μ l in H₂O mQ sterile filtrata, in un volume finale di 20 μ l, e inseriti all'interno di piastre da 96 pozzetti in polistirene, seguendo scrupolosamente le indicazioni raccomandate dalla ditta.

I risultati inviati dalla MacroGen, sotto forma di files .fsa, sono stati elaborati con il software Peak Scanner V1.0 (Applied Biosystems) e l'elettroferogramma, ottenuto per ogni singolo campione, è stato analizzato visivamente per valutare la presenza/assenza dei picchi.

Ciascuna coppia di primers SSR identifica un singolo locus nel genoma. I marcatori SSR sono codominanti, cioè consentono di distinguere i genotipi eterozigoti dagli omozigoti e di distinguere i diversi genotipi eterozigoti (oltre che i diversi omozigoti). Nell'elettroferogramma, un individuo omozigote appare come un unico "picco". Infatti, poiché il mirto ha un corredo cromosomico diploide ($2n=22$), tramite PCR vengono amplificati frammenti che contengono l'SSR che ha la stessa lunghezza su entrambi i cromosomi omologhi. Un individuo eterozigote appare invece caratterizzato da due "picchi" per lo stesso locus, cioè l'SSR ha diversa lunghezza sui due cromosomi omologhi.

La selezione dei picchi è stata fatta basandosi su due regole:

1: sono stati considerati come picchi presenti solo quelli con un valore ≥ 4000 RFU (*Relative Fluorescence Units*), mentre picchi al di sotto di questo valore venivano interpretati come rumore di fondo;

2: sono stati considerati solo quei loci con picchi aventi una forma quanto più simile a una gaussiana. Se i picchi presentavano una forma di difficile interpretazione, o le

bp (base pair) assegnate erano visivamente ambigue, tutta la serie di picchi di quel locus non veniva considerata.

I dati ottenuti per ciascun microsatellite sono stati sottoposti a test statistici.

3) *Analisi Statistica*

Le dimensioni degli alleli sono state registrate in una matrice binaria come genotipi omozigoti (AA, BB, CC...) o eterozigoti (AB, AC, BC...), per via della natura co-dominante dei marcatori SSR. La stima dei parametri genetici della popolazione è stata calcolata usando il programma statistico POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1997). La variabilità genetica e la ricchezza allelica sono state stimate ricorrendo al computo dell'eterozigosità osservata (H_{obs}) e attesa (H_{exp}), del numero osservato (N_a) e del numero effettivo (N_e) di alleli per locus e della percentuale di loci polimorfici (P) e le statistiche F di Wright, F_{st} e FIS.

Il numero di alleli effettivo è dato dalla formula $n_e = 1/\sum p_i^2$, dove p_i rappresenta la frequenza dell'iesimo allele ad un determinato locus (Kimura e Crow, 1964).

L'eterozigosità attesa (H_{exp}) rappresenta la frazione di individui eterozigoti, attesa in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg (Nei, 1973). Questa misura rappresenta anche la probabilità che campionando alleli ad un locus (in una popolazione) questi siano diversi.

Il coefficiente di F_{st} originariamente è stato definito dalla formula: $F_{st} = (HT - HS)/HT$, dove HT è la diversità genetica della popolazione totale e HS è la diversità media delle sottopopolazioni (Wright, 1951). Pertanto l' F_{st} misura l'inbreeding dovuto alla suddivisione delle popolazioni e costituisce, nel contempo una misura di distanza genetica tra popolazioni (Nei, 1978).

Minore è il flusso genico tra popolazioni, maggiore è l' F_{st} ; minore è l' F_{st} , maggiore è il flusso genico. L' F_{st} così definito è sempre compreso tra 0 (quando tutte le popolazioni hanno le stesse frequenze alleliche) e 1 (quando le popolazioni non condividono nessun allele, ossia quando hanno raggiunto la fissazione per alleli alternativi).

Per il calcolo delle statistiche F_{st} ed FIS si è utilizzato il software Arlequin vers.3.1.5. (Excoffier e Lischer, 2010). Per far questo è stata effettuata un'analisi della varianza molecolare (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) scomponendo la varianza nei

diversi livelli gerarchici presenti nella popolazione analizzata: tra gruppi, entro gruppi e tra individui entro gruppi. Il frame work utilizzato è stato il “*Genotypic data, one population, within - individual level*” (pag. 151 del manuale di Arlequin). Inoltre sono stati calcolati gli indici FIS “population specific”. La significatività delle statistiche F è stata saggiata tramite test di permutazione (100000 reps).

La proporzione di loci polimorfici (P) è un valore che si ottiene dalla formula: $P = \text{Numero loci polimorfici} / \text{Numero totale di loci}$.

Per studiare la struttura genetica degli SSR dei 265 campioni di mirto, è stato utilizzato il software STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009). Questo software utilizza un algoritmo di clusterizzazione “model-based” di tipo Bayesiano. L’assunto del software è che, nel campione totale, lo scostamento dalle condizioni di equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) e l’elevato *linkage disequilibrium* siano conseguenza della coesistenza di individui provenienti da popolazioni con diversi pool-genici (ovvero da popolazioni con diverse frequenze alleliche). Il software assume pertanto l’esistenza a priori di un determinato numero (K) di gruppi genetici (“true populations”). Quindi, assegna gli individui ai K gruppi utilizzando come criterio la minimizzazione (all’interno dei gruppi) dello scostamento dalle condizioni di equilibrio H-W e dei livelli di *linkage disequilibrium* tra loci (Pritchard e Wen, 2003). Per ciascun individuo, viene calcolata la probabilità di appartenenza a ciascuno dei K gruppi ipotizzati (*coefficient of membership*, Q). Di default, il software assegna ciascun individuo al gruppo per il quale mostra il maggiore valore di Q. Tuttavia, per avere un maggiore livello di stringenza, un individuo è generalmente attribuito al gruppo per il quale Q supera un determinato valore soglia (in questo caso $Q > 0.7$). Gli individui che non soddisfano tale criterio vengono definiti *admixed*, ossia tutti gli individui che hanno una probabilità di assegnazione inferiore al 70% e che quindi potrebbero far parte sia di un cluster che dell’altro. Quindi gli *admixed* sono tutti quei genotipi che non possono essere considerati determinati per il contributo dei pool genici delle diverse popolazioni.

Il software restituisce anche un valore di probabilità per ciascuna soluzione identificata (LnPD). Pertanto, al fine di identificare la “migliore soluzione”, devono essere eseguite più simulazioni per ogni K e per valori di K crescenti.

Al fine di calcolare il numero più probabile di gruppi genetici nel nostro dataset, è

stato applicato il metodo di Evanno *et al.* (2005). Questo consiste nel calcolo di una statistica ad hoc ΔK , che indica il valore di K in corrispondenza del quale la funzione $\text{LnPD}(K)$ raggiunge il plateau, i.e. il valore di K oltre il quale la probabilità di spiegare meglio il dataset diviene trascurabile. Per ciascun K sono state eseguite 20 simulazioni (100000 burn-in, 200000 runs). Per le simulazioni è stato scelto il modello con *admixture* (Falush *et al.*, 2003). Le simulazioni sono state condotte senza utilizzare l'informazione fenotipica (tipi varietali) come *prior*.

Per calcolare ΔK è stata utilizzato il software Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) (Earl *et al.*, 2012).

I file di input per i programmi sono stati costruiti tramite il software Convert versione 1.31 (Glaubitz, 2004).

3.3 Dati climatici

Per ogni area di campionamento si è cercato di individuare almeno una stazione meteorologica di riferimento (figura 2). Nei siti per i quali non è stato possibile ottenere i dati per la stazione di riferimento si è provveduto ad utilizzare la stazione di riferimento più vicina (tabella 4).

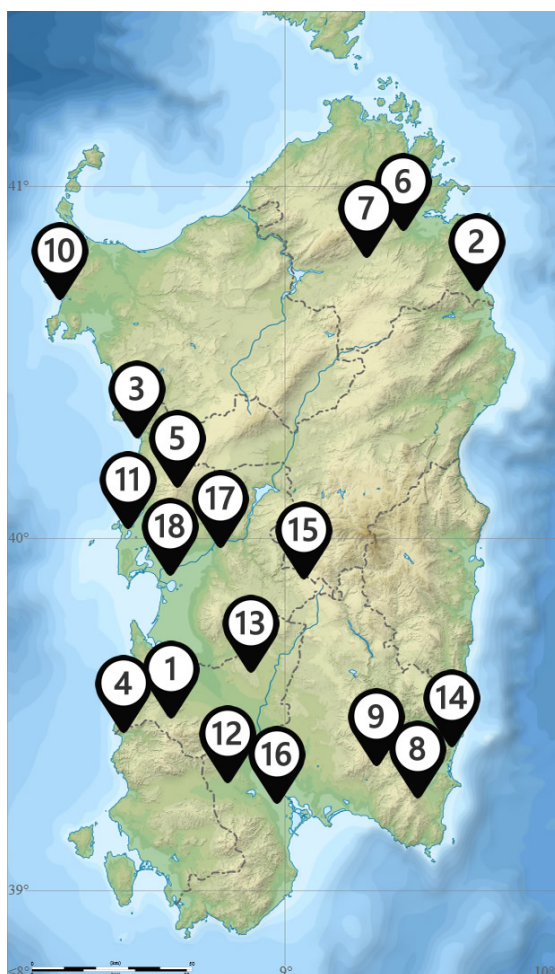


Figura 2. Distribuzione delle stazioni meteorologiche in riferimento ai siti di campionamento.

Tabella 4. Siti di campionamento con relative coordinate (sistema di riferimento WGS84) e relative quote altimetriche e stazioni meteorologiche di riferimento associate.

N°area	Sito campionamento	Altitudine (m.s.l.m.) Sito camp.	Stazione di riferimento.	Altitudine (m.s.l.) Staz. di rif.	Long.	Lat.
Area 1	Arbus	271	Gonnosfanadiga	190	1470950	4371530
Area 2	Budoni	70	Budoni	20	1559000	4506850
Area 3	Bosa	83	Tresnuraghes	263	1459590	4456380
Area 3	Modolo	103	Tresnuraghes	263	1459590	4456380
Area 4	Capo Pecora	50	Fluminimaggiore	45	1456910	4365400
Area 5	Cuglieri	235	Cuglieri	484	1463250	4448970
Area 6	Lori San Paolo	80	Olbia	15	1542780	4530430
Area 6	Telti	103	Olbia	15	1542780	4530430
Area 7	Monti	506	Monti	296	1527500	4517200
Area 8	Olea Speciosa	82	Castiadas	167	1542920	4343130
Area 9	Parco Sette Fratelli	422	Campuomu	664	1534500	4351175
Area 10	PortoFerro	35	Fertilia	39	1439500	4493900
Area 10	Rumanedda	45	Fertilia	39	1439500	4493900
Area 11	Riola Sardo	68	Riola Sardo	9	1460780	4427470
Area 12	Siliqua	68	Siliqua	53	1483390	4350230
Area 13	Siniscola	40	Torpè	24	1484550	4385190
Area 14	San Priamo	59	Muravera	19	1548490	4364000
Area 15	Santa Sofia (Laconi)	707	Santa Sofia	825	1511350	4413050
Area 16	Uta	151	Decimomannu	15	1497500	4349950
Area 17	Villaurbana	155	Mogorella	299	1487930	4412870
Area 18	Fenosu	11	Oristano	12	1466090	4417020

Per ciascuna stazione è stato possibile ottenere i dati storici dei principali parametri meteorologici, quali le temperature minime, massime, medie e le pluviometrie.

I dati meteorologici sono stati ottenuti dal Settore Idrografico della Regione Sardegna per un periodo di 20 anni a partire dal 1991. La difficoltà relativa al reperimento dei dati successivi al 2011 non ha consentito l'uso di una serie storica più ampia.

Una volta reperiti i dati si è provveduto al loro controllo e alla loro integrazione. Per i dati riguardanti le temperature è stato utilizzato il metodo della interpolazione lineare. I dati pluviometrici sono stati lasciati tali e quali.

Influenza dei fattori ambientali sulla variabilità genetica.

Al fine di valutare in che modo l'ambiente influenzasse le popolazioni di mirto analizzate, ci si è serviti dell'Analisi Multivariata.

Col termine "Analisi Multivariata" si indica quell'insieme di metodi statistici usati per analizzare simultaneamente più caratteri. L'esistenza di molte variabili interagenti l'una con l'altra complica alquanto l'analisi, rispetto all'ideale caso univariato. In tutte le analisi statistiche multivariate il materiale grezzo è costituito da un certo numero di caratteri che si vogliono studiare simultaneamente. L'analisi è detta infatti multivariata perché vi sono più variabili oggetto di studio, e non una sola (Soliani, 2001).

Nello specifico è stata utilizzata anche un particolare tipo di Analisi Multivariata detta Bivariata o Analisi di Contingenza. Si parla di Analisi Bivariata quando su ogni unità statistica, appartenente ad una determinata popolazione, si rivelano due caratteri. Può trattarsi di due caratteri qualitativi (ovvero mutabili) o di due caratteri quantitativi (ovvero variabili), oppure di un carattere quantitativo e di un carattere qualitativo. L'Analisi Bivariata evidenzia quindi se vi siano eventuali correlazioni o una qualche relazione tra due o più variabili aleatorie (Soliani, 2001).

Nel caso in esame è stata fatta inizialmente una correlazione tra i gruppi genetici individuati da STRUCTURE e l'altitudine dei diversi siti di campionamento, riportando i dati in un grafico a dispersione e valutando quanto essa fosse significativa. Successivamente ci si è serviti di un Analisi di Contingenza attraverso la quale è stato possibile mettere in relazione i due gruppi genetici con altre due variabili:

- 1) tre diverse classi di altitudine : inferiore ai 100 m, tra 101 e 200 m e superiore ai 201 m sul livello del mare, indicati rispettivamente con L, M e H.
- 2) la distribuzione geografica dei siti di campionamento utilizzando due diversi gradienti di distribuzione (gradiente Nord-Sud e gradiente Ovest-Est)

Il passo successivo è stato quello di comprendere in che modo l'ambiente in cui questa pianta vive e si sviluppa influenzi l'eterozigosità (H_e), ossia la quota della variabilità genetica che le popolazioni esaminate mostrano e che è stata ottenuta attraverso

l'analisi AMOVA. H_e è stata messa quindi in relazione con:

- i parametri meteo (medie termopluviometriche) ottenute dal Settore Idrografico della Sardegna
- l'altitudine
- la diversa origine delle popolazioni campionate.

Per i parametri meteo e l'altitudine è stata fatta un'analisi multivariata semplice tenendo in considerazione il coefficiente di Pearson (P) che esprime un eventuale relazione di linearità tra due variabili (Barbato *et al.*, 2014).

Per valutare invece la relazione tra i valori di H_e e le località è stata fatta un'ANOVA (o analisi della varianza) che permette di rapportare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi (Barbato *et al.*, 2014). Nello specifico è stato utilizzato il "Wilcoxon test", un tipo di test non parametrico che, in presenza di due valori ordinali provenienti da una distribuzione continua, verifica se i due campioni statistici provengano o meno dalla stessa popolazione.

Gli ultimi due test che sono stati eseguiti prendono in considerazione lo storico dei dati meteo registrati per 20 anni (1991-2011).

Nel primo test è stata valutata la correlazione tra lo storico dei dati meteo e i gruppi genetici riscontrati con STRUCTURE.

Nel secondo test è stata valutata la correlazione sfruttando le matrici di distanza. Per fare questo è stato utilizzato il "Mantel Test". Questo tipo di test è comunemente utilizzato in ecologia, dove i dati sono di solito delle stime della "distanza" tra oggetti. Una matrice potrebbe quindi contenere stime delle distanze genetiche e l'altra una stima della distanza geografica dei siti di campionamento. In questo caso è stato fatto inizialmente un Mantel test correlando la matrice di distanza genetica tra le popolazioni e la matrice di "distanza meteo". La prima è stata ottenuta con l'AMOVA valutando il valore di F_{st} per ciascuna popolazione. La seconda è stata creata come matrice di distanza euclidea, inserendo tutti i valori relativi ai dati meteorologici che hanno costituito lo storico

(temperatura media, massima, minima e medie pluviometriche). Al fine di comprendere quale componente dei dati meteo risulti maggiormente correlata con i valori di F_{st} , sono state analizzate singolarmente le diverse matrici: la matrice di temperature massime, di temperature minime, di temperature medie e la matrice delle medie pluviometriche. Tutte sono state correlate singolarmente con la matrice di distanza genetica (Sexton *et al.*, 2013).

Il Mantel Test e i Mantel test parziali sono stati calcolati con XLSTAT v.2014.6.01 (Microsoft Excel); il *p-value* è stato stimato utilizzando r (AB) stimata a partire da 10000 permutazioni.

6. Risultati

6.1 Dati climatici

Gli andamenti climatici della Sardegna risentono del suo carattere di insularità. In questo modo nelle aree costiere le temperature sono mitigate dalla presenza del mare, mentre spostandosi nelle zone interne questi effetti vanno via via attenuandosi e si registrano escursioni termiche di maggiore entità (Bandino e Dettori, 2001; Petrarca *et al.*, 1999).

Le temperature minime annuali si registrano nel mese di febbraio con valori medi intorno ai 9 °C mentre le temperature massime annuali si riscontrano nel mese di agosto con valori medi intorno ai 25,5 °C.

In riferimento agli andamenti delle temperature medie mensili, analizzando il contesto climatologico generale dell'isola, si riportano per il mese di gennaio, valori di 9,2 °C per le aree costiere del nord Sardegna, 9,8 °C per quelle dei versanti occidentali, e 10,5 °C per le temperature medie dei territori costieri della Sardegna meridionale (Mannella, 1973).

Man mano che si sale in altitudine questi valori aumentano secondo un gradiente di circa 0,5 °C ogni 100 m. Per il mese di luglio si stimano valori medi di temperatura intorno ai 24,9 °C sulle coste settentrionali, 25,4 °C su quelle occidentali, 25,3 °C su quelle orientali e 27 °C su quelle meridionali.

Gli andamenti pluviometrici sono legati all'evolversi delle perturbazioni che interessano l'isola e alle caratteristiche altimetriche delle zone.

Le zone più piovose sono quelle montuose dove i valori di pioggia superano gli 800 mm.

Le zone con meno abbondanza di piogge sono rappresentate dal medio campidano, dalla Nurra e dalla costa orientale con valori inferiori ai 600 mm. In quest'ultima zona le precipitazioni sono caratterizzate da una maggiore variabilità. In generale le precipitazioni,

in tutta l'isola, sono distribuite nei periodi che vanno da ottobre ad aprile (Fig. 3, 4 e 5) con particolare concentrazione nei mesi autunnali.

Si riportano di seguito gli andamenti termopluviometrici medi relativi alle aree studiate, derivanti dallo studio climatologico di ciascuna area. I dati sono stati reperiti dal Settore Idrografico della Regione Sardegna, calcolati su base ventennale.

Le normali climatologiche territoriali mostrano, seppur in maniera non immediata, delle differenze, specialmente per quanto riguarda l'andamento delle pluviometrie. Gli andamenti registrati sono quelli tipici del clima mediterraneo. In particolare il periodo che va da giugno ad agosto risulta essere quello più arido, caratterizzato da bassissime precipitazioni ed elevate temperature. Le precipitazioni appaiono concentrate prevalentemente nei periodi autunnali ed invernali. Nei mesi primaverili si assiste ad un graduale calo, normalmente dai primi di aprile. La ripresa delle piogge, a fine estate, si mostra in modo più o meno graduale a seconda dell'area.

Per quanto riguarda le temperature, le differenze tra le aree sono meno apprezzabili rispetto a quelle legate alle pluviometrie. Tuttavia, è possibile notare che le aree 7, 9, 16 e 18 sono quelle in cui le temperature si mantengono più basse soprattutto nei periodi invernali.

Particolarmente aride appaiono le aree 2, 10, 14 e 18, tutte caratterizzate, oltre che da un ampio periodo di scarsità di precipitazioni, anche da relativamente basse quantità di pioggia nei periodi più piovosi. Le pluviometrie più elevate nel periodo primaverile si registrano nelle aree 1, 7, 8 e 18. La ripresa delle piogge autunnali appare più marcata per le aree 3, 4, 5, 12, 15 e 16.

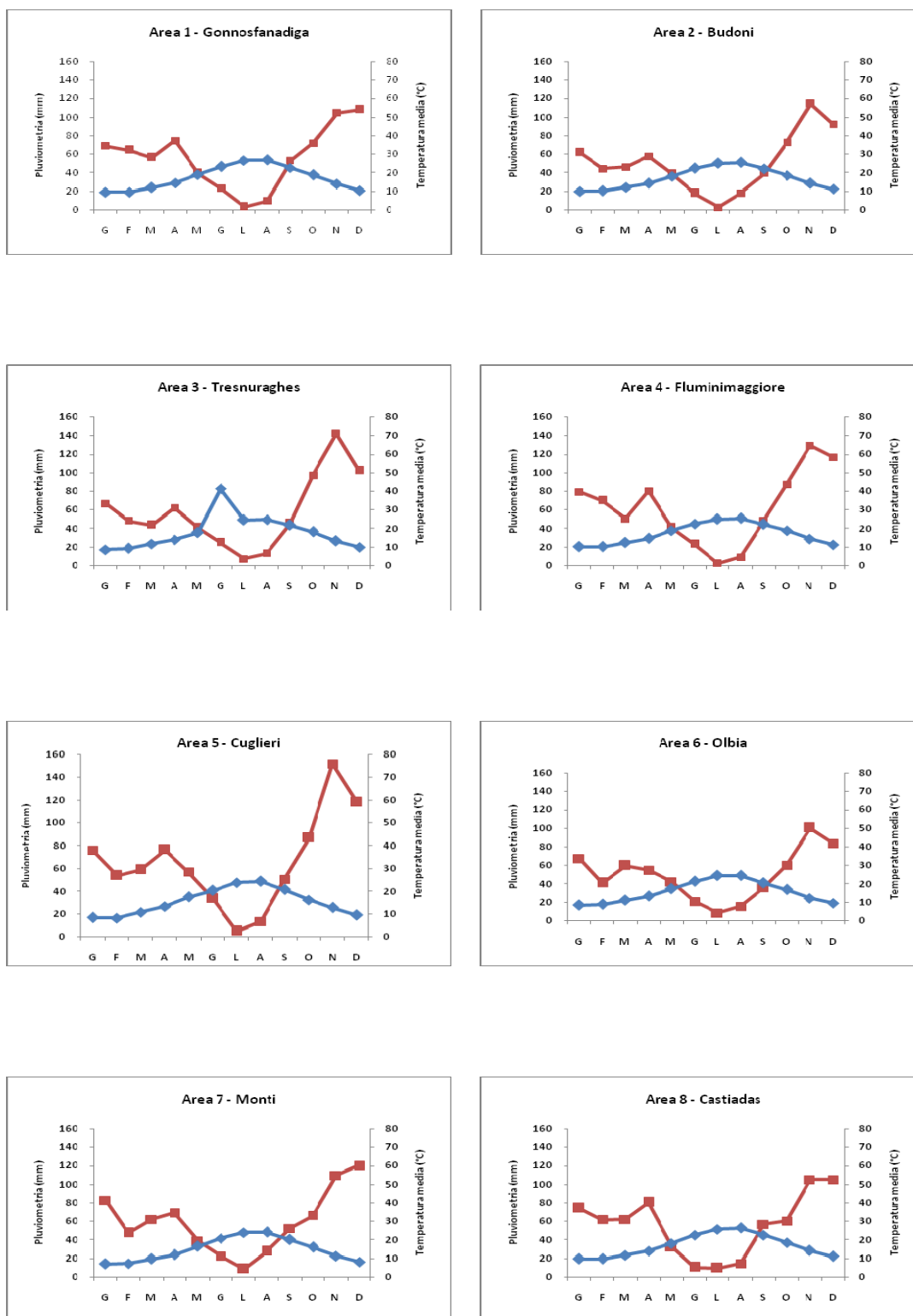


Figura 3. Andamenti termo pluviometrici caratteristici delle zone da 1 a 8, ottenuti sulla base di medie pluviennali (20 anni) rilevate dal Settore Idrografico Regionale. Linea blu= andamento delle temperature medie; linea rossa= andamento delle pluviometrie medie.

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

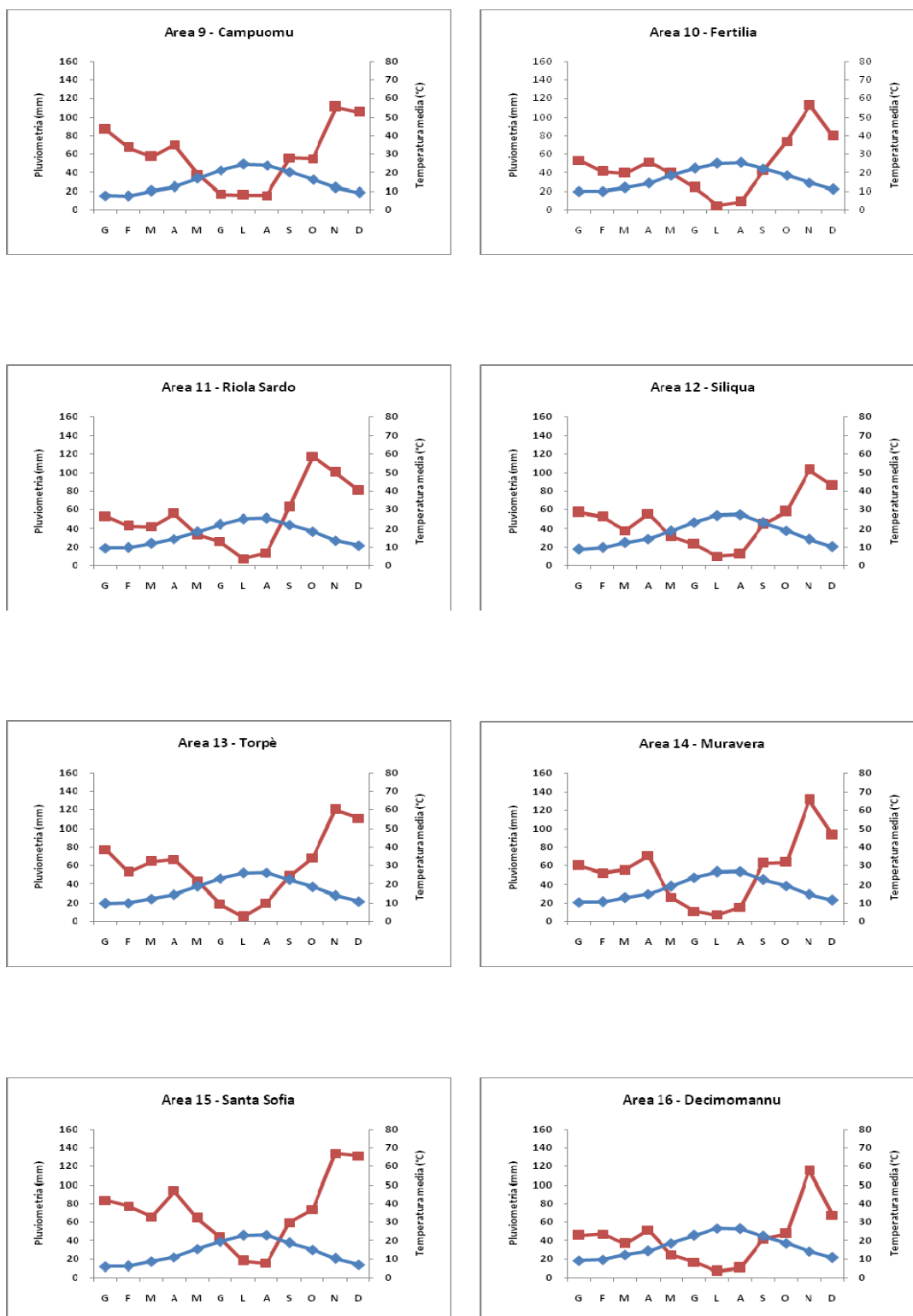


Figura 4. Andamenti termo pluviometrici caratteristici delle zone da 9 a 16, ottenuti sulla base di medie pluviennali (20 anni) rilevate dal Settore Idrografico Regionale. Linea blu= andamento delle temperature medie; linea rossa= andamento delle pluviometrie medie.

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

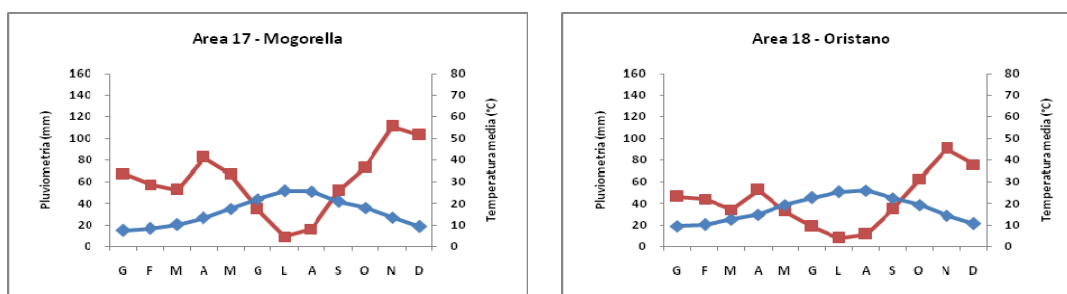


Figura 5. Andamenti termo pluviometrici caratteristici delle zone da 17 a 18, ottenuti sulla base di medie pluviennali (20 anni) rilevate dal Settore Idrografico Regionale. Linea blu= andamento delle temperature medie; linea rossa= andamento delle pluviometrie medie.

Le differenze termiche e pluviometriche si evidenziano utilizzando i dati medi delle stazioni di riferimento per gli anni che sono stati osservati ai fini dello studio. Nelle tabelle 5 e 6 è possibile apprezzare le medie mensili registrate per ciascuna stazione, le medie totali e le rispettive deviazioni dalla media.

Le aree con le temperature invernali più basse sono state: l'area 5, l'area 6, l'area 7, l'area 9, l'area 15 e l'area 17. Tra tutte, la 15 era l'area con la temperatura più bassa ma anche quella la cui stazione di riferimento era ubicata a notevole altitudine (825 m.s.l.).

Tabella 5. Temperature medie mensili (°C) calcolate su uno storico di 20 anni (1991-2011) per ciascuna delle aree considerate.

Mese	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Area 8	Area 9	Area 10	Area 11
G	9.5	10.0	8.6	10.2	8.4	8.5	7.2	9.9	7.7	10.0	9.6
F	9.6	10.2	9.4	10.3	8.3	8.9	7.4	9.9	7.5	10.0	9.9
M	12.0	12.2	11.8	12.6	10.7	11.1	9.8	11.9	10.2	12.1	12.1
A	14.5	14.3	14.1	14.8	13.2	13.4	12.1	14.0	12.4	14.3	14.5
M	19.1	18.2	17.9	19.0	17.5	17.5	16.5	18.1	17.0	18.5	18.3
G	23.3	22.2	41.4	22.6	20.3	21.5	20.7	22.6	21.2	22.3	22.4
L	26.5	25.1	24.5	25.0	23.8	24.5	23.9	25.8	24.6	25.0	25.3
A	26.9	25.5	24.9	25.6	24.5	24.6	24.2	26.3	23.9	25.4	25.6
S	22.6	22.2	21.9	22.4	20.8	20.6	20.1	22.5	20.2	22.0	22.1
O	18.8	18.5	18.2	18.9	16.2	16.9	16.1	18.5	16.2	18.6	18.5
N	13.9	14.3	13.5	14.5	12.7	12.3	11.4	14.3	12.1	14.5	13.6
D	10.6	11.2	10.0	11.5	9.5	9.5	8.2	11.1	9.3	11.1	10.9
Media	17.3	17.0	18.0	17.3	15.5	15.8	14.8	17.1	15.2	17.0	16.9

Mese	Area 12	Area 13	Area 14	Area 15	Area 16	Area 17	Area 18	Media	DS
G	9.0	9.9	10.5	6.1	9.2	7.5	9.5	8.8	1.51
F	9.7	10.1	10.7	6.2	9.6	8.4	10.4	9.3	1.56
M	12.4	12.3	12.9	8.7	12.3	10.2	12.8	11.7	1.56
A	14.5	14.5	15.1	10.9	14.3	13.4	15.0	13.9	1.48
M	18.9	18.8	19.3	15.5	18.6	17.7	19.4	18.3	1.37
G	23.6	22.9	23.8	19.5	22.7	22.2	22.8	22.5	1.42
L	27.0	25.9	26.9	22.9	26.6	25.9	25.5	25.8	1.41
A	27.5	26.2	27.0	23.0	26.4	25.8	26.3	26.0	1.45
S	23.1	22.4	22.9	18.7	22.4	21.0	22.6	21.9	1.57
O	19.1	18.5	19.4	14.9	18.4	18.1	19.4	18.3	1.55
N	14.4	14.1	14.8	10.3	14.0	13.6	14.5	13.7	1.53
D	10.3	11.0	11.6	6.9	10.6	9.3	10.7	10.1	1.54
Media	17.5	17.2	17.9	13.6	17.1	16.1	17.4	16.7	1.50

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in Myrtus communis.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

Tabella 6. Precipitazioni medie mensili (mm) calcolate su uno storico di 20 anni (1991-2011) per ciascuna delle aree considerate.

Mese	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Area 8	Area 9	Area 10	Area 11
G	69.1	61.5	66.8	79.0	76.4	67.7	82.9	74.2	86.7	53.2	53.3
F	64.5	44.2	48.5	69.8	54.0	41.0	47.2	61.9	67.0	41.1	42.8
M	56.3	46.1	43.8	50.6	59.2	59.7	62.1	62.3	57.3	39.4	42.2
A	74.9	57.9	62.0	80.1	76.6	55.1	69.2	80.5	70.2	51.5	56.6
M	39.3	38.3	40.9	40.9	57.0	42.4	39.0	32.7	37.8	39.3	33.3
G	23.3	17.8	24.9	23.1	33.6	20.9	22.7	10.5	17.1	24.0	26.1
L	3.5	3.2	7.4	2.8	5.1	8.4	8.7	9.6	16.0	5.0	7.5
A	9.9	18.1	13.4	9.1	13.5	15.7	27.4	14.7	15.5	8.8	13.6
S	52.9	39.3	45.4	48.8	50.6	36.2	52.5	56.8	55.8	42.4	62.7
O	72.0	73.0	97.2	87.4	86.6	60.4	66.4	60.2	54.9	73.8	117.6
N	104.9	114.6	142.5	129.2	152.2	100.3	109.4	105.3	110.9	113.1	100.3
D	108.3	92.3	101.8	116.7	118.2	83.8	120.3	105.4	105.5	79.5	80.4
Media	56.6	50.5	57.9	61.5	65.2	49.3	59.0	56.2	57.9	47.6	53.0

Mese	Area 12	Area 13	Area 14	Area 15	Area 16	Area 17	Area 18	Media	DS
G	57.1	77.4	60.0	83.7	45.7	67.6	46.3	62.5	14.6
F	52.9	52.7	52.4	77.4	46.8	57.9	44.5	54.9	10.8
M	38.2	64.5	56.1	65.8	36.6	52.9	34.4	49.8	13.4
A	55.9	66.7	70.9	94.2	51.6	82.2	52.8	67.8	16.0
M	31.7	43.2	26.3	64.4	24.5	67.3	33.0	41.5	17.7
G	23.3	19.0	11.1	43.0	16.6	35.0	18.8	23.8	11.2
L	10.1	5.3	7.3	17.6	7.1	9.2	7.8	9.2	4.0
A	12.3	20.2	15.4	15.4	10.5	16.5	11.7	14.6	3.3
S	44.7	48.2	62.4	59.6	41.5	52.0	35.0	49.1	9.8
O	58.1	68.4	63.5	74.0	47.4	74.0	63.0	64.1	9.4
N	102.8	120.0	131.4	133.7	116.0	111.1	90.3	115.0	15.4
D	85.9	110.3	93.2	131.3	67.4	102.8	75.7	95.2	21.7
Media	47.7	58.0	54.2	71.7	42.6	60.7	42.8	54.0	12.3

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in Myrtus communis.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

6.2 Analisi statistica dei dati genetici

I risultati ottenuti e i parametri di variabilità analizzati per gli SSRs in mirto sono mostrati nella Tabella 7.

Sono stati individuati un totale di 112 alleli che variano da un minimo di 4 per *Myrcom 1* e *Myrcom 12*, a un massimo di 26 per *Myrcom 8*. Le dimensioni degli alleli sono comprese tra 146 bp (*Myrcom 12*) a 277 bp (*Myrcom 14*). Dei 14 loci analizzati, uno (*Myrcom 2*) non ha prodotto nessun amplificato. Dei rimanenti 13 loci analizzati, 12 sono risultati polimorfici, con una percentuale del 92.31%, e solo un primer (*Myrcom 13*) è risultato monomorfico. I valori di eterozigosità osservata (H_{obs}) in tutti gli individui variava da 0,1057 (*Myrcom 4*) a 0,8853 (*Myrcom 8*) con una media di 0,5148, dimostrando che il germoplasma sardo è caratterizzato da un elevato livello di polimorfismo per i loci analizzati.

Tabella 7. Parametri di variabilità per locus: n_a = numero osservato degli alleli; n_e = numero effettivo degli alleli; H_{obs} = eterozigosità osservata; H_{exp} = eterozigosità attesa.

Nome Locus	N° campioni	Alleli			H_{obs}	H_{exp}
		Range ampliconi (bp)	n_a	n_e		
<i>Myrcom 1</i>	530	210 - 213	4	3.5224	0.7175	0.7161
<i>Myrcom 3</i>	526	150 - 161	6	1.5789	0.3674	0.3667
<i>Myrcom 4</i>	528	146 - 186	6	1.118	0.1057	0.1055
<i>Myrcom 5</i>	450	189 - 268	8	1.8672	0.4655	0.4644
<i>Myrcom 6</i>	482	154 - 257	9	4.4683	0.7778	0.7762
<i>Myrcom 7</i>	384	159 - 186	12	2.8138	0.6463	0.6446
<i>Myrcom 8</i>	440	185 - 265	26	8.5656	0.8853	0.8833
<i>Myrcom 9</i>	490	163 - 168	5	2.2516	0.557	0.5559
<i>Myrcom 10</i>	330	195 - 220	8	3.5813	0.723	0.7208
<i>Myrcom 11</i>	448	209 - 251	16	3.8639	0.7428	0.7412
<i>Myrcom 12</i>	508	146 - 151	4	1.3021	0.2325	0.232
<i>Myrcom 13</i>	484	188	1	1.0000	0	0
<i>Myrcom 14</i>	428	220 - 277	7	1.8906	0.4722	0.4711
Media	464		8.6154	2.9095	0.5148	0.5137
Totale			112	37.8237		

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

Il livello di diversità genetica è stato confermato dal valore medio di F_{st} ottenuto con l'AMOVA. Questo valore, riportato come matrice di distanza genetica tra le popolazioni, è pari a 0,26853 (Tabella 8). Attraverso l'AMOVA viene valutato il grado di differenziazione genetica esistente all'interno e tra le popolazioni analizzate. Dalla tabella 8 possiamo comprendere come la maggior parte del valore di F_{st} è imputabile alla variazione genetica all'interno delle popolazioni (73%).

Nelle matrici di distanza è possibile inoltre vedere quali siano le popolazioni che presentano una maggiore e una minore distanza genetica. Essendo una matrice sulla distanza genetica, le popolazioni che presentano un più alto valore di F_{st} saranno quelle più lontane, mentre quelle con un valore più piccolo saranno quelle più vicine. Quelle più lontane risultano essere Modolo e Olia Speciosa, Modolo e Porto Ferro, Bosa e Olia Speciosa con un valore di F_{st} pari a 0,5696, 0,5532, 0,5499 rispettivamente. Quelle più vicine invece risultano il Campo 11 di Fenosu e la popolazione di Bosa ($F_{st} = -0,0052$).

Tabella 8. Partizione della variazione genetica determinata attraverso l'analisi statistica con AMOVA.

Variabile	Gradi di libertà	Varianza	Coefficiente di variabilità
Tra le popolazioni	21	0,19067	27%
All'interno della popolazione	508	0,51937	73%
Totale	529	0,71003	
Indice di stabilità F_{st}	0,26853		

L'analisi con STRUCTURE ha permesso di individuare il più probabile valore di K per le popolazioni analizzate. I risultati ottenuti sono visibili nella figura 6. Dal grafico di ΔK il picco più alto è quello a $K=2$ ($\Delta K= 330.464$). Considerando questo picco, il germoplasma viene suddiviso in due cluster principali: CLUSTER A (CA) e CLUSTER B (CB). Tutti i campioni appartenenti a questi cluster mostrano un coefficiente di membership (Q) maggiore di 0,7 e per questo motivo è stato possibile assegnarli all'uno o all'altro cluster. I campioni che presentavano un valore di $Q < 0.7$ sono stati classificati come "admixed sample". L'analisi dei barplot generati da STRUCTURE per $K=2$ ha mostrato un'appartenenza di 116 individui al CA e di 143 al CB e 6 "admixed" (Cp 4, Mod 5, Mod 10, Rmm 3, Rmm 4 e Ssf 2) (figura 6). Dal grafico dei barplot si può vedere come i campi collezione localizzati a Fenosu (Campo 11 e Campo 54) appartengano al CA per un totale di 63 individui. Solamente due individui, appartenenti al Campo 54 (ASIN e CUG 11), appartengono invece al CB.

Ciascun cluster è stato nuovamente analizzato con STRUCTURE al fine di individuare ulteriori subcluster.

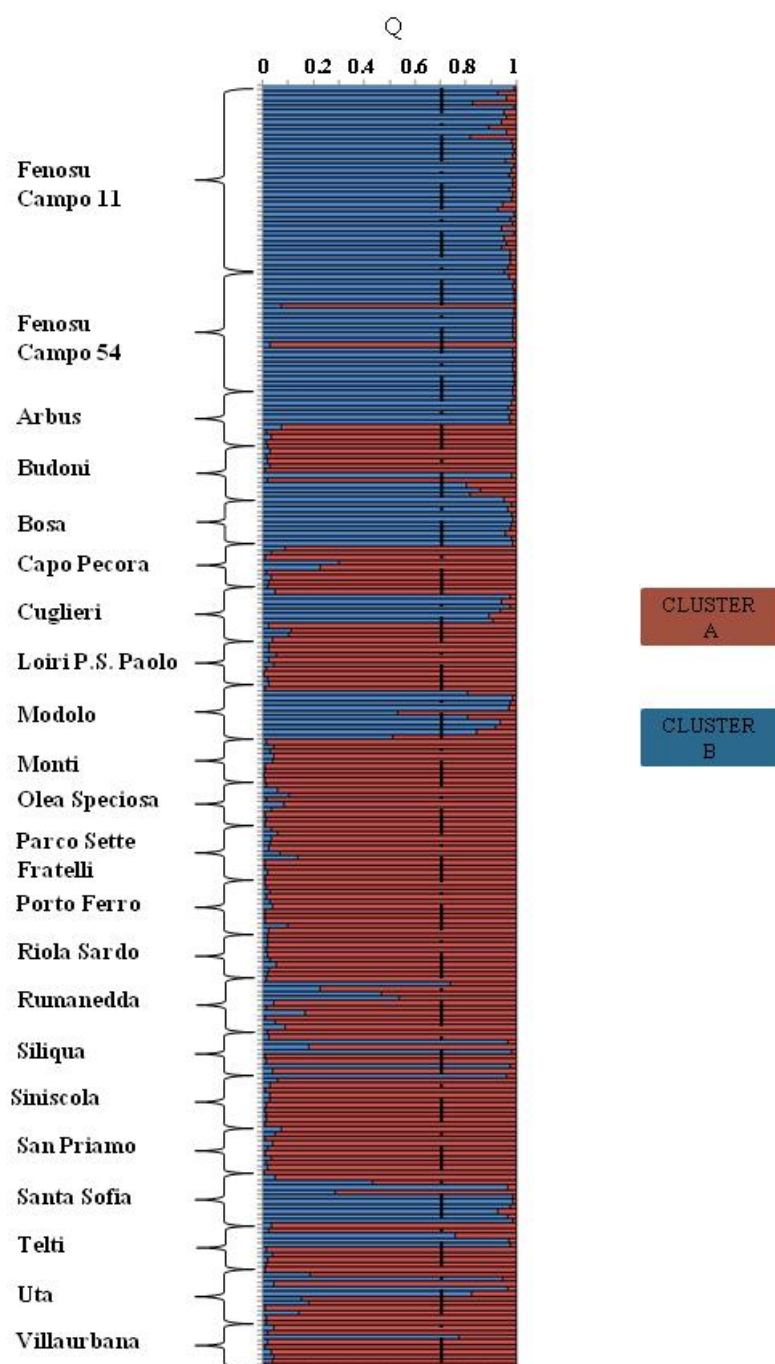


Figura 6. Struttura genetica di popolazione degli individui analizzati. Suddivisione in cluster ottenuta dall'analisi condotta sul modello di clusterizzazione Bayesiano delle popolazioni di mirto analizzate.

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in Myrtus communis.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

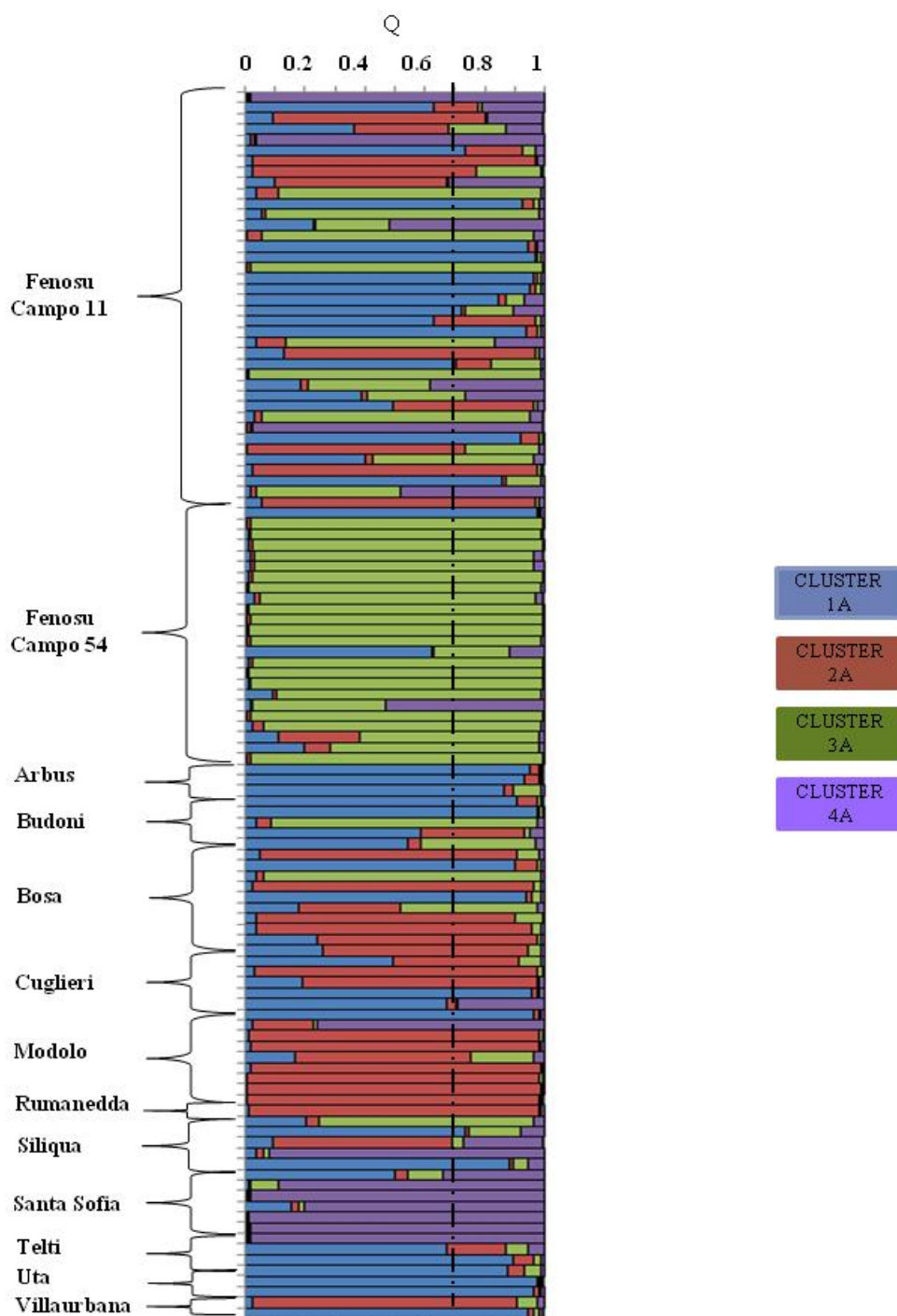


Figura 7. Struttura genetica di popolazione degli individui appartenenti al cluster A (CA). Suddivisione in cluster ottenuta dall'analisi condotta sul modello di clusterizzazione Bayesiano delle popolazioni di mirto analizzate

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in *Myrtus communis*.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

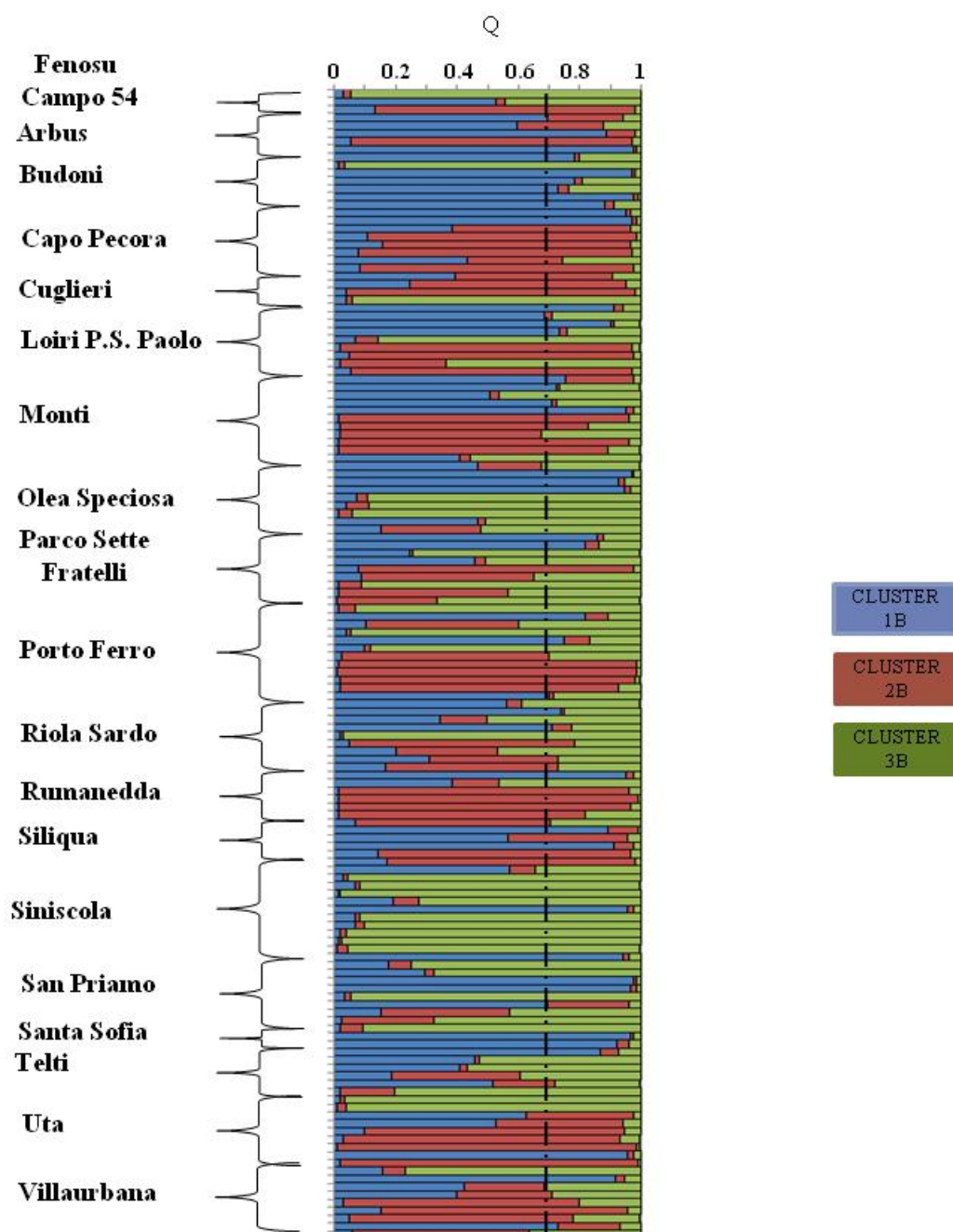


Figura 7. Struttura genetica di popolazione degli individui appartenenti al cluster B (CB). Suddivisione in cluster ottenuta dall'analisi condotta sul modello di clusterizzazione Bayesiano delle popolazioni di mirto analizzate

Dal grafico di ΔK relativo al CA il picco più alto risulta essere quello a $K=4$ ($\Delta K=56.802$) in cui gli individui sono suddivisi in 4 subcluster: C1A, C2A, C3A e C4A. Tutti i campioni appartenenti a questi subcluster mostrano un valore di $Q>0.7$: 31 individui appartengono al C1A, 20 al C2A, 30 al C3A e 11 al C4A. Gli individui “admixed” sono 23. Dall’analisi dei barplot possiamo vedere come la maggiore quota di variabilità appartenga al campo 11 a differenza dell’omogeneità dimostrata dal campo 59 (figura 7).

Dal grafico di ΔK relativo al CB il picco più alto è quello a $K=3$ ($\Delta K=18.264$) in cui gli individui sono separati in 3 subcluster: C1B, C2B e C3B. Tutti i campioni appartenenti a questi subcluster mostrano un valore di $Q>0.7$: 40 individui al C1B, 34 al C2B e 29 al C3B. In questo cluster il numero degli individui “admixed” è pari a 43 (figura 8).

In entrambi i subcluster individuati, il numero di “admixed” è molto alto, rapportato al numero di individui che costituiscono i diversi subcluster.

In questa prima analisi con STRUCTURE, gli individui appartenenti ai due campi di Fenosu (Campo 11 e Campo 54) sono stati considerati al pari delle popolazioni di mirto selvatico, raccolte su tutto il territorio regionale. In realtà essi provengono da diverse località della Sardegna, raccolti e selezionati, nel campo collezione, in base ad alcuni caratteri morfologici quali la buona produzione di biomassa e di frutti. Per questo motivo l’analisi con STRUCTURE è stata ripetuta scorporando i due campi di Fenosu e ricollocando ciascun individuo nella relativa popolazione selvatica di appartenenza, al fine di vedere se, in questo modo, il software avrebbe creato nuovi gruppi o mantenuto gli stessi della prima analisi.

Anche in questo caso, l’analisi con STRUCTURE ha permesso di individuare il più probabile valore di K , come $K=2$ ($\Delta K=270.876$), per le popolazioni analizzate, e l’appartenenza ad uno o all’altro cluster è stata valutata tenendo in considerazione un valore di $Q>0.7$.

L’analisi dei barplot generati da STRUCTURE per $K=2$ ha dimostrato un’appartenenza di 116 individui al CA e 142 individui al CB e 7 individui “admixed” (C_{pp} 4, Mod 5, Mod 10, R_{mm} 3, R_{mm} 4, S_{sf} 2 e S_{sf} 4).

Ciascun cluster è stato nuovamente analizzato con STRUCTURE al fine di individuare ulteriori subcluster. In questa analisi più approfondita purtroppo gli individui, separati nei diversi subcluster, non mostravano un sufficiente livello di confidenza tale da poter individuare dei subcluster definiti, come invece è accaduto con l'analisi precedente (figura 7 e 8).

6.3 Influenza dei fattori ambientali sulla variabilità genetica

Per poter comprendere meglio la relazione esistente tra la distribuzione della diversità genetica e le variabili ambientali, il passo successivo è stato quello di mettere in relazione i cluster ottenuti a $K=2$ (CA e CB) con l'altitudine e l'origine geografica dei diversi siti di campionamento.

L'analisi multivariata ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra l'altitudine dei siti di campionamento e i gruppi genetici. Nello specifico, è emersa una correlazione negativa tra il CA e l'altitudine dei siti di campionamento (correlazione = -0.1669; $P = 0.0065$). Ciò significa che all'aumentare del valore di Q diminuisce l'altitudine. Al contrario, per il CB la correlazione è stata positiva (correlazione = 0.1669; $P = 0.0065$) il che significa che all'aumentare del valore di Q aumenta anche l'altitudine.

La stretta correlazione tra altitudine e gruppi genetici è stata ulteriormente confermata dall'analisi di contingenza.

L'analisi, per quanto riguarda la distribuzione dei due gruppi genetici su tre differenti classi di altitudine, è risultata statisticamente significativa. La distribuzione dei campioni appartenenti al CA non è equa tra le tre classi di altitudine. La classe più numerosa infatti risulta essere la classe L con 84 individui (Figura 10). Al contrario per i campioni appartenenti al CB la distribuzione si presenta quasi equa. Anche in questo caso, la maggior parte dei campioni appartiene alla classe L (77 individui), ma la somma degli individui appartenenti alla classe M (27 individui) e alla classe H (39 individui) è circa la metà della totalità dei campioni appartenenti al CB (Figura 10).

L'analisi condotta fino a questo punto mostra come l'altitudine rappresenta un importante fattore che agisce sulla distribuzione della diversità genetica del mirto in Sardegna.

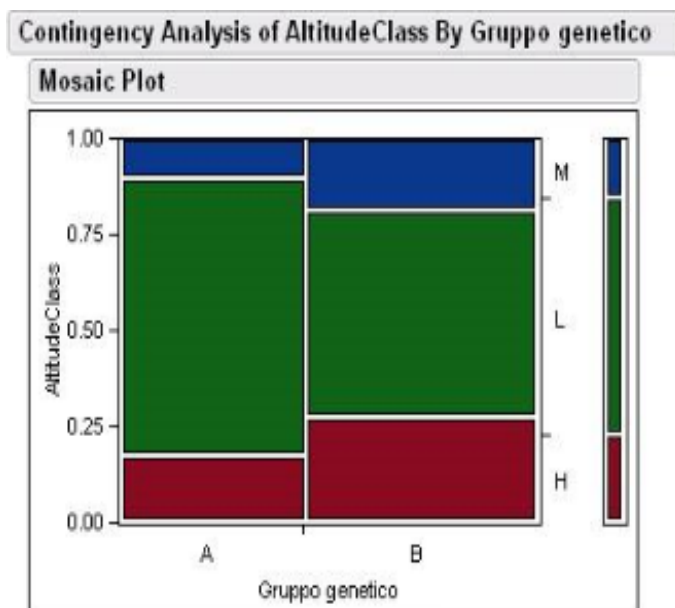


Figura 10. Analisi di contingenza tra il cluster A, il cluster B e l'altimetria.

Anche l'analisi di contingenza condotta utilizzando due gradienti di distribuzione geografica è risultata statisticamente significativa.

Il CA risulta essere significativamente più presente a Nord e a Ovest nel territorio regionale ($P = 0.0029$), mentre il CB risulta essere significativamente più presente a Sud ed Est ($P = 0.0005$) (Figura 11).

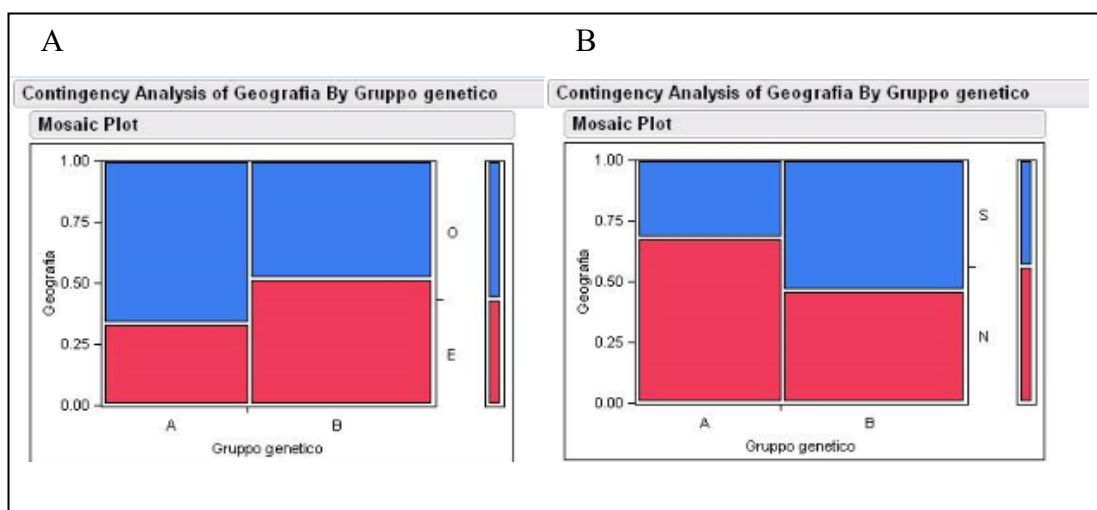


Figura 11. Analisi di contingenza. Distribuzione dei gruppi genetici nel gradiente Ovest-Est (A). Distribuzione dei gruppi genetici nel gradiente Nord-Sud (B).

L'analisi multivariata ha permesso di valutare il confronto tra H_e , i parametri termopluviometrici e l'altitudine. Entrambe le analisi non sono risultate statisticamente significative (Pearson $p < 0.05$). Questo ci fa capire come la quota della variabilità genetica non risulti influenzata da nessuna grandezza meteorologica (temperatura e pioggia) e neppure dall'altitudine dei diversi siti di campionamento.

L'analisi ANOVA sfruttando il "Wilcoxon test" è risultata essere statisticamente non significativa, evidenziando l'assenza di una differenza significativa nei valori di H_e tra località e località.

E' stata inoltre esplorata la relazione tra i gruppi genetici e le grandezze meteo ed è risultata essere statisticamente significativa. Nello specifico i due gruppi risultano essere correlati solo con due parametri specifici che sono la temperatura media del mese di giugno e la temperatura massima del mese di febbraio. In particolare il CA risulta correlato positivamente con questi due parametri ($p > 0.015$; $p > 0.044$), mentre il CB risulta correlato negativamente ($p < 0.015$; $p < 0.044$).

Il risultato del Mantel Test ha rivelato che la matrice di distanza genetica delle popolazioni esaminate, calcolato come valore di F_{st} , è correlata con la matrice di distanza dei dati meteo ($r = 0.052$, $p = 0.430$). Nello specifico i Mantel test parziali hanno dimostrato come la matrice di distanza genetica risulti correlata esclusivamente con la matrice di temperature medie ($p \text{ value} = 0.001$; $r(AB) = 0.221$); al contrario non risulta correlata con la matrice di temperature massime ($p \text{ value} = 0.678$; $r(AB) = 0.027$), con la matrice di temperature minime ($p \text{ value} = 0.384$; $r(AB) = -0.058$) e neanche con la matrice delle pluviometrie medie ($p \text{ value} = 0.707$; $r(AB) = 0.023$).

7. Discussione

La comprensione dei rapporti tra la distribuzione della diversità genetica e le variabili ecologiche ha un ruolo importante nelle strategie di conservazione della biodiversità e, in particolare, permette di ottenere informazioni utili per proseguire il percorso di domesticazione, tutt'ora in atto, della specie oggetto dello studio.

Le caratteristiche climatiche della Sardegna sono quelle tipiche dell'ambiente mediterraneo, contesto che offre al mirto le condizioni ideali per il proprio sviluppo. In molte zone dell'isola infatti sono presenti diverse zone in cui questa specie vegeta e si sviluppa.

Dall'analisi dei dati climatologici, riferiti alle stazioni di riferimento scelte per ciascuna area, si confermano le considerazioni di carattere generale che sono state fatte nei risultati; e ciascuna area riporta differenze sui rapporti termopluviometrici in maniera più o meno marcata in relazione all'altitudine, alla distanza dal mare e alla latitudine in cui è dislocata (Fig. 3, 4 e 5; Tab. 3 e 4).

Nel particolare, il parametro meteorologico che mostra maggiore variabilità tra un anno e l'altro è rappresentato dalle precipitazioni.

Nel caso del mirto, l'impatto dei parametri ecologici sulla variabilità genetica può fornire delle informazioni utili circa l'adattabilità di questa pianta alle diverse condizioni ambientali ed agronomiche.

I marcatori del DNA sono considerati un utile strumento, da affiancare ai marcatori fenotipici, per l'identificazione varietale, e sono ampiamente utilizzati per lo studio della variabilità e diversità genetica all'interno di una collezione di germoplasma.

Tra i diversi marcatori molecolari utilizzati, i microsatelliti sono considerati i marcatori per eccellenza, grazie alla natura co-dominante, alla capacità discriminante e alla riproducibilità fra i diversi laboratori (Rallo *et al.*, 2000; Carriero *et al.*, 2002; Bracci *et al.*, 2009).

I loci SSR utilizzati sono stati scelti dalla letteratura per l'elevato potere discriminante e per le capacità di fornire un elevato numero di alleli, escludendo quindi i marcatori dominanti (Albaladejo *et al.*, 2010). Tali primers SSR sono i primi ad essere stati sintetizzati *ex novo* su mirto. Numerosi infatti sono i lavori che utilizzano primers microsatelliti per lo studio di specie rare o a rischio estinzione, ma pochi sono invece quelli dedicati alle specie più comuni (Gaston, 2010). E questo è particolarmente importante se si pensa che le specie comuni sono, di solito, quelle chiave negli ecosistemi a causa del loro numero elevato e delle complesse interazioni che mostrano (Gaston, 2010). Inoltre, prove volte a trasferire marcatori microsatelliti in mirto, da altre specie appartenenti alla famiglia delle Myrtaceae, hanno fallito (Zucchi *et al.*, 2002).

Di tutti i 14 primers utilizzati solo uno (*Myrcom 2*) non è stato utilizzato per le analisi. Mentre con le due popolazioni di mirto spagnole questo primer era quello che mostrava un più alto numero di alleli (tabella 3), nelle popolazioni di mirto sarde non ha prodotto amplificati. L'amplificato infatti non era visibile né con la corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5%, né sottoforma di picchi nell'elettroferogramma. Probabilmente il programma di amplificazione per questo primer non permette la sua amplificazione nelle popolazioni di mirto sarde. Sarebbe necessario ottimizzare le condizioni di amplificazione.

Tutte le altre 13 coppie di primers SSR utilizzate, hanno fornito un chiaro profilo polimorfico di amplificazione e solo un locus (*Myrcom 13*) è risultato monomorfo. La misura della variabilità genetica di tutti gli individui analizzati risulta essere molto elevata, con una percentuale di loci polimorfici pari al 93%. A differenza dei risultati presenti in bibliografia (Albaladejo *et al.*, 2010), il numero degli alleli totali, così come il valore medio dell'eterozigotità osservata e attesa, risultano essere molto elevati nelle popolazioni analizzate (tabella 7). Questo può essere dovuto, in parte alla ridotta dimensione dei campioni spagnoli sui quali sono stati testati questi primers (48 individui provenienti da due popolazioni differenti), e in parte alla diversità, in termini di variabilità genetica, che esiste tra popolazione sarda e popolazione spagnola (Bruna *et al.*, 2007). A dimostrazione di questo vi è anche il ridotto numero di primers monomorfi (esclusivamente *Myrcom 13*) riscontrati nelle popolazioni di mirto sarde a fronte dei tre (*Myrcom 12, 13 e 14*) delle popolazioni di mirto spagnolo (tabella 3).

Le popolazioni di mirto sarde inoltre differiscono anche per quanto riguarda la dimensione degli ampliconi ottenuti, in quanto risultano essere circa 10 bp più “grandi” rispetto a quelli spagnoli (tabella 3 e 7).

Questi risultati confermano la diversità genetica esistente nelle due popolazioni, che era stata già riscontrata da Bruna e collaboratori (2007). Infatti, nonostante entrambe le regioni si trovino nella zona occidentale del Bacino del Mediterraneo e si trovino localizzate nella stessa area e relativamente vicine, esse mostrano una differenza, in termini di variabilità genetica, molto elevata. Nonostante l'uso di diversi marcatori molecolari (SSR vs. AFLP), la differenziazione tra individui sardi rispetto a quelli spagnoli, esiste e riflette l'isolamento geografico dell'isola, come è stato descritto per altre specie vegetali (Brotzu, 1998).

Questo elevato livello di diversità genetica è stato confermato dall'alto valore di F_{st} ($F_{st} = 0,26853$). Il parametro F_{st} , è un indice di distanza genetica fra le popolazioni (più le popolazioni sono differenziate, maggiore sarà l' F_{st}) e di flusso genico (maggior flusso genico implica un più basso F_{st}). Ciò significa che le popolazioni prese in esame non solo sono ben differenziate ma, che tra esse, il flusso genico è molto limitato. Come dimostrato da Melito e collaboratori (2014), anche in questo caso si può affermare che esiste un'influenza, data dalla localizzazione geografica, sulla differenziazione genetica all'interno delle popolazioni di mirto sarde. Infatti le barriere fisiche, come per esempio le montagne, possono influenzare la dispersione del polline, modificando quindi gli scambi genetici tra i diversi siti di campionamento. La maggiore quota di variabilità dipende infatti dall'elevata variabilità che esiste all'interno delle singole popolazioni (73%) piuttosto che tra le singole popolazioni (27%), dimostrando quindi una differenziazione relativamente limitata come previsto per le specie a fecondazione incrociata. Secondo Migliore e collaboratori (2012), la disomogeneità tra le popolazioni di mirto sardo sarebbe il risultato dell'espansione recente di questa pianta in Sardegna.

Il modello di clusterizzazione bayesiano implementato con STRUCTURE ha mostrato un elevato coefficiente di appartenenza (Q) degli individui ai diversi cluster. Per convenzione l'appartenenza ad uno o all'altro cluster viene stabilita con un valore di $Q > 0.7$. Valori più alti di Q vengono utilizzati nel caso in cui si voglia discriminare tra specie appartenenti allo stesso genere, in modo da aumentare il potere discriminante del

coefficiente di appartenenza (Rapposelli *et al.*, 2015). Valori più bassi si utilizzano per facilitare la suddivisione degli individui nei diversi cluster nel caso in cui il numero degli individui “admixed” sia troppo elevato, ma questo tende ad invalidare l’analisi.

Tutte le popolazioni sono state divise in due grandi gruppi definiti. I due campi collezione presenti a Fenosu, facevano entrambi parte del gruppo A, completato da altre 5 popolazioni di mirto selvatico (Arbus, esattamente per il 50% degli individui, Bosa, Cuglieri, Modolo e Santa Sofia). Anche scorporando i due campi collezione ed assegnando ciascun individuo alla relativa popolazione selvatica di origine, questi hanno clusterizzato comunque nel medesimo modo. Tale risultato conferma quello ottenuto da Melito *et al.* (2013a) con l’utilizzo di marcatori molecolari differenti (i.e. ISSR). Gli individui presenti nel campo collezione sono infatti selezionati da popolazioni selvatiche, presenti su tutto il territorio regionale, in base a diverse caratteristiche morfologiche. La selezione fenotipica potrebbe quindi essere stata efficace nel massimizzare le differenze tra questi individui, selezionati e coltivati, e quelli che costituiscono le popolazioni selvatiche, realizzando di fatto una pressione selettiva sulla variabilità genetica naturale.

Il sistema di clusterizzazione è stato ulteriormente forzato per verificare se effettivamente questi due cluster costituissero due gruppi compatti o se all’interno di ciascuno fosse possibile individuare dei subcluster ben distinti. Il risultato è stato l’individuazione di differenti subcluster (4 per il CA e 3 per il CB). Entrambi non hanno però dimostrato un sufficiente livello di confidenza tale da poter giustificare la presenza di questi sottogruppi. A conferma di ciò, in tutti i subcluster individuati nei due gruppi principali, il numero di individui “admixed” era notevolmente elevato (23 su un totale di 116 individui nel CA e 43 su un totale di 143 individui per il CB) (figura 7 e 8). Su questi risultati si può comunque fare una considerazione sui due campi collezione. Entrambi si trovano nel CA. Analizzando i barplot dei subcluster del CA, si può vedere come la maggiore quota di variabilità sia rappresentata dal Campo 11, a differenza del Campo 54 che invece si presenta più uniforme (Figura 7). Questo è dovuto alla natura stessa dei due campi collezione. Infatti il Campo 11 è costituito da cultivar diverse raccolte su tutto il territorio regionale; mentre, il Campo 54, è costituito per la maggior parte da incroci ottenuti da libera impollinazione di piante madri presenti nel Campo 11 (Tabella 2). Ecco perché il Campo 11 presenta una variabilità maggiore rispetto al Campo 54.

Lo studio della diversità genetica fine a se stessa è utile per comprendere la variabilità all'interno della specie analizzata ma senza le informazioni relative all'ambiente in cui la specie si sviluppa, è capace di dare solo un quadro conoscitivo relativo. Ecco perché la comprensione dei rapporti tra la diversità genetica e le variabili ecologiche è importante al fine di aumentare le conoscenze relative a quest'arbusto e ha un ruolo importante nello studio delle strategie di conservazione della biodiversità. Tra tutte le variabili ecologiche, il primo parametro che influenza la selezione e la differenziazione genetica risulta essere l'altitudine che produce delle vere e proprie barriere ecologiche contro il flusso genico.

La differenziazione genetica locale, data dal gradiente di altitudine, è stata studiata in diverse specie erbacee selvatiche come *Helichrysum italicum* (Melito *et al.*, 2013b) e *Elymus nutans* (Yan *et al.*, 2009), mentre sono poche le informazioni disponibili su specie coltivate e forestali. Per la famiglia delle Myrtaceae le informazioni riguardanti l'influenza dei fattori ecologici sulla distribuzione e sulla struttura genetica sono ridotte e quasi inesistenti quelle riguardanti specificatamente il *Myrtus communis* L.

L'analisi multivariata condotta, mostra come esista una stretta correlazione tra i due gruppi genetici, individuati nelle popolazioni analizzate, e l'altitudine dei siti di campionamento. Per meglio comprendere questa relazione, è stata studiata la distribuzione genetica dei cluster su tre livelli di altitudine (meno di 100 m, da 101 a 200 m, maggiore di 200 m slm). In Sardegna infatti il mirto cresce fino a 800 metri sopra il livello del mare (Mulas *et al.*, 2002); tuttavia gli individui oggetto dello studio sono stati raccolti fino ad un'altitudine di 707 metri s.l.m. (Santa Sofia, Laconi). Sono state scelte esclusivamente queste tre classi di altitudine in quanto la maggior parte dei siti di campionamento sono localizzati nella prima e nella seconda classe. Ulteriori suddivisioni in più classi di altitudine avrebbero aumentato la specificità del test ma, allo stesso tempo, le classi sarebbero state meno consistenti portando alla formazione di classi assolutamente prive di campioni. Infatti l'altitudine dei siti di campionamento è varia ma non presenta un crescente costante (Tabella 4).

Da questa analisi risulta ancora più chiaro quanto già riscontrato con l'analisi multivariata. Infatti il CA risulta essere correlato negativamente con l'altitudine, ossia all'aumentare del coefficiente di appartenenza, l'altitudine diminuisce e quindi gli

individui si distribuiscono maggiormente nella classe altimetrica al di sotto dei 100 metri s.l.m.; mentre all'aumentare del coefficiente di appartenenza per il CB, aumenta l'altitudine e quindi gli individui si distribuiscono maggiormente nell'ultima classe altimetrica (> 201 metri s.l.m.) (figura 14). Questo risultato potrebbe sembrare in qualche modo contraddittorio. Infatti il sito di campionamento che si trova all'altitudine più elevata (Santa Sofia, Laconi) appartiene al CA che è significativamente presente nella classe altimetrica intermedia (101<200 m s.l.m.). Ma, mentre per il CA l'unico sito al di sopra dei 200 m s.l.m. è appunto Santa Sofia, al CB appartengono tutti gli altri siti di campionamento che si trovano ad altitudini elevate (Monti, Telti e Parco Sette Fratelli, rispettivamente a 506, 356 e 422 m.s.l.m.). Il CB quindi risulta essere quantitativamente più ricco di individui localizzati ad elevate altitudini (> 201 m.s.l.m.) ed ecco perché risulta essere significativamente presente nell'ultima classe altimetrica al contrario di quanto accade per il CA.

Se consideriamo la particolarità dei meccanismi di diffusione della specie che ha dispersione del seme zoocora e predilige suoli acidi o neutri, questi risultati confermano che i fattori ambientali possono agire nei processi di selezione, suggerendo che la presenza di una variazione nella composizione genica sulla base dell'adattamento a diversi livelli di altitudine è possibile.

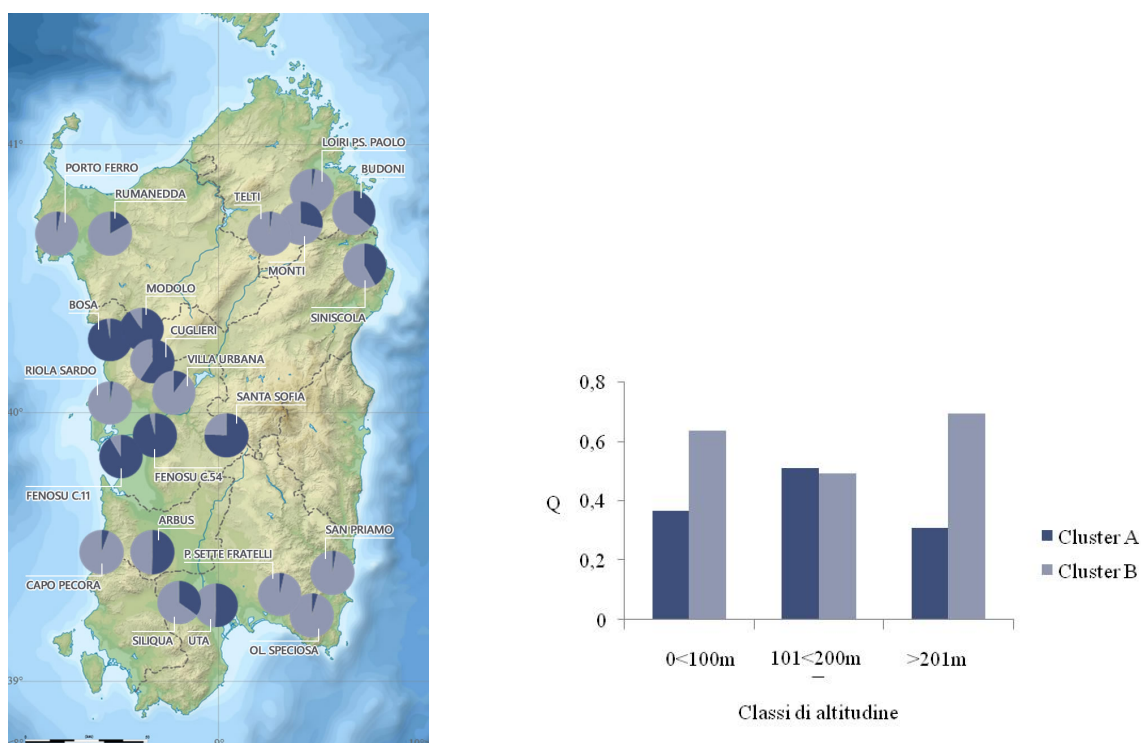


Figura 14. Distribuzione dei cluster di appetenza sulle diverse classi di altitudine.

Un altro aspetto che influenza la distribuzione della variabilità genetica è dato dalla forma stessa dell'isola. Infatti essa presenta una distanza tra Nord (punta Falcone) e Sud (Capo Teulada) di 270 km, mentre 145 sono i km di larghezza (da Capo dell'Argentiera a ovest, a Capo Comino ad est) (Enciclopedia italiana, 1936).

Per questo motivo è stata ripetuta l'analisi di contingenza prendendo in esame i due gradienti di distribuzione geografica: gradiente Nord-Sud e gradiente Ovest-Est. Il risultato è stata una distribuzione netta e definita dei due gruppi genetici con la presenza del CA nel gradiente Nord ed Ovest, e il CB nel gradiente Sud e ed Est.

Questi risultati riflettono la geografia stessa dell'isola che mostra la presenza di un sistema orografico che la attraversa da Ovest a Est e da Nord a Sud. Tale sistema non è formato una un'unica catena montuosa, come accade per le Alpi o gli Appennini, ma da un insieme di monti disposti in gruppi, divisi fra loro da bassopiani ed altipiani. Pur essendo divisi, sono tutti situati nella parte orientale dell'isola. Questa distribuzione porta alla formazione di due versanti, uno stretto e ripidissimo verso oriente, e uno più largo, con una pendenza più dolce, verso occidente (Camarda, 1993).

Caterina Mele

Studio dell'influenza delle variabili agrometeorologiche sulla diversità genetica in Myrtus communis.
 Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari
 Indirizzo: Agrometeorologia ed Ecofisiologia dei Sistemi Agrari e Forestali

La tendenza geografica osservata nella distribuzione dei due cluster può essere, quindi, parzialmente influenzata dalla posizione delle montagne (distribuzione ovest-est) e dalla lunga distanza da nord a sud, che può aver limitato il flusso genico. Questi dati sono compatibili con l'ipotesi dell'isolamento da distanza.

Questi risultati sono diversi da quelli ottenuti da Agrimonti e collaboratori (2007), che non avevano riscontrato delle correlazioni significative tra la variabilità genetica e la distanza geografica delle popolazioni di mirto campionate in Sardegna. Tale differenza potrebbe essere dovuta alla ridotta dimensione del campione e alla differente strategia di campionamento utilizzata da questi autori.

Il passo successivo è stato quello di valutare quanto la variabilità genetica totale presente nell'insieme dei campioni esaminati fosse influenzata dalle caratteristiche termopluviometriche, dell'altitudine dei siti di campionamento e dalla differenza esistente tra le popolazioni di appartenenza dei campioni.

Il risultato di queste tre prove, che hanno sfruttato rispettivamente l'analisi multivariata, l'ANOVA e il Wilcoxon test, non è risultata statisticamente significativa. Ciò indica che non esiste nessuna relazione tra H_e e le tre caratteristiche prese in esame.

Questo risultato è facilmente comprensibile se si pensa al modo attraverso cui avviene l'impollinazione e la dispersione dei semi per questo arbusto.

L'impollinazione avviene principalmente per via anemofila o entomofila (González-Varo *et al.*, 2009). I coleotteri, e in particolari le api, sono i maggiori responsabili della diffusione del polline. A causa delle loro ridotte capacità di volo, l'impollinazione può essere effettuata solo su brevi distanze, principalmente tra individui della stessa popolazione o tra popolazioni strettamente connesse. Inoltre, i fiori del mirto sono ermafroditi, e questo consente un certo grado di impollinazione (Agrimonti, 2007); mentre l'autofertilità della specie è stata dimostrata sperimentalmente (Mulas e Fadda, 2004).

Tutte queste considerazioni possono spiegare l'assenza di una correlazione significativa tra la quota di H_e totale osservata, e le popolazioni di origine dei campioni esaminati.

Studi specifici riportano che le bacche di mirto sono una componente essenziale dell'alimentazione di mammiferi onnivori ma prevalentemente carnivori come la volpe

rossa, le martore e le donnole (Aronne e Russo, 1997). Altri studi hanno rivelato che anche gli uccelli, in particolare i tordi e gli storni, svolgono un ruolo importante nella diffusione del mirto, contribuendo alla dispersione dei suoi semi sulle lunghe distanze (Barnea *et al.*, 1991; Traveset *et al.*, 2001). La notevole mobilità di questi animali costituisce un fattore importante nella diffusione di semi in scenari ambientali differenti, aumentando quindi la possibilità per alcuni semi di trovare condizioni adatte alla germinazione (Howe e Smallwood, 1982). Da questo punto di vista, uccelli e mammiferi carnivori possono essere considerati come i diversi collegamenti di un processo di dispersione multivettoriale che ha come risultato lo sviluppo di specie vegetali mediterranee con caratteristiche di sopravvivenza migliorate (Aronne e Russo 1997).

Tutte queste considerazioni, insieme alla non significatività dei risultati ottenuti, portano a concludere che il flusso genico tra le popolazioni esaminate dipenda da entrambi i fattori, ma che sia maggiormente correlato alla dispersione del seme piuttosto che alle modalità di impollinazione.

Le ultime analisi hanno visto l'utilizzo della serie storica di dati meteo, utilizzata per descrivere l'inquadramento climatico della regione, nel ventennio dal 1991 al 2011.

Per prima cosa temperatura media, massima, minima e pluviometrie sono state messe in relazione con i due gruppi genetici individuati da STRUCTURE. Tale analisi è risultata statisticamente significativa solamente con due parametri: la temperatura media del mese di giugno e quella massima del mese di febbraio. Questi mesi sono i più importanti per il mirto. Infatti il germogliamento avviene tra la fine di marzo e i primi di aprile. L'accrescimento vegetativo è intenso nei mesi di aprile, maggio e giugno, e a giugno inizia anche la fioritura che si protrae fino ad agosto (Mulas *et al.*, 1999).

Nello specifico a presentare una correlazione positiva con questi parametri è stato il CA, mentre il CB ha mostrato una correlazione negativa. Questo significa che all'aumentare della temperatura media del mese di giugno e di quella massima di febbraio, aumentava il valore del coefficiente di appartenenza (Q) al CA; viceversa per il CB.

Il CA era costituito dagli individui presenti nei due Campi di Fenosu, e dalle popolazioni selvatiche di Arbus, Bosa, Cuglieri, Modolo e Santa Sofia, mentre il CB dalle rimanenti popolazioni selvatiche (figura 7 e 8). Gli individui facenti parte del CA risultano quindi essere più termofili rispetto a quelli appartenenti al CB. Questo è spiegato dal fatto

che il CA è distribuito su tutto il territorio che fa parte della provincia di Oristano. Il clima di questo territorio è caratterizzato da inverni miti ed in alcuni casi freddi molto umidi ed estati calde e secche. Le temperature invernali solitamente si aggirano da una minima di 3 °C a una massima di 10 °C mentre quelle estive da un minimo di 20 °C ad un massimo di 35 °C e in alcuni casi addirittura 40 °C (Figura 5). Si tratta, però, di un clima che risulta essere molto influenzato dalle correnti atlantiche che fanno cambiare radicalmente le temperature e con delle precipitazioni talvolta molto abbondanti.

Queste caratteristiche possono aver influenzato la variabilità genetica degli individui appartenenti a questo gruppo, rendendoli più termofili rispetto a quelli appartenenti al CB, in particolare per quanto riguarda il germogliamento che, nelle zone a clima mite, risulta essere anticipato di due o tre settimane anticipando, quindi, anche le fasi successive di accrescimento vegetativo e fioritura (Mulas *et al.*, 1999).

Lo studio della genetica, affiancato a quello delle caratteristiche del paesaggio, fornisce un approccio efficace per valutare gli effetti dell'ambiente sulle connessioni tra le popolazioni e di conseguenza permette di valutare il flusso genico fra le stesse (Manel *et al.*, 2003; Holderegger *et al.*, 2008). Per questo motivo è stato utilizzato il Mantel test che si presenta come il principale strumento di analisi statistica in grado di dare un peso a questo rapporto. L'approccio analitico si basa sul calcolo a coppie delle distanze geografiche che vengono poi correlate con le distanze genetiche tra gli stessi individui (Mantel 1967; Smouse *et al.*, 1986). Questo approccio sfrutta l'indice di correlazione per ranghi di Spearman che è una misura statistica non parametrica di correlazione. Al contrario del coefficiente di correlazione lineare di Pearson, il coefficiente di Spearman non misura una relazione lineare anche qualora vengano usate misure intervallari.

Diversi sono stati gli studi circa l'adeguatezza del Mantel Test per analisi genetiche correlate alle caratteristiche dell'ambiente. Recentemente Legendre e Fortin (2010) hanno affermato che i modelli lineari tradizionali tendono a sottovalutare il "valore" del rapporto esistente tra diversità genetica e ambiente; al contrario, un approccio di regressione lineare come il Mantel Test, risulta essere più adeguato. Il motivo di ciò sta nel fatto che le ipotesi, in questo test, sono esplicitamente definite in termini di matrici di distanza genetica e di matrici di distanza euclidea (Yang *et al.*, 2015).

Nel caso del mirto la correlazione tra la matrice di distanza genetica e quella

euclidea (originata dalla temperatura massima, minima, media e dalle precipitazioni) è risultata statisticamente significativa. Questo conferma il fatto che le diverse condizioni climatiche, in particolare temperatura e precipitazioni, interessano la crescita e la fenologia delle piante. In particolare per le piante che si trovano nelle zone temperate, dove in primavera esiste una buona alternanza tra caldo e precipitazioni, il periodo di dormienza sarà più breve rispetto alle piante presenti nelle zone più fredde e secche. Allo stesso modo, le abbondanti precipitazioni in autunno e inverno possono influenzare in maniera significativa il germogliamento e la fioritura dell'anno successivo. In particolare se le precipitazioni dell'inverno e dell'autunno precedente sono state abbondanti, il germogliamento e la fioritura si verificheranno nella prima parte dell'anno rispetto alla media. Di conseguenza le differenze in precipitazioni tra inverno ed estate hanno probabilmente degli effetti molto forti sui fattori ecofisiologici che controllano la fioritura e i processi produttivi (Yang *et al.*, 2013). I risultati ottenuti con il mirto sono coerenti con l'ipotesi che le variazioni stagionali di temperatura possano influenzare il flusso genico, ma non le precipitazioni. Questo suggerisce che le differenze climatiche probabilmente portano ad una riduzione della capacità adattativa degli individui. Nello specifico i cambiamenti nei gradienti delle precipitazioni possono agire come fattori resistenti al limitare del flusso genico e possono quindi fornire una previsione sulla differenziazione genetica risultante dell'isolamento da distanza (de Léon *et al.*, 2010; Gavrilets 2000 Gavrilets e Vose 2007; Niemiller *et al.*, 2008; Nosil 2008).

8. Conclusioni

La tutela delle risorse genetiche di specie tipiche della macchia mediterranea non può prescindere da una valutazione delle possibilità di un loro uso sostenibile. La variabilità fenotipica e genetica, riscontrabile anche a livello intraspecifico, rappresenta un'irrinunciabile risorsa economica non ancora pienamente conosciuta e valorizzata per le sue potenzialità (Chessa, 2006). Pertanto si rende necessario approfondire le conoscenze sul livello di diversità che tali specie esprimono, con l'obiettivo principale di avviare programmi che abbiano lo scopo di tutelare questa risorsa e, al contempo, promuoverne l'utilizzo in diversi settori.

In particolare per la specie *Myrtus communis* sono state avviate iniziative finalizzate alla valorizzazione delle potenziali utilizzazioni della specie, per favorire il rilancio di usi tradizionali, quali quelli consolidati nei settori alimentare ed ornamentale, e lo sviluppo di prodotti innovativi applicabili in campo fitoterapico, bio-farmacologico e cosmetico (Chessa e Mulas, 2005).

L'obiettivo di questo lavoro era da un lato quello di classificare da un punto di vista genetico il germoplasma di mirto sardo attraverso gli strumenti della biologia molecolare; e dall'altro cercare di stabilire quanto di questa variabilità fosse imputabile all'azione dell'ambiente in cui questa pianta nasce e si sviluppa.

Il gruppo di cultivar selezionate è risultato essere ben distinguibile dall'insieme dei campioni selvatici raccolti su tutta la regione, andando a formare un gruppo a sé stante. Questo è dovuto all'effetto prodotto dalla pressione selettiva su queste cultivar che, pur essendo rappresentative della variabilità del mirto presente in Sardegna, si trovano a vivere in un ambiente circoscritto e caratterizzato da una costante alternanza nelle variabili ambientali quali temperatura e piogge.

La comprensione dell'attuale distribuzione delle risorse genetiche delle specie arboree implica la comprensione dei flussi genici e l'adattamento all'ambiente, il quale

risulta fortemente influenzato dalle caratteristiche del paesaggio.

Da questo studio è emerso come il livello di pluviometria sembra non influenzare la selezione naturale del mirto, a differenza di quanto accade per l'altitudine dei siti di colonizzazione, e di conseguenza per il regime termico. Questo dipende dalle particolari esigenze in termini di umidità del suolo. E' noto infatti che il mirto colonizza aree del paesaggio naturale ben rifornite di umidità, come fondovalle, fossati o aree paludose, e questa sua esigenza, combinata alla natura termofila e acidofila della specie, genera una serie di vincoli ecologici che vanno poi a intersecarsi con le variabili agrometeorologiche studiate.

Alla luce di queste considerazioni si può affermare che il mirto sardo è caratterizzato da un'elevata variabilità genetica che, in linea con le proprie esigenze ambientali, gli permette di distribuirsi su gran parte del territorio regionale.

Questo lavoro rappresenta solo un primo passo nella comprensione di tutti i meccanismi che influenzano la crescita di questa pianta e di conseguenza il suo sviluppo e la produzione di biomassa che rappresenta una importante risorsa economica per l'Isola con la produzione del tipico liquore. Il passo successivo sarà quello da un lato, di approfondire la comprensione del legame tra l'ambiente e la variabilità genetica, attraverso lo studio di altri fattori ambientali, quali tipo di suolo, vento, irradiazione solare, e attraverso la sintesi di nuovi marcatori molecolari SSR. Dall'altro, invece, vista la particolarità del mirto sardo, riscontrata sia in termini di variabilità che di composizione chimica degli oli essenziali (Mulas e Melis, 2011) sarebbe interessante creare un profilo proteomico di questa pianta. Il proteoma infatti è l'insieme di tutti i possibili prodotti proteici espressi in una cellula, incluse tutte le isoforme e le modificazioni post-traduzionali. Il proteoma risulta essere dinamico nel tempo e soprattutto varia in risposta a fattori esterni e differisce sostanzialmente tra i diversi tipi cellulari di uno stesso organismo. Diversi infatti sono i lavori che descrivono la caratterizzazione del profilo proteico su piante arboree quali ad esempio la vite (Abdi et al., 2002; Barraclough et al., 2004). Il più grande ostacolo in questo approccio è caratterizzato dalla presenza all'interno delle cellule vegetali di numerosi composti che possono influenzare l'estrazione, la separazione e la purificazione delle proteine. Il confronto dei pattern proteici così ottenuti permetterà di definire la presenza di eventuali proteine differenzialmente espresse in

funzione delle componenti della pianta analizzate. Questo permetterà quindi di comprendere al meglio i meccanismi regolatori che sottostanno al funzionamento e all'adattamento del sistema biologico a particolari condizioni ambientali e di coltivazione.

9. Bibliografia

- Abdi N., Holford P., McGlasson B., 2002. Application of two dimensional gel electrophoresis to detect proteins associated with harvest maturity in stonefruit. *Postharvest Biol. Tec.*, 26, 1–13.
- Agrimonti C., Bianchi R., Ballero M., Poli F., Marmiroli N., 2007. Understanding biological conservation strategies: a molecular-genetic approach to the case of myrtle (*Myrtus communis* L.) into Italian regions: Sardinia and Calabria. *Conserv. Genet.*, 8: 385-396.
- Al Laham S.H., Al Fadel F., 2013. Antibacterial effectiveness of many plants extracts against the resistant Negative Coagulase Staphylococcus that cause Clinical Mastitis in Cows. *Inter. J. Pharma. Clinic. Res.*, 5(2):72-7.
- Albaladejo R.G., Sebastiani F., González-Martínez S.C., González-Varo J.P., Vendramin G.G., Aparicio A. (2010). Isolation of microsatellite markers for the common Mediterranean shrub *Myrtus communis* (Myrtaceae). *Am. J. Bot.*, 97(5), e23-e25.
- Aronne D., Russo D., 1997. Carnivorous mammals as seed dispersers of *Myrtus communis* (Myrtaceae) in the Mediterranean shrublands. *Plant Biosyst* 131(3):189–195.
- Arrigoni P. V., 1968. Fitoclimatologia della Sardegna. *Webbia*, 23(1), 1-100.
- Bandino G., Dettori S., 2001. Manuale di Olivicoltura. Consorzio Interprovinciale per la Frutticoltura, Regione Autonoma della Sardegna:378.
- Baraldi P., Baraldi C., Fagnano C., Ferioli V., Gamberini M. C., 2004. Ricerche sui contenuti dei balsamari di Oplontis. *Rivista di studi pompeiani*, 15(15): 109-125.
- Barcaccia G., Falcinelli M., 2006. *Genetica e genomica*. Liguori.
- Barcaccia G., Albertini E., Rosellini D., Tavoletti S., Veronesi F., 2000. Inheritance and mapping of 2 n-egg production in diploid alfalfa. *Genome*, 43(3): 528-537.
- Barnea A., Yom-Tov Y., Friedman J., 1991. Does ingestion by birds affect seed germination? *Funct Ecol* 5:394–402.

- Barraclough D., Obenland D., Laing W., Carroll T., 2004. A general method for two-dimensional protein electrophoresis of fruit samples. *Postharvest Biol. Tec.*, 32, 175–181
- Beckman J.S., Soller M., 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.*, 67:35-43.
- Ben Ghnaya A.B., Hanana M., Amri I., Balti H., Gargouri S., Jamoussi B., Hamrouni L., 2013. Chemical composition of *Eucalyptus erythrocorys* essential oils and evaluation of their herbicidal and antifungal activities. *J. Pestic. Sci.*, 86(3): 571-577.
- Blondel J., Aronson J., 1999. *Biology and wildlife of the Mediterranean region*. Oxford University Press.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3): 314.
- Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P., 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome*, 39(4): 628-633.
- Bracci T., Sebastiani L., Busconi M., Fogher C., Belaj A., Trujillo I., 2009. SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sc. Hort.*, 122: 209-215.
- Brotzu R., 1998. *Alberi, arbusti ed erbe della Sardegna*. Quaderni Natura 1, Il Maestrone Ed., Nuoro.
- Bruna S., Portis E., Cervelli C., De Benedetti L., Schiva T., Mercuri A., 2007. AFLP-based genetic relationships in Mediterranean myrtle (*Myrtus communis* L.). *Sci. Hort.*, 113: 370-375.
- Bubani P., 1869. *Flora Virgiliana ovvero sulle piante menzionate da Virgilio pareri esposti, considerati, proposti ancora*.
- Camarda I., 2004. La macchia mediterranea come ecosistema forestale complesso. In: *Italus Hortus. Atti del Convegno Nazionale “Piante della macchia mediterranea: dagli usi tradizionali alle nuove opportunità agro-industriali”*, 11: (3) 8-15.
- Camarda I., 1993. *Montagne di Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari.
- Camarda I., Valsecchi F., 2008. *Alberi e arbusti spontanei della Sardegna*. Carlo Delfino Editore, Sassari: 408-409.

- Canhoto J.M., Lopes M.L., Cruz G.S., 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant. Cell. Tiss. Org.*, 57(1): 13-21.
- Cannas S., Molicotti P., Ruggeri M., Cubeddu M., Sanguinetti M., Marongiu B., Zanetti S., 2013. Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. *J. Inf. Develop. Countr.*, 7(3): 295-298.
- Carr J., Xu M., Dudley J.W., Korbanm S.S., 2001. AFLP analysis of genetic variability in New Guinea impatiens. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1509-1516.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G., 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet.*, 104: 301-307.
- Cattabiani A., 1996. Florario: miti, leggende e simboli di fiori e piante. Mondadori.
- Cellini G., 2004. Catullo, XXXVI, 11-il culto di Afrodite-Venere in Adriatico. *Hesperia*, 18(18): 357-373.
- Cervelli C., 2003. Panorama varietale in *Myrtus communis* e selezioni per uso ornamentale. *Flortecnica*, 5:90-93.
- Cervelli C., De Lucia B., 2004. Floricoltura, vivaismo e arredo verde: gli usi ornamentali delle piante della macchia mediterranea. *Italus Hortus*, 11(4): 40-49.
- Chessa I., 2006. Agrodiversità: Tutela e Utilizzazione Consapevole. In: "Saperi e sapori del Mediterraneo", AM&D Edizioni, Cagliari, 175-191.
- Chessa I., Nieddu M., Erre P., Cocco G.F., Nieddu G., 2005. Applicazione di marcatori molecolari per la caratterizzazione di genotipi di *Myrtus communis* L. Atti della Terza Giornata di Studio sul Mirto: 13-18.
- Chessa I. e Mulas M., 2005. Le specie frutticole della macchia mediterranea: la valorizzazione di una risorsa. *Italus Hortus*, 12 (2), 37-42.
- Chessa I., Nieddu G., 2005. Analysis of diversity in the fruit tree genetic resources from a Mediterranean island. *Genet. Resour. Crop. Ev.*, 52(3): 267-276.
- Chybicki I.J., and Burczyk J. (2009). Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Hered.*, 100(1), 106-113.
- Critchfield H.J., 1983. *General Climatology*. Prentice – Hall.
- Dahab A. M. A., Shafiq Y., Al-Kinany A., Yahya M. D., 1975. Effect of seasonal variations in root formation and growth of cuttings of different trees and shrubs. *Mesopotamia. J. Agri.*, 10(1/2): 3-12.

- de Leòn L.F., Bermingham E., Podos J., Hendry A.P., 2010. Divergence with gene flow as facilitated by ecological differences: within-island variation in Darwin's finches. *Philos Trans R Soc B* 365:1041–1052.
- Di Castri F., Goodall D.W., Specht R.L., 1981. *Ecosystems of the world*. Vol. XI: Mediterranean-type shrublands. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.
- Dimundo R., 2000. *L'elegia allo specchio: studi sul I libro degli Amores di Ovidio*. Edipugliasrl.
- Earl Dent A. and von Holdt Bridgett M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Ellis R.H., Hong T.D., Roberts E.H., 1985. *Handbook of seed technology for genebanks*. Volume II. Compendium of specific germination information and test recommendations.
- Enciclopedia italiana di lettere scienze e arti. Sardegna, 1936. Ed. Istituto dell'Enciclopedia Italiana.
- Evanno G., Regnaut S. and Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier L., Smouse P.E. and Quattro J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.
- Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes*, 7(4), 574-578.
- Ferretti F., 2008. *Regine del Sahara*. Africa: 658-667.
- Fiori A., 1925. *Myrtus* L. In: *Nuova flora analitica d'Italia*. Ricci, Firenze, 2:3.

- Gaston K.J., 2010. Valuing common species. *Science* 327: 154-155.
- Gavilán R. G., 2005. The use of climatic parameters and indices in vegetation distribution. A case study in the Spanish System Central. *Int. J. biometeorol.*, 50(2), 111-120.
- Glaubitz J.C., 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Mol. Ecol. Notes* 4, 309-10.
- Godwin I.D., Aitken E.A., Smith L.W., 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9): 1524-1528.
- González-Varo J.P., Arroyo J., Aparicio A., 2009. Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biol. Conserv.*, 142(5): 1058-1065.
- Gavrilets S., 2000. Waiting time to parapatric speciation. *Proc. R. Soc. B.* 570(267):2483–2492.
- Gavrilets S., Vose A., 2007. Case studies and mathematical models of ecological speciation. 2. Palms on an oceanic island. *Mol. Ecol.* 16:2910–2921.
- Gréco J., 1995. Omeopatia in ginecologia. *Tecniche Nuove*.
- Gupta P.K., Varshney R.K., 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3): 163-185.
- Gupta M., Chyi Y.S., Romero-Severson J., & Owen J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89(7-8), 998-1006.
- Holderegger R., Wagner H.H., 2008. Landscape genetics. *Bioscience*, 58, 199–207.
- Howe H.F., Smallwood J., 1982. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 13:201–208.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M. and Pritchard J.K., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour.*, 9(5), 1322-1332.
- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., Van De Wiel C., Bredemejer G., Vosmn B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini M., Maestri E., Malcevschi A., Marmilori N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR

- markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breeding*, 3 (5): 381-390.
- Jordan S.A., Humphries P., 1994. Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7 q31-q35. *Hum. Mol. Genet.*, 3(10): 1915.
- Kapelev I.G., Kirmanova N.F., 1977. Physical dormancy in myrtle seed. *Sci. Horticult.*, 5: 363-366.
- Khosh-Khui M., Bassiri A., 1976. Physical dormancy in myrtle seed. *Sci. Horticult.*, 5(4): 363-366.
- Khosh-Khui M., Shekafandeh A., Azarakhsh H., 1984. Micropropagation of myrtle. *Sci. Horticult.*, 22(1): 139-146.
- Kommissarov D.A., 1962. Physiological changes in cutting of woody plants in relation to condition of rooting. *Hort. Abs.*, 3: 5341.
- Lagoda P.J., Dambier D., Grapin A., Baurens F.C., Lanaud C., Noyer J.L., 1998. Non radioactive sequence tagged microsatellite site analyses: A method transferable to the tropics. *Electrophoresis*, 19(2): 152-157.
- Lee J., Huang C.J., Shin Y., 1997. On stationary tests in the presence of structural breaks. *Econ. Lett.*, 55(2): 165-172.
- Legendre P., Fortin M.J., 2010. Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Mol. Ecol.*, 10:831–844
- Levinson G., Gutman G.A., 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4(3): 203-221.
- Kimura M. and Crow J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725.
- Magherini R., Giannini P., Menghini A., Nardelli G.M., Morelli I., Cioni P.L., Bertone G., 1988. Schede delle principali piante medicinali e aromatiche. *Italia Agricola*.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.*, 18, 189–197.
- Mannella C., 1973. Il clima dell'Italia. Vol. III, Ed. Fratelli Conte: 729-825.
- Martyn D., 1992. *Climates of the world*. Elsevier.
- Matus I.A., Hayes P.M., 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45(6): 1095-1106.

- Médail F., Quézel P., 1999. Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: setting global conservation priorities. *Conserv. Biol.*, 13(6): 1510-1513.
- Melito S., Chessa I., Erre P., Podani J., Mulas M., 2013a. The genetic diversity of Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) population. *Elect. Journ. of Biotec.*, 16:1-14.
- Melito S., Sias A., Petretto G.L., Chessa M., Pintore G., Porceddu A., 2013b. Genetic and metabolite diversity of Sardinian populations of *Helichrysum italicum*. *PLoS One* 8:E79043.
- Melito S., Fadda A., Rapposelli E., Mulas M., 2014. Genetic diversity and population structure of Sardinian myrtle (*Myrtus communis* L.) selections as obtained by AFLP markers. *Hort. Scien.*, 49(5):531-537.
- Messaoud C., Boussaid M., 2013. Comparative Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Myrtus communis* L. Essential Oils Isolated from Tunisian and Algerian Population. *J. Plant. Pathol. Microbiol.*, 4:7.
- Messaoud C., Khoudja Laarbi M., Boussaid M., 2006. Genetic diversity and structure of wild Tunisian *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) population. *Gen. Resour. Crop Evol.*, 53: 407-417.
- Meyer J.P., Allen N.J., Smith C.A., 1993. Commitment to organizations and occupations: Extension and test of a three-component conceptualization. *J. Appl. Psychol.*, 78(4): 538.
- Migliore J., Baumel A., Juin M., Médail F., 2012. From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *J. Biogeogr.*, 39(5), 942-956.
- Mitchell S.E., Kresovich S., Jester C.A., Hernandez C.J., Szewc-McFadden A.K., 1997. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Science*, 37(2): 617-624.
- Mitrakos K., 1981. Temperature germination responses in three Mediterranean evergreen sclerophylls. In *Components of productivity of Mediterranean-climate regions Basic and applied aspects*. Springer Netherlands: 277-279.
- Mooney H. A., 1988. Lessons from Mediterranean-climate regions. *Biodiversity*, 157-165.
- Morgante M., Olivieri A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1): 175-182.

- Mueller U., Wolfenbarger L., 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389-394.
- Mulas M., 2001. Caratteristiche dei frutti in selezioni di mirto (*Myrtus communis* L.). Atti del 5° Convegno Nazionale sulla Biodiversità. Caserta, 9-10 settembre 1999: 263-270.
- Mulas M., 2002. Variabilità delle risorse genetiche e domesticazione di specie legnose spontanee dell'ambiente mediterraneo. Atti delle "VI Giornate Scientifiche SOI"-Workshop. Spoleto (PG), 23-25 aprile: 5-8.
- Mulas M., 2007. Orientamenti per la scelta delle cultivar di mirto. Atti della "Quarta Giornata di Studio sul Mirto". Sassari, 8 maggio: 60-69.
- Mulas M., 2009. La coltivazione del mirto come complemento alle raccolte da piante spontanee per la sostenibilità dell'utilizzo industriale. Atti del Terzo Convegno Nazionale sulle Piante Mediterranee "Le Piante Mediterranee nelle Scelte Strategiche per l'Agricoltura e l'Ambiente". Bari, 27 settembre/1 ottobre 2006. *Italian Journal of Agronomy, Supplement issue IV (4)*: 679-684.
- Mulas M., 2012. The myrtle (*Myrtus communis* L.) case, from a wild shrub to a new fruit crop. *Acta Hort.*, 948: 235-242.
- Mulas M., Cani M.R., Brigaglia N., 1998. Characters useful to cultivation in spontaneous populations of *Myrtus communis* L. *Acta Hort.*, 457: 271-278.
- Mulas M., Cani M.R., Deidda P., 1999. Osservazioni sulla biologia per la domesticazione del *Myrtus communis* L. *Collana di Studi. Mirto di Sardegna Tradizionale*, 66-67.
- Mulas M., Cani M.R., Brigaglia N., Deidda P., 1999. Study of myrtle (*Myrtus communis* L.) genetic resources to promote extensive crop as integration of spontaneous harvests. *Acta Hort.*, 502:85-88.
- Mulas M., Deidda P., 1998. Domestication of woody plants from Mediterranean maquis to promote new crops for mountain lands. *Acta Hort.*, 457: 295-301.
- Mulas M., Fadda A., 2004. First observations on biology and organ morphology of Myrtle (*Myrtus communis* L.) flower. *Agr. Med.* Vol. 134, 223-235.
- Mulas M., Francesconi A.H.D., Perinu B., Nieddu G., Deidda P., 2000. Il Mirto (*Myrtus communis* L.). Ed. Istituto Guglielmo Tagliacarne, Roma (Italia): 72.

- Mulas M., Cani M. R., Brigaglia N., Deidda P., 1998. Selezione varietale da popolazioni spontanee per la coltivazione di mirto e corbezzolo in Sardegna. *Rivista di Frutticoltura*, 3: 45-50.
- Mulas M., Fadda A., Francesconi A.H.D., 2001. Osservazioni sulla biologia fiorale del mirto (*Myrtus communis* L.). Atti della "Giornata di studio sul mirto". Sassari, 30 giugno 1999: 105-112.
- Mulas M., Francesconi A.H.D., Perinu B., 2002a. Myrtle (*Myrtus communis* L.) as a new aromatic crop: cultivar selection. Sassari, 30 giugno 1999: 113-121.
- Mulas M., Perinu B., Francesconi A.H.D., Nieddu M.A., Fadda A., Peana I., 2002b. Primi risultati sperimentali per la coltivazione del mirto (*Myrtus Communis* L.): la selezione varietale. *L'Informatore Agrario*, (4): 55-59.
- Mulas M., Francesconi A.H.D., Perinu B., Peana I., Nieddu M.A., Fadda A., 2002c. "Giovanna", "Grazia" e "Ilaria": tre nuove cultivar per la coltivazione del mirto. *Rivista di Frutticoltura*, 64(1): 49-51.
- Mulas M., Melis R.A.M., 2011. Essential Oil Composition of Myrtle (*Myrtus communis*) Leaves. *J. Herb. Spec. Med. Plant.*, 17: 1, .21-34.
- Mullis K.B., Falona F.A., Sharf S.J., Saiki K., Horn G.T., Herlich H.A., 1987. Specific enzymatic amplification of Dna in vitro: The polimerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 263-273.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 15(3): 473-497.
- Myers N., 1988. Threatened biotas:"hot spots" in tropical forests. *Environmentalist*, 8(3): 187-208.
- Myers N. 1990. The biodiversity challenge: expanded hot-spots analysis. *Environmentalist*, 10(4), 243-256.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Da Fonseca G.A., Kent J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853-858.
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 70: 3321-3323.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3), 583-590.

- Niemiller M.L., Fitzpatrick B.M., Miller B.T., 2008. Recent divergence with gene-flow in Tennessee cave salamanders (Plethodontidae; Gyrinophylus) inferred from gene genealogies. *Mol Ecol* 17:2258–2275.
- Nosil P., 2008. Speciation with gene flow could be common. *Mol Ecol* 17:2103–2106.
- Pampanini R., 1940. Il *Myrtus communis* L. di Macchiareddu presso Cagliari. *Rendiconti dei Seminari della Facoltà di Scienze dell'Università di Cagliari*, 10: 134-144.
- Paoletti G., 1990. *Myrtus* (Tourn.) L. In: A. Fiori, G. Paoletti. *Flora analitica d'Italia*. Tip. Seminario, Padova. 2, 126.
- Parlatore F., 1842. *Flora italica*. Editore Le Monnier, Firenze, 5: 117-121.
- Petrarca S., Spinelli F., Cogliani M., Mancini M., 1999. Profilo climatologico dell'Italia. ENEA Vol. 7: Calabria, Sicilia e Sardegna.
- Picci V., Atzei A.D., 1996. Ricerche su specie di interesse medicinale ed aromatico della Sardegna. Ricerche morfo-sistematiche e biologiche su finocchio, liquirizia, mirto, rosmarino e zafferano. *Rivista italiana EPPOS*, 19: 159-169.
- Portis E., Comino C., Lenzi A., Lombardi P., Tesi R., Lanteri S., 2004. Amplified fragment length polymorphism for variety identification and genetic diversity assessment in oleander *Nerium oleander* L. *Euphytica* 136: 125-137.
- Prestianni Giallombardo A. M., 2002. L'oracolo di Dodona e le navigazioni adriatiche nei secoli VI-IV aC. *Hesperia*, 15(15): 123-136.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Pritchard J.K., Wen W., Falush D., 2003. Documentation for STRUCTURE software: version 2.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., Goldstein D.B., Powell W., 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*, 153: 943-947.
- Rallo P., Dorado G., Martin A., 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101: 984-989.
- Rapposelli E., Melito S., Barmina G.G., Foddai M., Azara E., Scarpa G.M., 2015. AFLP finger printing and essential oil profiling of cultivated and wild populations of Sardinian *Salvia desoleana*.

- Ratnaparkhe M.B., Tekeoglu M., Muehlbauer F.J., 1998. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.*, 97(4): 515-519.
- Riehl G., 1962. The nutrition of cutting. *Hort. Abs.*, 3: 53-59.
- Rivas-Martinez S., Loidi J., 1999. Bioclimatology of the Iberian Peninsula. *Itinera Geobotanica*, 13: 41-47.
- Rocchi M., 2002. Apollon il Maleatas del Monte Kynortion. *Minos*, 37, 419.
- Ruffoni B., Gazzano A., Costantino C., 1994. Micropropagazione di *Myrtus communis* Mill.: Effetto dell'acido indolacetico sulla radicazione. *Italus Hortus*, 1(1): 8-12.
- Schlötterer C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6): 365-371.
- Scortichini M., 1986. Il mirto. *Rivista di Frutticoltura*, 48 (12): 47-53.
- Sepici-Dincel A., Açıkgözb Ş., Çevika C., Sengelenc M., Yeşiladad E., 2007. Effects of in vivo antioxidant enzyme activities of myrtle oil in normoglycaemic and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharm.*, 110(3): 498-503.
- Sexton J.P., Hangartner S.B., Hoffmann A.A., 2013. Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common?. *Evolution*, 68, 1–15.
- Sias V., 2006. Variabilità genetica molecolare (SSR) in una collezione di carciofo selvatico (*Cynara cardunculus* var. *sylvestris*). Tesi di Laurea.
- Soliani L., 2001. Fondamenti di statistica applicata all'analisi e alla gestione dell'ambiente. Dispense Corso di Formazione CISBA.
- Southern E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98(3): 503-517.
- Tanksley S.D., 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 1(1): 3-8.
- Tomkins J.P., Wood T.C., Barnes L.S., Westman A., Wing R.A., 2001. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis* spp.) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 489–496.
- Trabaud L., 2000. Life and environment in the Mediterranean. Wit Press.
- Traveset A., Riera N., Mas R.E., 2001. Ecology of fruit-colour polymorphism in *Myrtus communis* and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. *J. Ecol.*, 89(5): 749-760.

- Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H., 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsugamenziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.*, 92(1): 40-45.
- Turpeinen T., Tenhola T., Manninen O., Nevo E., Nissilä E., 2001. Microsatellite diversity associated with ecological factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel. *Mol. Ecol.*, 10(6): 1577-1591.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23(21): 4407-4414.
- Wang G., Mahalingam R., Knap H.P., 1998. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L) Merr. *Theor. Appl. Genet.*, 96(8): 1086-1096.
- Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18(24): 7213-7218.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535.
- Winter P., Kahl G., 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World J. Microb. Biot.*, 11(4): 438-448.
- Wisniewska H., Marcinkowsky J., 1976. Evaluation of the suitability of bark compost and fresh bark for rooting cuttings of ornamental plants. *Hort. Abs.*, 11, 9512.
- Wright S. (1951). The genetical structure of population. *Ann. Eugenics*, 15: 323-354.
- Wu L.G., Saggau P., 1994. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *The J. Neurosci.*, 14(9): 5613-5622.
- Yadegarinia D., Gachkar L., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12): 1249-1255.
- Yan X.B., Guo Y.X., Zhao C., Liu F.Y., Lu. B.R., 2009. Intra-population genetic diversity of two wheatgrass species along altitude gradients on the Qinghai-Tibetan plateau: Its implications for conservation and utilization. *Conserv. Genet.* 10:359–367. *Hort.*

- Yang J., Cushman S.A., Song X., Yang J., Zhang P., 2015. Genetic diversity and drivers of genetic differentiation of *Reaumuria soongorica* of the Inner Mongolia plateau in China. *Plant. Ecol.*, 216: 925-937.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2): 176-183.
- Zomorodian K., Moein M., Lori Z.G., Ghasemi Y., Rahimi M.J., Bandegani A., Pakshir K., Bazargani A., Mirzamohammadi S., Abbasi N., 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from *Myrtus communis* Leaves. *J. Essent. Oil Bear. Plant.*, 16: 76-84.
- Zucchi M.I., Brondani R.P.V., Pinheiro J.B., Brondani C., Vencovsky R., 2002. Trasferibility of micro satellite markers from *Eucaliptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Mol. Ecol. Notes* 2: 512-513.