

La parenté du 'Sangiovese'

J. F. Vouillamoz^{a*}, A. Monaco^b, L. Costantini^d, M. Stefanini^d, A. Scienza^c, M. S. Grando^a

^a IASMA Research Centre, Genetics and Molecular Biology Department Via E. Mach, 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), ITALY

^b Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (NA), ITALY

^c Dipartimento di Produzione Vegetale, Sezione Coltivazioni Arboree, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, ITALY

Mots-clés : parenté, microsatellite, Italie, cépage, *Vitis vinifera*

Auteur pour la correspondance:

José Vouillamoz, Ph. D.
University of Neuchâtel
National Centre of Competence in Research "Plant Survival"
Rue Emile Argand 11
Case postale 158
CH - 2009 Neuchâtel, Switzerland
e-mail: jose.vouillamoz@unine.ch
tel +41 (0)27 3227165, fax +41 (0)32 718 2501

Résumé

En 2002, l'analyse des microsatellites, les marqueurs de choix pour le test de paternité par ADN, a permis de découvrir un lien génétique de type parent/enfant entre le 'Sangiovese', le cépage rouge le plus répandu en Italie, et le 'Ciliegiolo', un ancien cépage de la Toscane. Il n'avait cependant pas été possible de déterminer qui était le père et qui était le fils. Nous avons alors testé les deux hypothèses possibles : le 'Sangiovese' comme père, puis comme fils du 'Ciliegiolo', en recherchant dans notre vaste base de données (ca. 2000 génotypes) l'autre parent possible. En testant le 'Sangiovese' comme père du 'Ciliegiolo', nous n'avons pas trouvé de candidat. En testant le 'Ciliegiolo' comme père du 'Sangiovese', nous avons trouvé quatre candidats possibles. Après l'analyse de 50 microsatellites, un seul cépage a résisté au test de paternité et nous avons établi avec un support statistique très élevé que le 'Sangiovese' est issu d'un croisement naturel entre le 'Ciliegiolo' et le 'Calabrese di Montenuovo', un cépage inconnu que nous avons trouvé en Campanie (Italie). Ce cépage n'a pas de nom officiel et a très probablement été introduit de la Calabre. Afin de déterminer son identité ampélographique, nous avons analysé 194 cépages locaux supplémentaires provenant de la Calabre, de la Campanie, de la Toscane, etc., mais nous n'avons pas trouvé de variété correspondante. Par conséquent, nous proposons d'adopter officiellement le nom de 'Calabrese di Montenuovo' pour ce cépage. En outre, nous avons trouvé en Calabre plusieurs parents du 'Sangiovese' et du 'Calabrese di Montenuovo', ce qui suggère fortement que ce dernier soit bel et bien originaire de la Calabre et que le 'Sangiovese' ait des ancêtres et/ou des descendants aussi bien en Toscane qu'en Calabre.

Introduction

Le ‘Sangiovese’ est le cépage rouge le plus répandu en Italie (ca. 85’000 hectares), où il est cultivé dans presque toutes les régions (sauf en Vallée d’Aoste, au Trentin-Haut Adige et dans les Frioules). En Toscane, son terroir de prédilection, le ‘Sangiovese’ produit les célèbres vins de Brunello de Montalcino et du Chianti. La première mention écrite du ‘Sangiovese’ remonte très probablement à Giovanvettorino Soderini (1590), un gentilhomme de Florence qui mettait en garde les lecteurs de son traité en avertissant : « gardes-toi du Sangiogheto, qui croit en faire du vin en fait du vinaigre ». Il ajoutait cependant que ce cépage donnait régulièrement une grande quantité de vin. Le nom de ‘Sangiogheto’ est effectivement un des plus anciens synonymes du ‘Sangiovese’, qu’on appelle également ‘Sangiovetto’, ‘Prugnolo Gentile’, ‘Brunello’ ou encore ‘Morellino’ en Toscane, ‘Nielluccio’ ou ‘Niella’ en Corse, ‘Uva Abruzzi’ ou ‘Tuccanese’ dans le Sud de l’Italie, etc. On admet depuis longtemps des origines toscanes pour le ‘Sangiovese’, et on dit même souvent qu’il était déjà cultivé par les Étrusques. Certains ont même émis l’hypothèse que le ‘Sangiovese’ aurait été domestiqué à partir des vignes sauvages de Toscane. Grâce au test ADN, nous pouvons aujourd’hui mieux comprendre les liens génétiques entre les cépages (Sefc *et al.* 2001). Le test consiste dans l’examen de régions particulières des chromosomes appelées "microsatellites", des morceaux d’ADN dont la taille varie d’un cépage à l’autre, permettant ainsi l’identification des individus. Ces marqueurs moléculaires suivent les lois de l’hérédité : chaque microsatellite a deux valeurs appelées des "allèles" (un par chromosome), un allèle provenant du père et l’autre de la mère. Par conséquent, un fils doit forcément partager au moins un allèle avec chaque parent, ce qui permet la reconstruction des pedigrees. Grâce à cette technique des parentés insoupçonnées ont été découvertes. En ce qui concerne le ‘Sangiovese’, Crespan *et al.* (2002) ont trouvé qu’il partage au moins un allèle à chaque microsatellite (sur les 22 analysés) avec le ‘Ciliegiolo’, ce qui constitue une condition *sine qua non* pour avoir un lien de type parent/enfant. Le ‘Ciliegiolo’ est une ancienne variété toscane probablement aussi citée par Soderini (1590) sous le nom ‘Ciregiuolo’ ou ‘Cireguoli’. En outre, Crespan *et al.* (2002) rapportent que quelques auteurs soutiennent que le ‘Ciliegiolo’ aurait été introduit d’Espagne autour de 1870. Le ‘Ciliegiolo’ est aujourd’hui cultivé dans 14 régions d’Italie et est souvent assemblé au ‘Sangiovese’ dans les vins de Chianti. Cependant, en l’absence de l’autre parent, Crespan *et al.* (2002) ne pouvaient pas dire si le ‘Sangiovese’ est le père ou le fils du ‘Ciliegiolo’, simplement parce que l’âge des cépages traditionnels est inconnu. En outre, Vouillamoz *et al.* (2006) ont montré qu’au moins 50-60 microsatellites sont nécessaires pour valider un lien génétique de type parent/enfant en l’absence de l’autre parent. Pour la présente étude, une recherche exhaustive dans notre base de données privée qui contient les génotypes microsatellites de près de 2000 cépages du monde entier (y-compris plus de 500 d’Italie) et l’analyse de 50 microsatellites ont permis de découvrir la parenté du ‘Sangiovese’.

Matériels et méthodes

Les détails sur le matériel végétal, la base de données, l’analyse microsatellite et les calculs de probabilités se trouvent dans Vouillamoz *et al.* (2007). Pour la présente étude, 194 cépages (n=160 de Calabre, n=25 de Campanie, n=6 de Toscane, n=2 de Basilicata et n=1 des Pouilles) ont été analysés à 10 microsatellites (VVMD5, VVMD7, VVMD24, VVMD27, VVMD28, VVMD31, VVMD32, VVS2, VrZAG62, VrZAG79). Tous les échantillons de la Calabre proviennent de la collection privée de la cave Librandi (Ciró Marine, Krotone,

Calabre). Comme la collection est en phase de caractérisation, les échantillons furent analysés "à l'aveugle" (numérotés). Les autres échantillons proviennent directement des vignobles, la plupart d'entre eux n'ayant que des noms locaux de fantaisie. Le 'Sangiovese', le 'Ciliegiolo', ainsi que tous les cépages candidats à la parenté ont été analysés à 40 microsatellites supplémentaires (Tableau 1).

Résultats et discussion

'Sangiovese' = 'Ciliegiolo' × 'Calabrese di Montenuovo'

Le 'Sangiovese' et le 'Ciliegiolo' partagent au moins un allèle à chaque microsatellite, il est donc possible de connaître la moitié du génotype que doit avoir l'autre parent inconnu. Avec 10 microsatellites, nous avons testé le 'Sangiovese' comme père du 'Ciliegiolo', et nous n'avons trouvé aucun cépage qui pourrait être l'autre parent. Avec le 'Ciliegiolo' comme père du 'Sangiovese', nous avons trouvé quatre candidats que nous avons ensuite analysés à un total de 32 microsatellites (les premiers 32 dans le Tableau 1), comme cela se fait généralement pour les analyses de parentés (Sefc *et al.* 2001). Les trois premiers candidats ont été exclus car à 5 ou 6 microsatellites, ils ne partageaient pas au moins un allèle avec le 'Sangiovese'. Seul le cépage appelé 'Calabrese di Montenuovo', analysé par Costantini *et al.* (2005), partageait au moins un allèle à chaque microsatellite avec le 'Sangiovese', suggérant ainsi fortement un lien de type parent/enfant. Afin d'avoir une certitude statistique très élevée, nous avons examiné cette parenté avec 50 microsatellites (Tableau 1), un nombre nettement plus élevé que la majorité des autres études, et la parenté est restée fortement soutenue à 49 sur 50 microsatellites. Une seule discordance a été observée (Tableau 1). Comme nous l'avons déjà démontré dans un travail précédent (Vouillamoz *et al.* 2003), un tel cas peut s'expliquer simplement par une mutation somatique dans le 'Sangiovese'. En outre, un niveau de discordance de 2% est assez commun dans les analyses de parentés (Jones et Ardren 2003). Nos travaux démontrent ainsi que le 'Sangiovese' est issu d'un croisement naturel entre le 'Ciliegiolo' et le 'Calabrese di Montenuovo'. Les calculs de probabilités soutiennent très fortement la parenté découverte : il est 2.81×10^{37} fois plus probable que le 'Sangiovese' soit issu d'un croisement entre le 'Ciliegiolo' et le 'Calabrese di Montenuovo' plutôt qu'entre deux autres cépages (Vouillamoz *et al.* 2007). En d'autres termes, il y a une possibilité sur 2.81×10^{37} pour que cette parenté soit fautive ! Toujours est-il que l'identité ampélographique du 'Calabrese di Montenuovo' demeure inconnue...

Sur les traces du 'Calabrese di Montenuovo'

'Calabrese di Montenuovo' n'est pas un nom de cépage officiellement enregistré. Son profil ADN ne correspond à aucune variété dans notre banque de données. De fait, le 'Calabrese di Montenuovo' n'est pas identique au 'Nero d'Avola' de la Sicile, un cépage qui est souvent appelée 'Calabrese', ni aux nombreuses variétés italiennes ayant un nom composé de "Calabrese" suivi d'un épithète. En réalité, le 'Calabrese di Montenuovo' a été échantillonné "fortuitement" par Antonella Monaco pour une étude des cépages de la Campanie (Costantini *et al.* 2005). Ce cépage, dont il ne restait qu'une douzaine de plantes, est appelé localement 'Calabrese di Montenuovo' tout simplement parce que la vigne est située sur la colline de Montenuovo près de Naples et que les fondateurs de la cave sont venus de Calabre. Ce cépage-clé étant en danger d'extinction, nous l'avons multiplié dans notre collection ampélographique de IASMA. Pour remonter la trace du 'Calabrese di Montenuovo' afin de pouvoir déterminer son identité

Tableau 1. Profils ADN à 50 microsatellites. La parenté ‘Sangiovese’ = ‘Ciliegiolo’ × ‘Calabrese di Montenuovo’ est démontrée à 49 sur 50 microsatellites. L’unique discordance a été observée en VMC5H2 (allèle en gras). Le cépage de la Calabre nommé “Negrello-39” (sans nom officiel) partage au moins un allèle à chaque microsatellite avec le ‘Sangiovese’, suggérant ainsi fortement qu’il soit un fils du ‘Sangiovese’.

Microsat.	Ciliegiolo	Sangiovese	Calabrese di Montenuovo	“Negrello-39”
VVMD5	236-226	236-226	232-226	236-226
VVMD6	214-212	212-194	212-194	212-212
VVMD7	263-247	263-239	239-239	249-239
VVMD8	143-135	147-143	147-141	143-143
VVMD17	222-212	221-212	221-212	221-212
VVMD21	266-243	249-243	258-249	253-243
VVMD24	219-216	216-210	216-210	216-210
VVMD25	245-245	245-245	259-245	245-245
VVMD26	251-249	249-249	251-249	251-249
VVMD27	181-179	185-179	189-185	179-179
VVMD28	247-237	247-237	237-231	247-231
VVMD31	216-212	212-212	212-210	216-212
VVMD32	253-253	257-253	257-257	257-253
VVMD34	240-240	240-240	240-240	248-240
VVMD36	264-244	264-264	276-264	294-264
VVS2	133-133	133-133	135-133	143-133
VVS4	175-168	168-168	168-168	176-168
VVS29	171-171	171-171	171-171	171-171
VMC1B11	184-166	166-166	188-166	170-166
VMC1C10	142-142	142-142	142-142	156-142
VMC1E8	230-208	222-208	222-208	222-208
VMC2A5	171-157	157-157	157-157	177-157
VMC2B3	188-180	188-180	180-180	188-180
VMC2B11	176-172	182-176	182-180	176-168
VMC2E7	160-154	160-158	158-158	160-160
VMC2F10	93-93	93-89	109-89	93-89
VMC2H4	218-202	218-218	218-216	218-218
VMC3D12	205-199	205-205	222-205	205-199
VMC4C6	163-163	163-157	157-157	163-157
VMC5A1	171-169	171-169	171-161	171-169
VMC5C5	120-116	116-116	124-116	116-116
VMC5G8	317-309	309-309	309-301	309-301
VMC5H2	194-194	209 -194	194-194	209-194
VMC5H5	188-176	194-176	194-184	194-188
VMC6E1	141-139	165-141	165-141	141-139
VMC6E10	115-113	115-91	91-91	109-91
VMC6G1	178-178	198-178	198-170	178-170
VMC8D1	219-209	219-209	219-209	219-209
VMC8F10	233-197	233-197	197-197	233-233
VMC8G6	161-155	155-155	161-155	155-135
VMC8G9	171-171	195-171	195-171	199-171
VMC9B5	246-234	262-234	262-262	262-234
VMC16F3	183-175	177-175	185-177	177-163
VrZAG21	202-190	204-202	204-190	204-190
VrZAG62	205-195	197-195	197-195	203-197
VrZAG64	143-141	141-139	143-139	143-139
VrZAG67	155-126	155-132	132-126	132-126
VrZAG79	259-245	259-243	247-243	259-251
VrZAG83	185-173	191-173	191-181	191-191
VrZAG93	189-175	199-189	199-199	199-189

ampélographique, nous avons analysé 194 cépages supplémentaires de la Calabre (n=160), de la Campanie (n=25), de la Toscane (n=6), de la Basilicate (n=2) et des Pouilles (n=1). Après élimination des génotypes identiques, nous avons obtenu 73 cépages ayant des génotypes uniques et nouveaux dans notre base de données. Cependant, aucun d’entre eux ne correspondait au ‘Calabrese di Montenuovo’, c’est pourquoi nous proposons d’adopter officiellement ce nom. Quatre cépages de Campanie appelés localement "Calabrese" suivi d’une épithète selon leur lieu de provenance ont attiré notre attention. Leurs profils ADN correspondaient à quatre cépages différents : 1) la ‘Nocera’ de l’Université de Californie à Davis (USA), un cépage cultivé selon

Galet (2000) en Calabre et en Sicile, 2) le 'Negro Amaro' analysé par Zulini *et al.* (2002), un cépage typique des Pouilles, 3) le 'Sangiovese', comme le suggérait sa morphologie, et 4) le 'Calabrese di Montenuovo', échantillonné dans un vignoble à Soccavo près de Naples. La présence dans la même région de Campanie de ces quatre cépages sous le nom de « Calabrese » illustre indubitablement un "pont" viticultural entre la Campanie et la Calabre et suggère très fortement que le 'Calabrese di Montenuovo' soit bel et bien venu d'Italie du Sud. Nous avons ensuite cherché des éventuels parents du 'Sangiovese', du 'Ciliegiolo' ou du 'Calabrese di Montenuovo' parmi ces nouveaux cépages. Avec 10 microsatellites, nous n'avons trouvé aucun parent du 'Ciliegiolo' (probablement parce que le nombre de cépages toscans était trop restreint), mais nous avons par contre trouvé que le 'Calabrese di Montenuovo' et le 'Sangiovese' partagent au moins un allèle à chaque microsatellite avec quatre et neuf cépages de la Calabre, respectivement. Tous ces cépages ont été ensuite analysés à un total de 32 microsatellites (les premiers 32 dans le Tableau 1). Le 'Calabrese di Montenuovo' partageait encore au moins un allèle à chaque microsatellite avec un seul cépage : le 'Castiglione', une variété très répandue en Calabre (déjà analysée à l'université de Californie à Davis et par Costantini *et al.* 2005). Ce lien génétique soutient fortement une origine calabraise du 'Calabrese di Montenuovo'. Le 'Sangiovese' partageait encore au moins un allèle à chaque microsatellite avec six cépages. Tous provenaient de la collection de Librandi et portaient des noms basés sur "Nerello" ou "Negrello" suivis d'une épithète selon leur lieu d'origine ou leurs caractéristiques (Sculli 2004). Parmi eux, le cépage numéroté "Negrello-39" pouvait mettre en doute notre parenté du 'Sangiovese' : la parenté 'Sangiovese' = 'Calabrese di Montenuovo' × "negrello-39" était vérifiée à 31 sur 32 microsatellites, avec seulement un locus de discordance (VVMD7). Si cette hypothèse venait à être validée, alors le 'Ciliegiolo' devrait forcément être un fils du 'Sangiovese' au lieu d'être son père. Cependant, après l'analyse de 50 microsatellites, cette parenté était invalidée à 8 microsatellites (VVMD7, VMC5H5, VMC6E10, VMC16F3, VrZAG21, VrZAG64, VrZAG67, VrZAG83, Tableau 1), excluant ainsi cette hypothèse. Toutefois, le cépage nommé "Negrello-39" partageait encore au moins un allèle à chaque microsatellite avec le 'Sangiovese', soutenant ainsi fortement que le "Negrello-39" est un fils du 'Sangiovese'. Bien qu'un minimum de 57 microsatellites soient recommandés pour pouvoir démontrer un lien génétique de type parent/enfant en l'absence de l'autre parent (Vouillamoz et Grando 2006), partager un allèle à chacun des 32 microsatellites signale très vraisemblablement un lien génétique étroit, de type parent/enfant ou frères/sœurs. Par conséquent, nos résultats indiquent fortement que le 'Sangiovese' et le 'Calabrese di Montenuovo' ont tous les deux de la parenté en Calabre. À la lumière des résultats moléculaires, la lecture d'un texte écrit un siècle plus tôt prend une tournure toute différente : dans la fameuse "Ampélographie" de Viala & Vermorel, Vannuccini (1903) rapporte que dans le Sud de la Toscane, aux alentours d'Arezzo, le 'Sangiovese' [San Giovetto] est appelé 'Calabrese'... Devrait-on y voir le témoin d'une ancienne origine calabraise ?

Conclusions

Nous avons montré avec 50 microsatellites que le 'Sangiovese' est un fils naturel du 'Ciliegiolo' de Toscane et du 'Calabrese di Montenuovo', un cépage trouvé en Campanie mais sûrement introduit de la Calabre. Puisque ce cépage n'a pas de nom officiel et que son profil ADN ne correspond à aucune autre variété, nous proposons d'adopter officiellement le nom 'Calabrese di Montenuovo' (plantes de référence dans la collection de IASMA). En outre, le test de paternité a démontré un lien type parent/enfant entre le 'Calabrese di Montenuovo' et le 'Castiglione', un

cépage très répandu en Calabre. Cette parenté soutient donc une origine calabraise pour le 'Calabrese di Montenuovo'. Le test a également permis d'identifier six fils possibles du 'Sangiovese' en Calabre. Nos travaux suggèrent donc fortement que le 'Sangiovese' ait des origines génétiques et géographiques doubles : la Toscane à travers le 'Ciliegiolo' et le Sud de l'Italie à travers le 'Calabrese di Montenuovo'.

Remerciements

Nous remercions le Dr Manna Crespan (Istituto Sperimentale per la Viticoltura, Sezione Ampelografia e Miglioramento Genetico, Susegana, Italie) pour ses commentaires utiles. Nous sommes reconnaissants à Nicodemo Librandi & Antonio Spa (Cave Librandi, Ciró Marina, Krotone, ITALIE) pour la permission d'utiliser leur collection ampélographique. Cette recherche a été partiellement financée par l'Associazione Nazionale Città del Vino dirigée par Paolo Benvenuti pour le projet « Origines du 'Sangiovese' »

Références

- Costantini, L., Monaco, A., Vouillamoz, J.F., Forlani, M. et Grando, M.S. 2005. Genetic relationships among local *Vitis vinifera* cultivars from Campania (Italy). *Vitis* 44 (1), 25-34.
- Crespan, M., Calò, A., Costacurta, A., Milani, N., Giust, M., Carraro, R. et Di Stefano, R. 2002. Ciliegiolo e Aglianicone: unico vitigno direttamente imparentato col Sangiovese. *Rivista di Viticoltura e di Enologia, Conegliano* 55 (2-3), 3-14.
- Galet, P. 2000. Dictionnaire encyclopédique des cépages. Hachette, Paris.
- Jones, A.G. et Ardren, W.R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology* 12, 2511–2523.
- Sculli, O. 2004. I vitigni autoctoni della Locride. Cittàcalabriaedizioni, Soveria Mannelli.
- Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K.D., Steinkellner, H. et Thomas, M.R. 2001. Microsatellite markers for grapevine: a state of the art. In: Roubelakis-Angelakis, K.A. (eds), *Molecular biology and biotechnology of grapevine*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam. pp. 433-463.
- Soderini, G. 1590. Trattato della coltivazione delle viti, e del frutto che se ne può cavare. Filippo Giunti, Firenze.
- Vannuccini, V. 1903. San Giovetto. In: Viala, P. et Vermorel, V. (eds), *Ampélographie*, Masson, Paris. 3, pp. 332-336.
- Vouillamoz, J., Maigre, D. et Meredith, C.P. 2003. Microsatellite analysis of ancient alpine grape cultivars: pedigree reconstruction of *Vitis vinifera* L. 'Cornalin du Valais'. *Theoretical & Applied Genetics* 107 (3), 448-454.
- Vouillamoz, J.F. et Grando, M.S. 2006. Genealogy of wine grape cultivars: 'Pinot' is related to 'Syrah'. *Heredity* 97 (2), 102-110.
- Vouillamoz, J.F., Monaco, A., Costantini, L., Stefanini, M., Scienza, A. et Grando, M.S. 2007. The parentage of 'Sangiovese', the most important Italian wine grape. *Vitis* 46 (1), 19-22.
- Zulini, L., Russo, M. et Peterlunger, E. 2002. Genotyping wine and table grape cultivars from Apulia (Southern Italy) using microsatellite markers. *Vitis* 41 (4), 183-187.