



RISOLUZIONE OIV-VITI 564B-2019

PROCEDIMENTO DELL'OIV PER IL RECUPERO E LA CONSERVAZIONE DELLA DIVERSITÀ INTRAVARIETALE E LA SELEZIONE POLICLONALE DELLA VITE IN VITIGNI CON AMPIA VARIABILITÀ GENETICA

L'ASSEMBLEA GENERALE,

SU PROPOSTA della Commissione I "Viticoltura",

VISTO l'articolo 2, paragrafo 2 b) i e c) iii dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino e in base al punto 1.c.iii del Piano Strategico 2005-2019 dell'OIV, che prevede di "valorizzare le conoscenze sulla genomica funzionale della vite e dei microrganismi",

CONSIDERATI i lavori presentati nel corso delle riunioni dei gruppi di esperti, in particolare del Gruppo di esperti "Risorse genetiche e selezione della vite" e del Gruppo di esperti "Protezione della vite" e dando seguito alla proposta avanzata da tali gruppi di esperti,

CONSIDERATE le risoluzioni OIV-VITI 6-1990, riguardante l'ottenimento, la riproduzione, la conservazione e la propagazione dei cloni, OIV-VITI 1-1991 riguardante il protocollo standard dell'OIV per la selezione clonale della vite e OIV-VITI 564A-2017 riguardante il procedimento dell'OIV per la selezione clonale,

DECIDE di adottare la definizione di "selezione policlonale" e un procedimento dell'OIV per il recupero e la conservazione della diversità intravarietale e la selezione policlonale della vite in vitigni con ampia variabilità genetica:

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



Indice

A. INTRODUZIONE	3
B. DEFINIZIONE DI SELEZIONE POLICLONALE	3
C. METODOLOGIA.....	3
1. Quadro generale	3
2. Primo ciclo: prospezione/campionamento delle piante madri in vigneti più datati di varietà di antica coltivazione.....	3
3. Secondo ciclo: ampio studio sul campo con i genotipi ottenuti per la selezione policlonale e la conservazione della diversità	6
4. Omologazione	10
5. Altri risultati secondari e raccomandazioni.....	10
6. Sintesi del procedimento	11
ALLEGATO I. GLOSSARIO	12
ALLEGATO II. SELEZIONE GENETICA E FITOSANITARIA DELLA VITE: STATO E RASSEGNA BIBLIOGRAFICA.....	14
1. Basi teoriche della genetica quantitativa per la selezione genetica	14
2. Evoluzione storica delle metodologie di selezione applicate alle colture agricole e alle varietà di vite.....	16
3. Situazione attuale e rischi correlati alle risorse genetiche di Vitis vinifera.....	18
BIBLIOGRAFIA E CITAZIONI.....	20



A. INTRODUZIONE

La metodologia che viene sviluppata è stata concepita per essere applicata alle varietà di viti (*V. vinifera* L.) di antica coltivazione che conservano un'elevata variabilità intravarietale.

Il procedimento si basa sulla genetica quantitativa e sulla statistica, nonché sulle idee pionieristiche proposte per la prima volta da Rives (1) per la selezione della vite, che sono state sviluppate, testate e valutate ampiamente in Portogallo a partire dagli anni Settanta del XX secolo (2). Inoltre, in altri paesi esistono protocolli per la selezione clonale richiamati e descritti nella risoluzione dell'OIV-VITI 564A-2017, riguardante la definizione di selezione clonale e i procedimenti per il suo ottenimento.

B. DEFINIZIONE DI SELEZIONE POLICLONALE

Selezione policlonale

Selezione di un insieme di genotipi eseguita secondo la metodologia seguente.

C. METODOLOGIA

1 Quadro generale

La metodologia comprende due cicli:

- 1) il primo ciclo si incentra sulla prospezione e l'individuazione nell'ambito di una determinata varietà del materiale genetico di partenza (variabilità intravarietale) per la selezione;
- 2) il secondo ciclo si incentra sullo studio dei genotipi campionati e sul processo di selezione policlonale che infine consentirà l'impianto di nuovi vigneti con guadagni genetici stabili e/o la fornitura di piante e dati per la selezione clonale.

2 Primo ciclo: prospezione/campionamento delle piante madri in vigneti più datati di varietà di antica coltivazione

Ai fini del raggiungimento della massima variabilità possibile, il campionamento "quasi casuale" di piante che ad un esame visivo appaiono esenti da virus e altre malattie è preferibile rispetto alla selezione basata sui valori fenotipici di caratteri specifici, questo perché gli effetti ambientali rispetto alle singole piante sono molto elevati. La propagazione delle piante così campionate deve avvenire dopo aver condotto dei test per verificare l'assenza dei principali virus di larga diffusione; solo allora sarà possibile piantarle in campo per il secondo ciclo.

2.1 Identificazione della/e regione/i da campionare

La prospezione e il campionamento del materiale di partenza devono essere eseguiti in una o più regioni viticole in cui la varietà che si vuole esaminare è tradizionalmente coltivata (consultare fonti storiche, letterarie e amministrative sulla distribuzione spaziale della varietà

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



di antica coltivazione), in quanto è più probabile che queste regioni contengano un'elevata diversità genetica della varietà di studio. Limitare la selezione ad un'unica regione riduce la quantità di diversità sottoposta a selezione e, di conseguenza, i potenziali guadagni genetici ottenibili. L'esatta identificazione delle regioni permetterà in seguito di rapportare i risultati a tali regioni, permettendo di individuare il centro di origine di tale varietà (il luogo più probabile della sua domesticazione) e la sua evoluzione geografica.

2.2 Numero di vigneti e piante da considerare

L'obiettivo è salvaguardare la variabilità intravarietale presente in ciascuna regione individuando un congruo numero di piante. Sulla base di esperimenti sul campo e simulazioni al computer (3), questo numero oscilla tra 50 e 70 piante per regione. Quando la varietà sia presente in una sola regione vinicola, il numero può superare ampiamente 70. Teoricamente, il miglior risultato si ottiene campionando poche piante su ciascuno dei vigneti monitorati. In linea di massima, si devono campionare da 2 a 3 piante in 20-30 vigneti diversi per ciascuna regione, preferibilmente appartenenti a proprietari diversi (i dati si riferiscono a piante esenti dai virus che normalmente si manifestano con una frequenza elevata).

2.3 Criteri per scegliere i vigneti e le piante nel vigneto

Le piante dei vigneti scelti per la prospezione non devono essere state innestate con materiali provenienti da processi di selezione condotti in precedenza (ossia, materiale commerciale oggetto di precedenti lavori di selezione massale e clonale), ovvero queste devono essere state piantate prima dell'inizio di programmi di selezione e di distribuzione delle barbatelle innestate o delle talee di portinnesto per l'innesto da parte dei vivaisti.

La distribuzione geografica dei vigneti da campionare deve corrispondere all'incirca alla frequenza di distribuzione di vigneti che presentano tale varietà nella regione interessata. È preferibile eseguire il campionamento in vigneti piantati con materiali che non possano essere in relazione tra di loro (ad esempio, che non appartengono allo stesso proprietario al momento dell'impianto).

In ogni vigneto, le piante da considerare devono essere separate l'una dall'altra da una distanza corrispondente ad almeno 5 filari e, nello stesso filare, da una distanza superiore a 20 metri.

Poiché l'obiettivo principale in questa fase è raccogliere un campione rappresentativo della variabilità intravarietale della varietà di antica coltivazione e con ampia variabilità genetica, occorre evitare di scegliere piante in funzione di caratteri specifici. Tuttavia, è consigliato escludere quelle piante decisamente indesiderabili (piante con sintomi di virosi o malattie del legno, che presentano anomalie fenotipiche, malformazioni, ecc.) e/o che non corrispondono morfologicamente alla varietà in selezione.

Per l'ubicazione delle piante scelte e dei rispettivi vigneti di origine e per consentire la successiva verifica della rappresentatività del campionamento e la tracciabilità del genotipo finale selezionato (con conseguente possibilità di risalire alla pianta madre originale o alla sua



ubicazione), è necessario creare e mantenere un sistema di riferimento semplice e il più possibile comprensibile a livello universale.

2.4 Diagnosi virologica mediante ELISA

In questa fase si conduce il test ELISA per i virus fondamentali, osservando quanto stabilito nel quadro giuridico per la certificazione delle piante di vite vigente in ciascun paese. Tuttavia, in questa fase è possibile ovviare la conduzione di test per i virus caratterizzati da una bassa frequenza di insorgenza nella regione in esame, che potranno essere condotti nella fase successiva.

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



3 Secondo ciclo: ampio studio sul campo con i genotipi ottenuti per la selezione policlonale e la conservazione della diversità

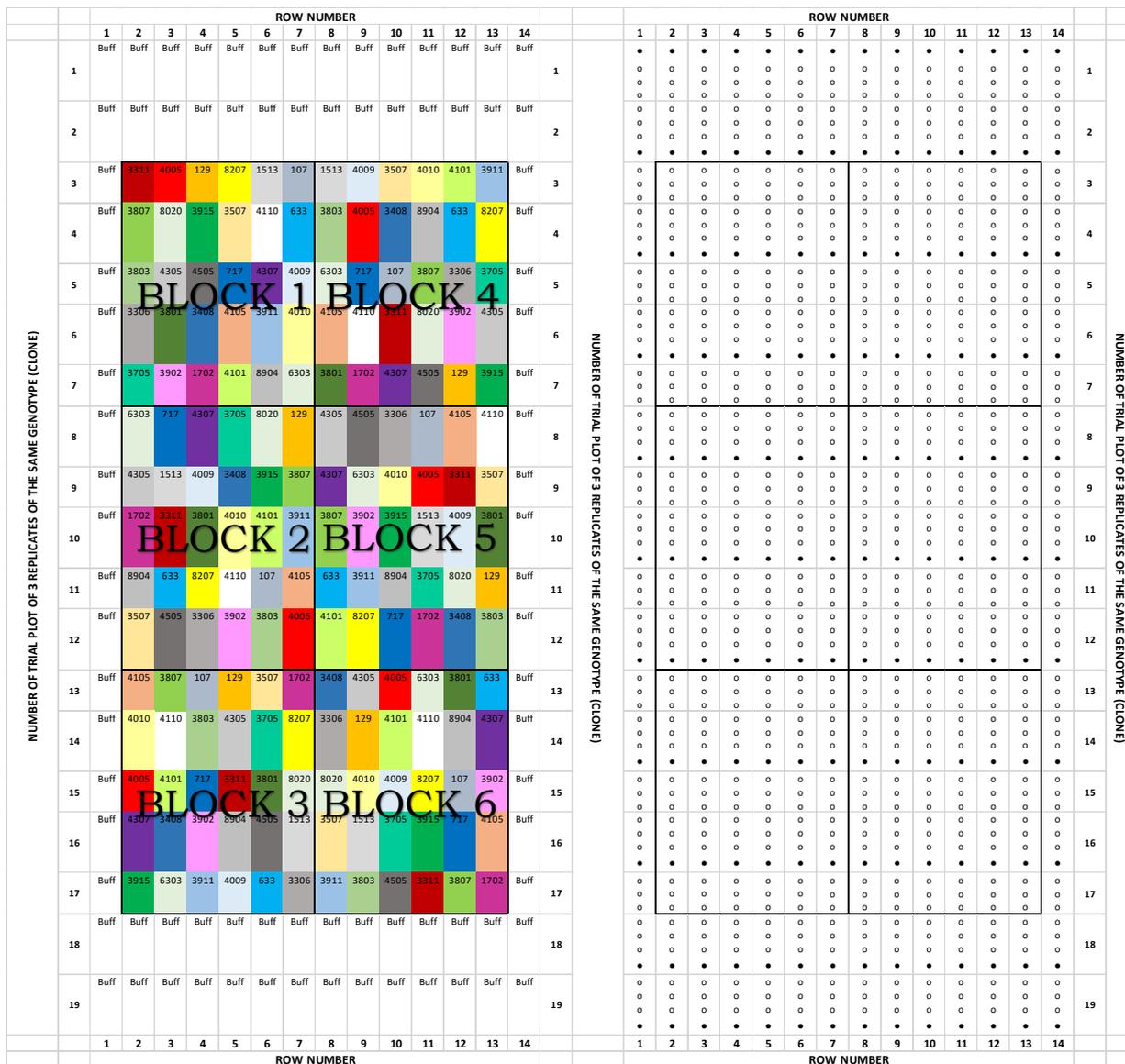


Figura 1 - Schema esemplificativo per un disegno a blocchi completamente randomizzati di uno studio sperimentale condotto sul campo con 30 genotipi da mettere a confronto, per una varietà caratterizzata da scarsa variabilità intravarietale. A sinistra sono presenti i dettagli della randomizzazione dei 30 genotipi ripetuti in ciascuno dei 6 blocchi. Ogni cella rappresenta 3 piante, mentre numeri e colori rappresentano i genotipi in selezione. Le piante che fungono da cuscinetto (buffer) che circondano la zona in cui viene condotta la sperimentazione riducono le eterogeneità sul confine (borderline). Nella figura di destra vengono indicate le piante effettive (o) e i tutori del filare (•) all'interno delle parcelle (linee meno marcate) e dei blocchi (linee più marcate). In questo piano sperimentale di piccole dimensioni, ci sono 18 piante per ciascun genotipo, organizzate in parcelle da 3 piante replicate 6 volte, una per ciascun blocco. Tuttavia, per chiarezza, il disegno è applicabile a un numero maggiore di genotipi, come si raccomanda nel caso di varietà di antica coltivazione con centinaia di piante.

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



Questo ciclo consiste nel condurre un'ampia prova di campo che contenga un campione della variabilità all'interno della varietà in studio. In tale prova di campo è possibile applicare gli strumenti metodologici della genetica quantitativa in condizioni ottimali. Il vigneto sperimentale unisce le due condizioni essenziali per una selezione genetica efficace: (a) raccoglie tutto il materiale di partenza individuato (diversità); (b) è progettato in modo da essere valido per l'utilizzo di modelli che consentano valutazioni fenotipiche dei caratteri. Inoltre, consente delle analisi volte alla valutazione della distanza tra i valori ottenuti e i valori genetici reali.

3.1 Scelta del disegno sperimentale

La scelta del disegno sperimentale è essenziale per poter controllare la variabilità dovuta a fattori ambientali su un unico insieme di piante costituito da centinaia di genotipi. Le soluzioni possono variare dai blocchi completamente randomizzati (CRB, 5-6 blocchi x 3 piante, cfr. figura 1) all'uso di soluzioni più efficienti: disegni alfa, disegni riga x colonna e altri, a seconda delle risorse metodologiche e computazionali disponibili in ogni contesto. Per delimitare le unità sperimentali in modo più sicuro, queste dovrebbero corrispondere alla metà delle piante contenute tra i pali di un filare (di solito 3 piante).

3.2 Allestimento del vigneto sperimentale

In generale, l'insieme di genotipi in studio viene gestito secondo tecniche agronomiche standard della regione interessata (densità d'impianto, forma di allevamento, sistema di potatura, ecc.), in modo da garantire che le operazioni agronomiche siano applicate in modo rigorosamente omogeneo. Tuttavia, un ampio numero di genotipi e di repliche richiede che venga eseguito un controllo particolarmente rigoroso durante l'impianto. Questo controllo risulta più efficiente ricorrendo all'innesto sul campo (piantando il portinnesto e innestando i genotipi l'anno successivo). Qualora si utilizzino barbatelle innestate, queste dovrebbero preferibilmente essere fatte radicare in vasi provvisti di etichetta per ridurre al minimo l'errore. I portinnesti devono essere scelti in base alle caratteristiche del suolo che li ospiterà; durante lo studio e per tutte le piante si deve utilizzare lo stesso portinnesto.

3.3 Raccolta dei dati

In linea di principio, nello studio di campo le piante dovrebbero essere sottoposte a una valutazione di tutti i caratteri di interesse ai fini della selezione. Tuttavia, il numero di analisi di molte centinaia di parcelle (numero di genotipi moltiplicato per il numero di repliche) è spesso limitato dalla fattibilità della valutazione con le risorse disponibili. In pratica, la resa, la fertilità, la dimensione degli acini e dei grappoli nonché l'acidità, il pH e la concentrazione di solidi solubili totali, i fenoli totali e gli antociani nel mosto sono i caratteri più rilevanti. I componenti qualitativi del mosto vengono valutati su campioni di almeno 60 acini per replica, prelevati da tutte le repliche (per questioni di fattibilità e per ottimizzare i tempi quando le risorse sono scarse, in alternativa è possibile utilizzare solo le 3 repliche più omogenee). Tuttavia, dati i recenti progressi nell'analisi automatica (come la spettrometria FT-IR) e la possibilità di installare sensori nel vigneto, sussistono prospettive realistiche di poter analizzare più caratteri.



La resa viene valutata mediante pesatura diretta delle uve (per parcella) in campo. Di solito, la raccolta dei dati può aver inizio dopo 2 o preferibilmente 3 anni dalla messa a dimora delle barbatelle innestate o dall'innesto in campo e può durare almeno 3 anni. I risultati della prima analisi dei dati ottenuti in questi 3 anni (o più, se disponibili) forniscono indicazioni in merito all'eventuale necessità di condurre ulteriori valutazioni. È possibile raccogliere dati supplementari (ampelografici, fenologici, ecc.) in funzione degli specifici obiettivi di selezione e delle risorse disponibili.

Facoltativamente, prima della selezione finale di un insieme di genotipi (per l'uso immediato) da varietà destinate alla produzione di vino, sarebbe utile condurre dei processi di microvinificazione su tale gruppo nonché su un campione rappresentativo dell'intero insieme nel vigneto sperimentale, utilizzando circa 20-30 genotipi scelti a caso e seguendo un protocollo standardizzato. Utilizzando un duo-trio test, entrambi i vini ottenuti devono essere assaggiati alla cieca da parte di esperti, per valutare se il vino prodotto dal gruppo selezionato presenti le caratteristiche sensoriali tipiche della varietà in studio. In caso di differenze significative da un punto di vista statistico, deve essere successivamente condotta una caratterizzazione mediante analisi sensoriale descrittiva; questo per stabilire le differenze sensoriali tra il gruppo selezionato e l'intero insieme oggetto dello studio in modo obiettivo.

3.4 Analisi dei dati e selezione policlonale

Per l'analisi dei dati vengono applicati dei modelli misti. L'obiettivo finale è stimare i componenti della varianza, trovare i migliori predittori empirici lineari e corretti (EBLUP) degli effetti genotipici nonché calcolare il guadagno genetico (R).

Per i modelli e i dati bilanciati con strutture della covarianza più semplici, la selezione può basarsi sulla classificazione dei valori medi fenotipici dei genotipi (dal momento che in questi casi, la classificazione dei valori medi fenotipici è uguale alla classificazione degli EBLUP degli effetti genotipici). In queste condizioni, si applicano i classici strumenti di genetica quantitativa. Vale a dire che "selezionare" implica ordinare i genotipi dell'insieme in studio in base ai loro valori fenotipici, scegliere un sottoinsieme dei più interessanti per un dato carattere e calcolarne la differenza rispetto alla media generale (differenziale di selezione, S), nonché di eseguire una quantificazione della distanza tra i valori fenotipici (osservati) e i valori genotipici (l'ereditabilità in senso lato, h^2) per calcolare il guadagno (R) in base alla formula seguente:

$$R = S \times h^2$$

Per i dati più sbilanciati e per i modelli più complessi, la selezione dei genotipi dovrebbe essere basata sulla classificazione EBLUP degli effetti genotipici e sulla predizione del guadagno genetico, calcolata come media dei valori EBLUP dei cloni selezionati.

La selezione può essere condotta a favore di uno o più dei caratteri valutati, considerati singolarmente o sotto forma di indice di selezione.

Il numero di genotipi selezionati e che andranno a costituire il materiale policlonale è il risultato di un compromesso tra il guadagno desiderato (che aumenta al diminuire del numero



di genotipi selezionati) e la stabilità del comportamento dell'insieme di genotipi selezionati in ambienti diversi, ovvero una bassa interazione G×E (interazione genotipo-ambiente). Questa stabilità aumenta con il numero di genotipi selezionati. I risultati sperimentali disponibili in letteratura (3) dimostrano che la stabilità del gruppo aumenta nettamente da 1 a 7 genotipi e che, oltre 7, essa tende ad aumentare in modo più moderato. Sulla base di questi risultati, si evince che il materiale policlonale ottenuto deve essere costituito da un insieme equilibrato e misto di 7-20 genotipi, a seconda delle condizioni specifiche di ciascun lavoro di selezione. Tuttavia, anche se tale numero può superare i 20, esso non deve mai essere inferiore a 7. L'equilibrio di questo insieme misto implica che ogni genotipo sia rappresentato nel gruppo con una frequenza di $1/n$, con n pari al numero totale di genotipi presenti nell'insieme misto. Per ragioni di fattibilità, quali la dipendenza dal materiale disponibile per ciascun genotipo e da altri fattori congiunturali, è necessario che per tali limiti venga riconosciuta una certa tolleranza. In ogni caso, la frequenza di ogni singolo genotipo non deve mai superare il doppio di quella del genotipo meno frequente.

3.5 Seconda diagnosi virologica dei genotipi che formano il gruppo policlonale

I requisiti fitosanitari per tale selezione devono essere conformi al quadro normativo del paese in cui viene effettuata la selezione o del luogo in cui essa sarà utilizzata per gli impianti, a seconda di quale sia il più rigoroso.

3.6 Diagnosi molecolare dei genotipi nel gruppo policlonale

La selezione dei genotipi deve essere preceduta da un'analisi molecolare volta a confermare la loro identità varietale che deve essere effettuata utilizzando i migliori metodi disponibili.

3.7 Mantenimento delle piante capostipiti del gruppo policlonale

Ciascun genotipo selezionato e sottoposto a diagnosi fitosanitaria e varietale viene moltiplicato su scala ridotta, per generare piante capostipiti.

Le piante devono essere conservate in condizioni volte a garantire la massima sicurezza sanitaria, la capacità di sostituzione in caso di infezioni, nonché il massimo adeguamento della loro efficacia alle richieste del mercato. Un possibile modello per poter conservare le piante in questo modo è coltivare le piante capostipiti su un substrato inerte fertilizzato in vaso, all'interno di una serra e proteggendole dai vettori virali.

3.8 Conservazione della biodiversità

Oltre alla selezione policlonale, sia il vigneto di valutazione, sia i dati da esso acquisiti possono essere utilizzati per la conservazione della variabilità intravarietale, contrastando l'attuale erosione genetica. La conservazione deve essere garantita dal vigneto in studio durante la sua vita utile e, alla fine di questo periodo, deve essere perseguita con altre modalità.



4. Omologazione

Se si prevede l'omologazione del materiale policlonale, questa deve essere conforme al quadro normativo in vigore nel paese in cui viene effettuata la selezione. È auspicabile che le norme sull'omologazione dei genotipi selezionati siano armonizzate tra i vari Stati che scelgono questa opzione.

5. Altri risultati secondari e raccomandazioni

Oltre alla selezione policlonale, sia il vigneto dello studio sul campo descritto in precedenza sia i dati acquisiti da esso possono essere utilizzati per altri scopi complementari.

I dati sperimentali dovrebbero essere conservati adottando misure di sicurezza elevate come la ridondanza dei supporti informatici e dei database. Questi dati consentiranno nuove selezioni *in situ* in risposta alle nuove sfide poste all'industria vitivinicola, che è sempre in costante evoluzione.

Inoltre, è possibile analizzare la resa e altri dati per quantificare la variabilità intravarietale del vitigno; questa analisi può essere condotta tracciando curve normali di densità di probabilità di questi caratteri o calcolando i relativi coefficienti di variazione genotipica. Essendo una condizione indispensabile per la conduzione di studi oggettivi sulla variabilità intravarietale, questa conoscenza può permettere di comprendere l'origine e la diffusione geografica di un vitigno.

È anche possibile considerare il processo di selezione policlonale (cfr. punto 3) come la prima fase di una selezione clonale. In tal caso, i genotipi selezionati dovrebbero essere più numerosi per poi essere sottoposti, ai fini della selezione dei singoli cloni, a un secondo ciclo di studi di adattamento regionale.



6. Sintesi del procedimento

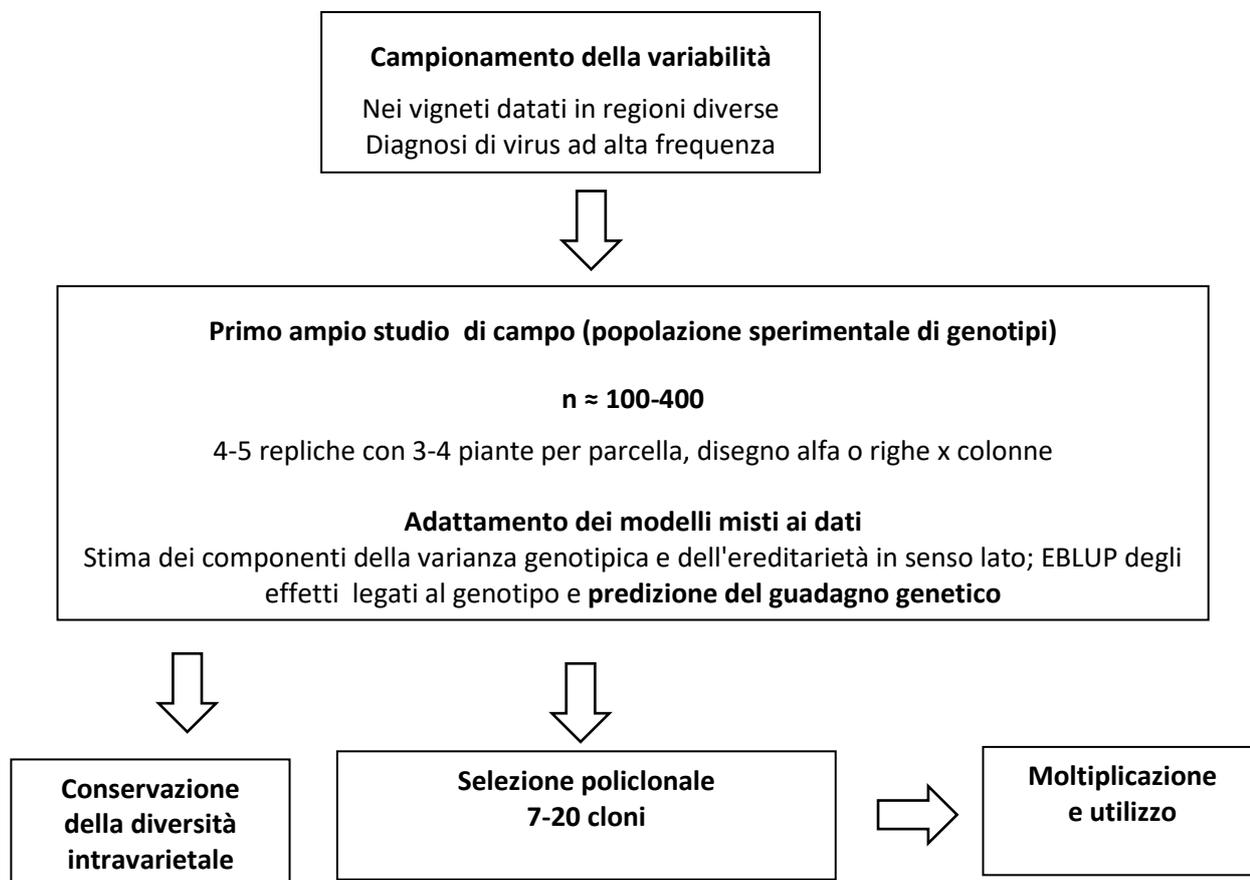


Figura 2 - Schema per la selezione policlonale e la conservazione della diversità della vite



ALLEGATO I. GLOSSARIO

La terminologia e l'utilizzo del presente glossario si dovrebbero applicare esclusivamente alla presente risoluzione, al fine di garantire che il contesto della definizione sia valida per il testo della risoluzione.

Ereditabilità in senso lato (h^2)

Varianza genotipica di un carattere quantitativo (riferito all'insieme di genotipi di una varietà di antica coltivazione in una specifica prova di campo) diviso la varianza fenotipica totale. La varianza genotipica non può essere ottenuta direttamente, ma può essere ottenuta sottraendo la varianza ambientale dalla varianza totale osservata nella prova.

Certificazione

Sistema di controllo della moltiplicazione e della distribuzione del materiale vegetale di propagazione per verificarne la conformità ai requisiti normativi in materia. In generale, questo sistema dà luogo a varie categorie di materiali, in funzione dello stato sanitario e di altre condizioni. Nell'ambito dell'Unione europea, l'esistenza della categoria "materiale certificato" non esclude che anche altre categorie ("iniziale", "di base", "standard") siano considerate certificate.

Clone

Consultare la definizione nella risoluzione OIV-VITI 564A-2017 (4).

EBLUP (migliori predittori empirici lineari e corretti dei valori genotipici)

Per poter acquisire maggiori informazioni sul valore genotipico, questo predittore è più accurato del valore fenotipico, perché consente una rimozione più efficace della variazione ambientale. Così, se espresso come deviazione dalla media totale, è anche un quantificatore diretto del guadagno genetico.

Deviazione ambientale (variabile "E" nell'equazione fondamentale del valore fenotipico: $P = G + E$)

La parte di valore fenotipico determinata dall'ambiente, assunta come distribuzione con media pari a zero e varianza diversa da zero (5), (6), (7), e (8). La deviazione ambientale non è determinabile direttamente, ma in un insieme sperimentale di genotipi la sua varianza può essere determinata sperimentalmente.

Piante capostipiti

Piccolo numero di piante rappresentativo della selezione proposta per l'omologazione ufficiale. Queste piante vengono gestite secondo condizioni rigorose che favoriscono la stabilità genetica e la protezione sanitaria.

Guadagno genetico prevedibile (variabile "R" nell'equazione: $R = S \times h^2$)

Per un dato carattere, la differenza tra il suo valore nei discendenti vegetativi di uno o più genotipi selezionati in un insieme sperimentale di cloni e il valore medio nei discendenti vegetativi di tutti i cloni in tale insieme. Può

essere ottenuto calcolando il prodotto del differenziale di selezione (S) per l'ereditabilità in senso lato (h^2) oppure come somma della media degli EBLUP degli effetti genotipici dei cloni selezionati (1) e (9).

Selezione genetica

Selezione di un sottogruppo di cloni all'interno di una varietà eterogenea di antica coltivazione relativamente ai caratteri quantitativi, basata sui predittori dei valori genotipici (valori fenotipici, EBLUP o altri) per uno o più caratteri, che porta a guadagni genetici oggettivi per tali caratteri.

Genotipo

La composizione genetica di un organismo o gruppo di organismi con riferimento a un singolo carattere, a un insieme di caratteri o a un intero complesso di caratteri.

Interazione genotipo-ambiente ($G \times E$)

Un'interazione tra genotipo e ambiente può essere definita come un cambiamento nella prestazione relativa di un "carattere" di due o più genotipi misurata in due o più ambienti. Le interazioni possono quindi comportare cambiamenti nell'ordine del rango per i genotipi tra ambienti e cambiamenti nell'ordine della grandezza assoluta e relativa delle varianze genetiche, ambientali e fenotipiche tra ambienti (10)

Valore genotipico (variabile "G" nell'equazione fondamentale del valore fenotipico: $P = G + E$)

La parte geneticamente determinata del valore fenotipico che viene trasmessa tramite propagazione vegetativa. Il valore genotipico non può essere determinato direttamente, ma lo si può conoscere in maniera approssimativa tramite vari predittori basati sui rapporti della varianza.

La varianza dei valori genotipici in una prova sul campo equivale alla differenza tra le varianze fenotipiche e quelle ambientali nell'ambito della stessa prova.

Diversità intravarietale

Differenze nei caratteri quantitativi delle piante appartenenti a una varietà di antica coltivazione inizialmente omogenea, diventata eterogenea a causa dell'accumulo di mutazioni vegetative clonali e altri meccanismi di variazione associati alla moltiplicazione vegetativa. La diversità è la materia prima per la selezione genetica e per altri utilizzi delle varietà di antica coltivazione.

Modelli misti

Modelli a effetti fissi e casuali.

Valore fenotipico di un carattere (variabile "P" nell'equazione fondamentale del valore fenotipico: $P = G + E$)

Il valore di un carattere in una pianta (o in un clone) all'interno di un insieme sperimentale, valutato mediante osservazione diretta o con qualsiasi altro metodo. Secondo il modello classico, il valore fenotipico è rappresentato dalla somma del valore determinato geneticamente (valore

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019

Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



genotipico, G) e una deviazione ambientale data (E) con media pari a zero e varianza diversa da zero: $P = G + E$. I valori fenotipici possono essere determinati sperimentalmente, quindi la varianza di questi valori in un insieme sperimentale può essere ottenuta mediante un semplice calcolo diretto utilizzando i valori osservati.

Selezione policlonale

Nel contesto della presente risoluzione, per "selezione policlonale" s'intende la selezione di un gruppo di 7-20 genotipi da un insieme sperimentale di genotipi di una varietà di antica coltivazione, contenente la maggior parte della sua variabilità intravarietale .. Al fine di poter consentire una riduzione efficiente delle deviazioni ambientali e ottenere guadagni genetici elevati, stabili e prevedibili, la selezione si basa su strumenti adoperati in genetica quantitativa. In circostanze eccezionali e per evitare interferenze dovute all'interazione G×E, il numero di genotipi selezionati può essere superiore a 20, ma mai inferiore a 7. Nella selezione finale destinata alla moltiplicazione per la piantagione di vigneti commerciali, tutti i genotipi devono essere in quantità uguale. Tuttavia, è ammessa una certa tolleranza, a condizione che nessun genotipo superi, in termini di frequenza, un effettivo pari al doppio dell'effettivo del genotipo meno frequente. I caratteri oggetto della valutazione e della selezione dovrebbero essere rappresentati come minimo da: resa, solidi solubili e acidità del mosto nel caso delle varietà bianche e, nel caso delle varietà rosse, anche gli antociani della buccia.

In questo contesto, una miscela di genotipi risultanti da vari processi di selezione indipendenti non corrisponde alla suddetta definizione di "selezione policlonale" e, per evitare confusioni, dovrebbe essere designata come miscela multiclona.

Carattere qualitativo

Un carattere che, in un insieme eterogeneo di piante o, presenta una distribuzione discreta che deriva da un determinismo monogenico o oligogenico e deviazioni ambientali moderate.

Genetica quantitativa

Principi di genetica che consentono la comprensione e l'analisi dei caratteri quantitativi. Le distribuzioni dei caratteri quantitativi sono rappresentate dalla somma delle distribuzioni genetiche e delle distribuzioni delle deviazioni ambientali. Quindi, comprendere le prime implica la riduzione delle deviazioni casuali e la scomposizione della varianza e dei relativi processi. In sintesi, la genetica quantitativa rappresenta la statistica applicata alla genetica dei caratteri quantitativi.

Carattere quantitativo

Un carattere che, in un insieme di piante eterogeneo, presenta una distribuzione continua e normale. La normalità deriva dal determinismo poligenico e/o da elevate deviazioni ambientali.

Selezione sanitaria

Diagnosi di agenti patogeni sistemici, intra o intercellulari, trasmessi tramite propagazione vegetativa (e altri meccanismi). In pratica, si applica principalmente ai virus.

Differenziale di selezione (variabile "S" nell'equazione del guadagno genetico: $R = S \times h^2$)

Differenza tra i valori medi dei genotipi selezionati in un insieme sperimentale di una varietà di antica coltivazione e la media complessiva dei genotipi di tale insieme.

Varietà antiche (in senso botanico) e varietà coltivata o cultivar

Da un punto di vista botanico, una varietà è definita come un insieme di piante che derivano dall'evoluzione naturale e che hanno caratteri simili che possono essere riprodotti come "conformi al tipo" di generazione in generazione. Secondo il *Codice internazionale per la nomenclatura delle piante coltivate* (CINPC), la varietà coltivata (o cultivar) è un insieme di piante che (a) è stato selezionato in funzione di un carattere o un insieme di caratteri, (b) è distinto, uniforme e stabile per quanto riguarda tali caratteri e (c) quando propagato in modo adeguato mantiene tali caratteri. Sulla base di queste definizioni, le varietà di antica coltivazione come il Pinot Noir o il Tempranillo non sono varietà botaniche, perché la loro origine ed evoluzione deriva principalmente dall'attività umana. Ma non sono nemmeno esattamente cultivar, perché non sono state sottoposte a selezione per caratteri concreti da nessun selezionatore noto e sono ben lungi dall'essere uniformi **per quanto riguarda i caratteri culturali ed enologici importanti**. Ciò che corrisponde alla definizione del CINPC di cultivar sono le parti della varietà più datata, scelte da selezionatori diversi, che possono essere nettamente distinte l'una dall'altra e sono uniformi e stabili. Nell'ambito della presente risoluzione, e fino a quando non sarà stata concordata una definizione migliore, per indicare tali parti viene utilizzato il termine "varietà di antica coltivazione".



ALLEGATO II. SELEZIONE GENETICA E FITOSANITARIA DELLA VITE: STATO E RASSEGNA BIBLIOGRAFICA

1. Basi teoriche della genetica quantitativa per la selezione genetica

All'inizio della domesticazione della vite, nello spazio geografico prevalentemente dell'Eurasia mediterranea, le singole varietà di vite avrebbe avuto origine come popolazione naturalmente omogenea. Tuttavia, la successiva moltiplicazione vegetativa di tale popolazione varietale ha dato luogo a numerosi processi di mitosi e altrettanto numerosi processi di replicazione del DNA, responsabili, quest'ultimi, di mutazioni genetiche e altri meccanismi di variazione genetica. Queste mutazioni sono spesso osservabili come variazioni nel colore dell'acino, nella forma delle foglie e altri caratteri qualitativi mutati.

Quasi tutti i caratteri della vite, compresi quelli importanti dal punto di vista economico, sono caratteri quantitativi (resa, zucchero, acidità e antociani degli acini e molti altri), e diventano così gli obiettivi naturali della selezione genetica. I caratteri quantitativi sono controllati da gruppi di geni che determinano piccoli effetti cumulativi (microgeni o poligeni) e che sono anch'essi soggetti a mutazioni.

L'estensione della variazione intravarietale di un carattere derivante dall'accumulo secolare o millenario di mutazioni può raggiungere livelli estremamente elevati: il grado di variazione della resa tra genotipi di una varietà storicamente diffusa in un determinato territorio può essere pari a un rapporto di 1 a 10, mentre quello del contenuto zuccherino, dell'acidità e degli antociani degli acini può essere pari a un rapporto di 1 a 2. Questa diversità rappresenta l'elemento fondamentale per la selezione e apre la strada al raggiungimento di guadagni genetici elevati che portano a benefici economici rilevanti. Essa offre la possibilità di modificare naturalmente le varietà di antica coltivazione per adattare a nuove situazioni di stress biotici e abiotici, ivi compreso il cambiamento climatico. Per sfruttare questo potenziale, la selezione dovrebbe essere effettuata su campioni di genotipi sufficientemente grandi da rappresentare, per quanto possibile, la diversità naturale della varietà di antica coltivazione. Dalle stime ricavate da studi sperimentali e simulazioni al computer si evince che il campione deve essere costituito da 100 a 400 genotipi. Utilizzando campioni di questa dimensione, la differenza tra il valore di un singolo genotipo (o la media di un gruppo di genotipi) per un qualunque dato carattere quantitativo e la media dell'intero campione sarà massimizzata (differenziale di selezione, S). Tale differenziale rappresenterà il primo fattore nella valutazione del guadagno genetico. Tuttavia, questo fattore è ancora sovrastimato dalla deviazione ambientale e dall'interazione genotipo x ambiente, entrambe non ereditabili, e necessita di essere corretto tramite quantificazione della parte genetica della variazione rispetto alla variazione totale all'interno dell'insieme dell'intero campione.

La variabilità intravarietale è determinata da molti geni, ognuno dei quali controlla una certa distribuzione della diversità. A questi fattori genetici si aggiungono gli effetti causati dagli scostamenti ambientali casuali, caratterizzati da media zero, varianza diversa da zero e distribuzione quasi normale. Ciò significa che la distribuzione della diversità totale è una somma casuale di distribuzioni che, secondo le basi teoriche statistiche, sarà sempre una distribuzione normale. Da queste considerazioni ne consegue che, per un dato carattere, il valore fenotipico (osservato) di un genotipo in un insieme sperimentale sottoposto a selezione obbedirà all'equazione:



$$P = G + E + G \times E$$

Valore fenotipico	Valore genotipico	Deviazione ambientale	Interazione genotipo ambiente
-------------------	-------------------	-----------------------	-------------------------------

Il valore fenotipico (P) di un dato genotipo è l'unico a poter essere misurato direttamente. Tuttavia, il valore genotipico (G) "nascosto" è l'unico trasmissibile alla "progenie" e, pertanto, l'unico target della selezione policlonale. Per tale motivo, l'obiettivo principale dell'intero processo di selezione deve essere quello di ridurre, per quanto possibile, i valori di E e di G×E per approssimare i valori di P e G. Se si riesce in questo intento, il valore P misurabile diventerà un predittore affidabile di G.

Il primo passo verso il raggiungimento di questo obiettivo è condurre la selezione in studi di campo, dove ogni genotipo viene replicato più volte. In tal modo, vi saranno diverse deviazioni ambientali che si annullano reciprocamente, la cui media tenderà a zero con l'aumentare del numero di repliche. Questa proprietà è spiegata da una nozione di base di statistica: *la varianza delle medie di campioni costituiti da n elementi di un insieme di piante è uguale alla varianza dell'insieme divisa per n.*

Esperimenti di simulazione al computer conducono alla stessa conclusione. In termini pratici, ciò significa che qualsiasi selezione di singole piante sarà poco efficace perché la varianza delle deviazioni ambientali e la varianza dell'interazione genotipo x ambiente rappresentano dal 70 al 100% della varianza totale. Di conseguenza, la varianza genetica varierà dal 30 allo 0% della varianza totale. Al contrario, studi di selezione che utilizzano 15 piante per ogni genotipo, seguendo il classico disegno sperimentale con parcelle costituite da 3-4 piante e 4-5 repliche in blocchi randomizzati completi, permettono di ridurre la deviazione ambientale e l'interazione G×E a valori che vanno dal 10 al 40%, aumentando così la varianza genetica a valori che vanno dal 60 al 90% (3).

Questi valori della varianza genetica, divisi per la varianza fenotipica totale osservata, corrispondono all'ereditabilità in senso lato (h^2), fornendo i fattori correttivi necessari dei differenziali di selezione (S) per poter predire il guadagno genetico (R):

$$R = S \cdot h^2$$

Guadagno genetico	Differenziale di selezione	Ereditabilità in senso lato
-------------------	----------------------------	-----------------------------

Ampi studi di selezione basati su questi principi di genetica quantitativa e di statistica e condotte su varietà di antica coltivazione di viti originarie dell'Europa centrale e occidentale hanno spesso portato a guadagni in termini di resa compresi tra il 10 e il 40% e in termini di caratteri qualitativi del mosto fino al 10%, rispetto alla varietà di antica coltivazione originale e non sottoposta a selezione.

Oltre a utilizzare i valori fenotipici dei genotipi come predittori dei rispettivi valori genotipici, come descritto sopra, in contesti ottimizzati sarà possibile utilizzare metodi che consentono di ottenere predittori più precisi: i migliori predittori empirici lineari e corretti (EBLUP) dei valori genotipici. Si tratta di metodi basati su prove nell'ambito delle quali si utilizza un disegno sperimentale a blocchi incompleti, l'adattamento dei dati a modelli misti e la stima dei componenti della varianza tramite metodo REML (algoritmo di stima basato sulla massima verosimiglianza ristretta).



Le metodologie summenzionate vengono applicate ad ampi studi iniziali, che includono tutta la diversità della varietà di antica coltivazione target e hanno lo scopo di fornire una selezione di un gruppo di genotipi che presentino un guadagno significativo per il/i carattere/i desiderato/i. Come accade con la deviazione ambientale (E), quando questo gruppo viene piantato in modo completamente misto, le interazioni G×E dei diversi cloni si annulleranno reciprocamente: l'interazione G×E e la deviazione ambientale del gruppo tendono entrambe allo zero. Questo gruppo rappresenterà il risultato della selezione policlonale e, in ambienti diversi, si comporterà in modo stabile.

Nell'ambito di questa metodologia, la deviazione ambientale (E) e l'interazione G×E vengono esaminate insieme, dal momento che non è necessario separare e stimare i rispettivi valori.

2. Evoluzione storica delle metodologie di selezione applicate alle colture agricole e alle varietà di vite

Le origini del miglioramento vegetale risalgono alla prima metà del XIX secolo. Allora, con l'obiettivo di ottenere una progenie in grado di produrre risultati più efficienti per gli agricoltori, sono state condotte diverse ibridazioni nel regno vegetale (per ortaggi, cereali, alberi da frutto, ecc.). Fu un periodo molto produttivo, in un'epoca in cui le basi della genetica erano ancora sconosciute, menzionate per la prima volta da Mendel quando pubblicò il suo lavoro sulle piante di pisello (11), e accettate dalla comunità scientifica solo quando il suo lavoro fu riscoperto agli inizi del '900.

Negli ultimi 25 anni del XIX secolo le tecniche di miglioramento genetico tramite ibridazione cominciarono ad essere applicate anche alla vite (incrociando *Vitis vinifera* con le specie americane di *Vitis*), ottenendo un enorme successo e un grande impatto per aver debellato gravi parassiti quali la peronospora, l'oidio e la fillossera, che avevano spinto la viticoltura europea sull'orlo della scomparsa. Le prime opere sulla selezione massale e clonale di varietà di antica coltivazione, soprattutto in Germania, risalgono allo stesso periodo.

Nonostante queste pietre miliari storiche, il miglioramento vegetale come scienza e pratica acquisì notorietà e continuità solo a partire dagli anni Venti del XX secolo. Questo sviluppo tardivo può essere attribuito al fatto che i caratteri rilevanti delle piante (come accade per gli animali) sono per lo più quantitativi, il che rende la loro ereditabilità non totalmente spiegabile dalla genetica mendeliana. Tuttavia, sempre negli anni Venti del secolo scorso, iniziò a svilupparsi la branca scientifica appropriata a una migliore comprensione di questo tipo di caratteri: la biostatistica, nota anche come genetica quantitativa.

Un noto pioniere di questo sviluppo è stato Ronald Fisher, un ricercatore che si interessò, tra le altre cose, al miglioramento e alla selezione vegetale, mentre era alle prese con le difficoltà derivanti dalle carenze metodologiche per analizzare le grandi quantità di dati a disposizione presso la stazione sperimentale di Rothamsted, in Inghilterra. Il teorema fondamentale della selezione naturale di Fisher afferma che *il tasso di incremento di fitness (attitudine biologica) per ogni organismo in qualsiasi momento è uguale alla varianza genetica della fitness in quel momento* (12). La comparsa della genetica quantitativa e di altre importanti branche della scienza statistica (analisi della varianza, regressione e altre) ha avuto luogo grazie alle necessità individuate per la prima volta nel miglioramento vegetale. Naturalmente, una volta formalizzato e strutturato, il miglioramento vegetale ha ricevuto un forte stimolo dall'applicazione di diverse innovazioni metodologiche.



Da questo (e altri) stimoli, il miglioramento vegetale ha conosciuto un veloce sviluppo a partire dagli anni Trenta del XX secolo. Tra i casi più eclatanti c'è quello del grande successo del miglioramento del mais negli Stati Uniti e in altri paesi, ottenuto attraverso gli studi sull'eterosi e sul miglioramento vegetale condotti dal CIMMYT (Centro internazionale di miglioramento del mais e del grano¹) che ha consentito di attenuare la fame di milioni di persone in tutto il mondo.

Recentemente, il miglioramento vegetale è stato considerato da diversi autori (3) come la tecnologia responsabile della metà dei forti incrementi avuti negli ultimi 100 anni in termini di resa e qualità delle principali colture negli Stati Uniti e nel mondo, cioè tanto quanto quelli derivanti dalla somma di tutte le altre tecniche agricole. Per ottenere varietà migliorate geneticamente si utilizzano oggi numerose metodologie molto efficaci, tra cui: ibridi commerciali (basati sullo sfruttamento dell'eterosi delle piante incrociate come il mais), linee pure (piante omozigote e autogame come il frumento), varietà allogame (eterogenee, ottenute mediante selezione massale, come le specie forestali incrociate), cloni (il tipo varietale più omogeneo, utilizzato per le piante ottenute tramite propagazione vegetativa).

La vite (*Vitis vinifera*) rappresenta un caso particolare nel contesto del miglioramento vegetale, principalmente perché il concetto di "qualità del vino" racchiude molti fattori storici e psicologici che portano a preferire varietà di antica coltivazione di origine naturale. Pertanto, le tecniche di miglioramento che implicano la creazione di una variabilità nuova (ibridazione e altre) nella pratica faticano a essere accettate. Eppure, la selezione massale e clonale che si basa sulla variabilità intravarietale naturale, non presenta controindicazioni e dovrebbe quindi essere applicata senza riserve.

La prima condizione per la selezione massale e clonale della vite è l'esistenza di variabilità intravarietale e la conoscenza della sua estensione, della sua distribuzione geografica, dei caratteri interessanti e così via. Il primo studio in materia è stato condotto negli anni Trenta del secolo scorso in Germania e negli Stati Uniti, seppure con risultati apparentemente non compatibili con la presenza di variabilità intravarietale: mentre tale variabilità è stata riscontrata nelle tradizionali varietà in Germania, non è avvenuto lo stesso in quelle coltivate negli Stati Uniti (cfr. (13), (14) e (15) per approfondimenti). Negli anni Cinquanta del secolo scorso, in Francia, Levadoux ha reinterpretato queste osservazioni incoerenti e ha proposto che la diversità intravarietale riscontrata in Germania derivava dall'anzianità delle varietà, mentre la minore diversità riscontrata negli Stati Uniti suggerisce che le piante lì presenti fossero state importate dall'Europa (previa selezione di poche accessioni varietali) e contenevano solo una minima parte della diversità (16). Questi studi, tuttavia, non sono stati portati avanti per chiarire l'origine della diversità, la sua quantificazione oggettiva, la distribuzione geografica e il suo ruolo in termini di ottenimento del guadagno genetico atteso dalla selezione.

Il secondo fattore di guadagno genetico – l'ereditabilità in senso lato – derivante dalla scomposizione della varianza totale in componenti genetiche (ereditabili) e componenti ambientali (non ereditabili) non è stato studiato approfonditamente così da poter essere applicato nel contesto della selezione della vite. In Francia, Rives ha stilato una sintesi rigorosa dei fondamenti genetici atti a modernizzare e a rendere più efficace la selezione moderna, ma le sue proposte non sono state accolte (1).

¹ <http://www.cimmyt.org/>



Ciononostante, ci sono stati dei tentativi (3) di allineare le metodologie di selezione della vite agli standard di miglioramento vegetale per le specie di interesse agricolo in generale.

In sintesi, la metodologia proposta nell'ambito di questo documento trova i suoi fondamenti in teorie di vecchia data e ben collaudate nel campo della statistica e della genetica quantitativa, nelle diverse opere di riferimento nel settore del miglioramento vegetale condotte in diverse parti del mondo, nonché nelle applicazioni pratiche alla vite ben documentate.

3. Situazione attuale e rischi correlati alle risorse genetiche di *Vitis vinifera*

Si suppone che in origine le varietà di vite di antica coltivazione fossero genotipi omogenei, che hanno iniziato a generare e accumulare diversità principalmente grazie alle mutazioni somatiche dei caratteri quantitativi. In passato, la maggior parte delle piante veniva propagata agamicamente, quindi i loro geni non andavano persi alla loro morte, venivano invece trasferiti alle piante nuove che accumulavano ulteriori mutazioni e il processo andava avanti per generazioni.

Questo processo, in atto da millenni, ha dato origine alla straordinaria diversità che oggi possiamo osservare all'interno di molte varietà di antica coltivazione. Esso fu però limitato con l'introduzione nei nuovi impianti di barbatelle innestate commerciali, provenienti da un numero molto ridotto di vigneti specializzati (usati per la moltiplicazione). Ciò significa che tutte le piante di quella varietà di antica coltivazione sono tuttora coltivate e continuano ad accumulare mutazioni, che non vengono però più trasmesse alle piante dei vigneti nuovi: il processo attraverso il quale la variabilità creata ogni anno veniva accumulata e trasmessa è stato ridotto.

Questo fenomeno è ulteriormente aggravato dall'ampia generalizzazione della selezione varietale, soprattutto quando questa selezione è molto restrittiva (coltivazione di pochi genotipi selezionati).

Questa situazione non può che portare all'omogeneizzazione di tutti i vigneti e a un "congelamento" genetico della varietà, che si traduce in definitiva nell'impossibilità della selezione a medio o anche a breve termine, a meno che nella selezione clonale classica di una data varietà non si sia adottata una pressione selettiva debole che ha portato alla selezione di molti cloni. Il termine ultimo per l'estinzione della variabilità intravarietale in ogni paese dipende essenzialmente dal lavoro di selezione clonale pubblico e privato avviato a partire dagli anni Settanta del XX secolo e da quando tale paese ha iniziato a utilizzare barbatelle innestate e dalla velocità di rinnovamento dei vigneti più datati. In Eurasia, dove la specie *Vitis vinifera* ha una maggiore diversità, alcuni paesi potrebbero aver già perso gran parte della diversità che avevano originariamente, mentre altri potrebbero essere ancora in tempo per predisporre delle strategie di conservazione.

Le alternative per la conservazione sono piuttosto scarse: una conservazione in campo ad ampio spettro non è molto praticabile, poiché comporterebbe la coltivazione di piante estremamente eterogenee, difficilmente compatibile con una viticoltura moderna e competitiva. Per evitare l'erosione dovuta alla selezione clonale classica, è praticabile solo la conservazione in vigneti dedicati utilizzando campioni rappresentativi della diversità di ogni varietà.

Alcuni paesi hanno già sviluppato un quadro teorico per promuovere questo tipo di conservazione. Per essere rappresentativo, il campione dovrebbe avere almeno 70 o più genotipi per ogni regione in cui viene coltivata la varietà di antica coltivazione, numero che tende a raggiungere le diverse centinaia



quando una determinata varietà di antica coltivazione è coltivata da lungo tempo in diverse regioni di diversi paesi. La conservazione deve essere ridondante e basarsi preferibilmente su due collezioni: una dedicata esclusivamente alla conservazione (anche in vaso) e l'altra in un vigneto sperimentale, gestito secondo le consuete pratiche agricole, destinato alla conservazione e alla valutazione di tutti i genotipi presenti nel campione.

La conservazione rappresenta un'attività sperimentale strettamente legata alla selezione. In primo luogo, i genotipi oggetto della prospezione per entrambi gli obiettivi possono essere in gran parte gli stessi. In secondo luogo, la valutazione dei cloni conservati può essere uno strumento utile alla selezione e, al contrario, le prove di selezione possono essere utilizzate come strutture di conservazione.

Riassumendo, al fine di poter garantire la continuità degli sforzi compiuti in termini di selezione unitamente ai notevoli miglioramenti genetici ed economici che potrebbero derivarne, la conservazione della variabilità intravarietale rappresenta oggi un'attività altamente prioritaria.

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA

**BIBLIOGRAFIA E CITAZIONI**

- (1) Rives M. (1971) Génétique et amélioration de la vigne. In: Ribereau-Gayon J, Peynaud E (eds) *Traité d'ampélogie, Sciences et Techniques de la Vigne*. Dunod, Paris, pp.171-219.
- (2) Gonçalves, E. and Martins, A. (2012) *Genetic variability evaluation and selection in ancient grapevine varieties*, 333-352, In: Abdurakhmonov IY (ed) *Plant Breeding*, Intech. http://cdn.intechopen.com/pdfs/25564/InTech-Genetic_variability_evaluation_and_selection_in_ancient_grapevine_varieties.pdf
- (3) Martins, A., Gonçalves, E. (2015) *Grapevine breeding programs in Portugal*. In: Reynolds, A. (ed.) *Grapevine breeding programs for wine industry*, Woodhead Publishing. Partially available in https://books.google.pt/books?id=LNfzAwAAQBAJ&pg=PA159&lpg=PA159&dq=martins+gon%C3%A7alves+Grapevine+breeding+diversity&source=bl&ots=WMs4xnhrsA&sig=H2gnTYEPn_1vqWTWW6H8M_wN_uE&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CC4Q6AEwAWoVChMIInpjK0J-XyAIVAX4aCh0n7wi8#v=onepage&q=martins%20gon%C3%A7alves%20Grapevine%20breeding%20diversity&f=false
- (4) OIV (2017) Resolution VITI 564A-2017 on "OIV Process for the clonal selection of vines"
- (5) Mood, A.M. & Graybill, F.A. (1963). *Introduction to the Theory of Statistics*. McGraw-Hill, New York.
- (6) Lynch, M., Walsh, B. (1997) - *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- (7) Chase, W. & Brown, F. (1997) *General Statistics* (3th ed.). J. Willey, New York.
- (8) Conner JK, Hartl DL (2004). *A Primer of Ecological Genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- (9) Falconer, D. & Mackay, T. (1996). *An introduction to quantitative genetics*. 4th edn. Prentice Hall, ISBN 0582-24302-5, London.
- (10) Bowman J.C. (1972) Genotype x environment interaction. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 4: 117-123
- (11) Mendel, J.G. (1866). "Versuche über Pflanzenhybriden", *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr, 1865, *Abhandlungen*: 3–47
- (12) Fisher, R.A. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*, Clarendon Press, Oxford
- (13) Sartorius, O. (1926). Zur Rebenselection unter besonderer Berücksichtigung der Methodik unter der Ziele auf Grund von 6–14 jährigen Beobachtungen an einem Klon. *Z für Pflanzenz*, 11, 31-74.
- (14) Sartorius, O. (1928). Über die wissenschaftlichen Grundlagen der Reben selection in reinen Beständen. *Z für Pflanzenz*, 13, 79-86.
- (15) Bioletti, F. T. (1926). *Selection of planting stock for vineyards*. University of Calif..
- (16) Levadoux, L. (1951) *L'hybridation et la sélection chez la vigne*. (Vol. 23). Déhan.