



—INFO—

www.fcba.info.fr

L'analyse de l'ADN des chênes au service de la tonnellerie et de la filière graines et plants

Oak DNA testing to optimize processes and traceability of the cooperage, forest nursery and forest management activities

Parmi d'autres critères, l'origine géographique et l'espèce à laquelle appartiennent les arbres conditionnent les caractéristiques du bois et sa qualité par rapport à différents usages. Des outils basés sur l'ADN exploités en exclusivité par FCBA permettent d'une part de compléter la traçabilité documentaire de l'origine du bois de chêne et des plants forestiers et d'autre part de différencier efficacement le chêne sessile du pédonculé. Un service basé sur ces outils est offert aux entreprises intéressées.

Among other criteria, the geographic provenance and the species to which trees belongs determines the wood properties and its quality towards various uses. Diagnostic tools based on DNA used exclusively by FCBA to confirm documentary traceability of the geographical origin of oak wood and performances of tree seedlings on the one hand and to differentiate sessile from pedonculate oak on the other hand. Read English version at the end of this article...

Introduction

Les caractéristiques du vin sont influencées par celles du raisin, des levures et des conditions de vinification. Le contact du vin avec le bois sous toutes ses formes (cuves, tonneaux et autres objets de différentes formes et dimensions, les "produits œnologiques" : barreaux, granulés, copeaux) lui amène des composés chimiques naturels qui peuvent influencer sa fermentation, son oxygénation et in fine ses arômes.

Les composés aromatiques apportés par le bois se transforment au cours de la vinification. Elle est elle-même fortement influencée par les caractéristiques du bois. Ainsi le grain (largeur des anneaux de croissance de l'arbre) et les polyphénols du bois et du raisin déterminent la consommation d'oxygène du vin en cours d'élaboration (Husson et Pardon 2002).

Comme la vigne, le chêne réagit à son environnement et au climat en fonction de ses aptitudes et adaptations largement déterminées par sa génétique, ce qui détermine ses modalités de croissance et in fine les caractéristiques de son bois.



La génétique et l'ADN

La génétique du chêne à merrains, c'est l'hérédité transmise par ses parents. Cette hérédité lui est unique (l'individu est une combinaison unique des gènes parentaux) mais elle est largement définie par son espèce et la population dont il est issu.

Les deux espèces principales de chênes européens sont le chêne sessile (chêne rouvre, *Quercus petraea*) et le pédonculé (*Quercus robur*). Le second est beaucoup plus exigeant en termes de sol, de lumière et d'eau. Les deux espèces réagissent donc différemment aux fluctuations climatiques par exemple alors qu'elles sont présentes simultanément dans la plupart des forêts françaises. Leur croissance et donc notamment le grain de leur bois est

influencée par leur niveau de stress résultant des variations de l'environnement (Bakour, 2003).

Des études successives ont montré que la composition chimique moyenne de leur bois diffère également entre les deux espèces, en particulier en ce qui concerne la teneur en molécules aromatiques (Husson et Pardon 2002; Prida *et al.* 2006 et 2007).

La localisation géographique d'une forêt correspond à une combinaison particulière de caractéristiques de l'environnement, éventuellement de gestion sylvicole, et d'une population de chêne avec sa génétique et une proportion particulière des espèces.

Ainsi globalement, l'espèce et la provenance géographique sont des informations susceptibles de résumer les qualités que l'on peut attendre du bois de chêne et leur impact sur le vin (Michel 2012, Prida 2015).

Ces mêmes informations sont importantes pour les acteurs du commerce des graines et plants forestiers et leurs clients. La législation afférente et les demandes des acheteurs imposent qu'elles soient mentionnées lors des transactions.

Ces informations étant totalement liées à la génétique, elles peuvent être décryptées par l'analyse de l'ADN.

Différents types d'ADN pour différents usages

Il y a trois types d'ADN chez les plantes : l'ADN du noyau (dit ADN nucléaire, celui des chromosomes) qui est hérité des deux parents est le plus complexe (donc le plus riche en information, le texte de l'ADN est très "long") mais présent en un plus petit nombre de copies dans les cellules de la plante. Les deux autres types d'ADN sont plus courts (donc moins informatifs) mais présents en de multiples exemplaires dans chaque cellule. Il s'agit de l'ADN des chloroplastes (microvésicule siège de la photosynthèse au sein de la cellule végétale) et de l'ADN des mitochondries (autre microvésicule siège de la respiration au sein des cellules animales et végétales).

Ces deux derniers types d'ADN sont présents en de très nombreux exemplaires au sein de chaque cellule végétale. On peut donc en récupérer quelques copies intactes dans du bois ayant subi le vieillissement, la dessiccation et d'autres traitements qui altèrent globalement l'ADN, causant progressivement sa dégradation physique, ce qui compromet plus rapidement la récupération d'un ADN nucléaire analysable.

Outre la dégradation physique de l'ADN, le vieillissement du bois dans l'arbre vivant puis après la mort de l'arbre et sa transformation industrielle s'accompagne aussi de l'accumulation de composés organiques qui gênent la récupération et l'analyse de l'ADN.

L'hérédité (transmission par les parents) des chloroplastes et mitochondries varie entre les espèces. Chez les chênes et la plupart des feuillus, les chloroplastes comme les mitochondries sont héritées de la mère. Ils sont donc tous deux le reflet de la population locale. Ce reflet est insensible à l'intervention de pollen (contribution paternelle) parfois mais en fait rarement, transporté à longue distance. Différentes raisons techniques (liées notamment à la stabilité et à la facilité de purification de l'ADN) font que les études des populations de chênes ont principalement été basées sur l'ADN chloroplastique.

Les travaux de recherche sur les provenances

L'INRA de Bordeaux (unité Biogeco) a commencé à traiter le sujet à la fin des années 1980. Les synergies entre équipes de recherche européennes utilisant l'ADN, les pollens et les études de terrain ont fourni au début des années 2000 un Atlas des variations de l'ADN chloroplastique retrouvées dans plus de 3000 forêts de chêne (figure 1). Ces résultats ont été remarquablement synthétisés en Français (Kremer *et al.* 2002) et plus récemment vulgarisés (Kremer 2015). Les travaux se sont poursuivis pour traiter la question de la traçabilité des objets en bois afin notamment de contribuer aux travaux archéologiques (bois fossiles et objets anciens) et de développer des outils de traçabilité susceptibles d'intéresser l'industrie. Ils ont démontrés que ce type de marqueurs peut être employé avec succès sur des éléments en bois dont le vieillissement et/ou le façonnage ont altéré l'ADN. Les marqueurs et les méthodes de purification et d'analyse de l'ADN ont été longuement optimisés au cours des travaux ultérieurs menés dans le cadre du projet de recherche Oaktrack mené par l'INRA (financement ANR visant au développement rapide de produits et de service opérationnels) entre 2011 et 2014.

Ces variations de l'ADN chloroplastiques se retrouvent de la même façon chez toutes les espèces de chênes d'une même population (une même forêt). Elles ne peuvent donc rien pour différencier les espèces. De plus, la taille physique limitée de l'ADN chloroplastique en limite fortement le contenu informatif. Il ne permet donc pas de traiter des questions plus diverses. En particulier, puisque chez le chêne l'ADN chloroplastique est hérité par la mère, les descendants d'une même lignée maternelle (même mère et/ou grand-mère etc..) mais de pères différents ne peuvent pas être différenciés par l'ADN chloroplastique.

La distinction des espèces

Ainsi pour la distinction des espèces, le recours à l'ADN nucléaire a été nécessaire. Il en est de même pour les études en cours portant sur la description

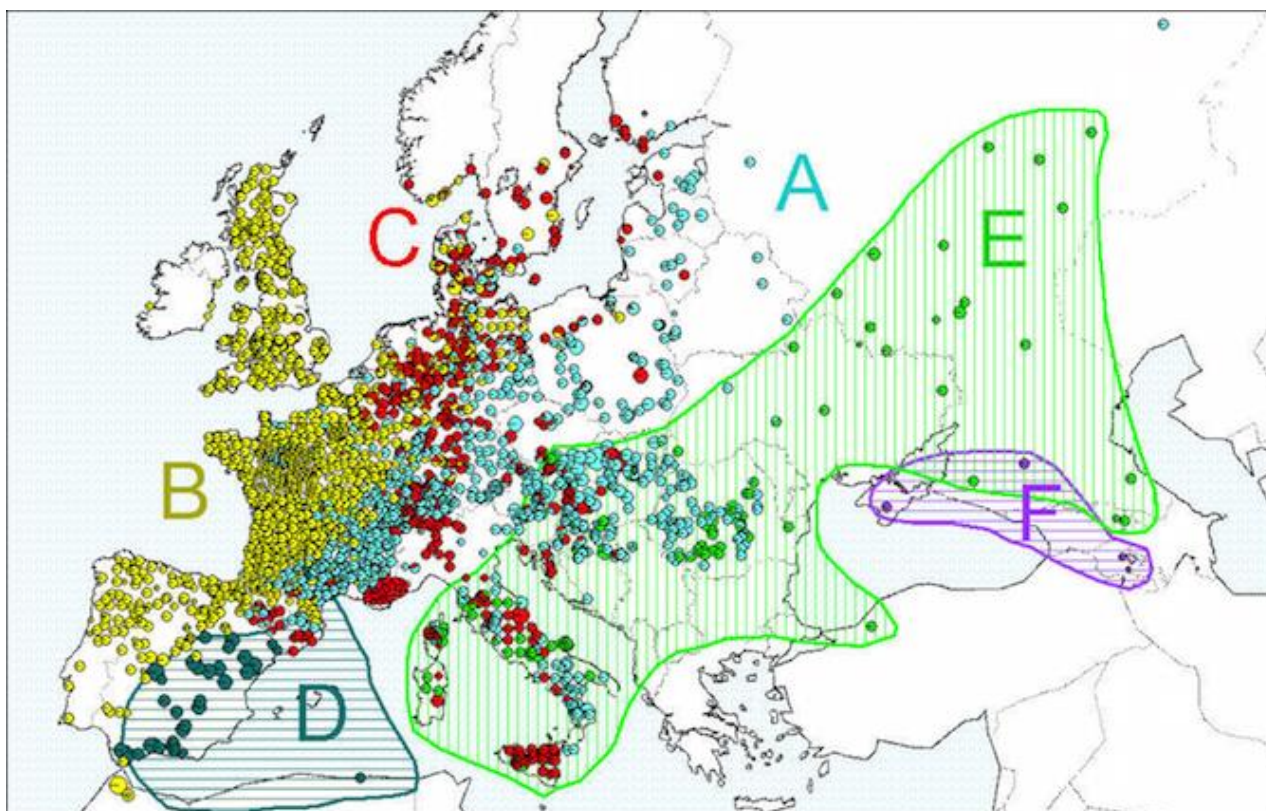


Figure 1: Carte de distribution des 6 grandes familles (A à F) de variants ADN chloroplastiques des chênes européens établie lors des premiers grands projets de recherche sur ce thème (tiré de Kremer 2015). Chaque famille regroupe plusieurs variants.

fine de l'adaptation du chêne à l'environnement au sens large (station, climat, maladies, insectes, stress divers...) et la production de la vaste gamme de molécules biologiques développées par l'arbre au cours de sa vie (avec parmi elles les substances, aromatiques ou autres, intéressantes pour de nombreuses applications industrielles).

La mise au point de marqueurs ADN pour aider à la différenciation des espèces de chêne a été tentée pendant plus de 15 ans avant de déboucher sur un outil performant mis au point lui aussi par l'INRA dans le cadre du projet Oaktrack financé par l'ANR.

La différenciation des espèces n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît, en particulier en l'absence des feuilles et/ou des fruits, au point que le personnel formé à leur reconnaissance sur le terrain doit régulièrement suivre une remise à niveau (Ducouso, communication personnelle).

L'application pratique des outils ADN

Les outils développés à l'issue du projet Oaktrack ont été protégés par l'INRA (Guichoux et Petit 2014) qui a confié en exclusivité à FCBA leur mise à disposition aux entreprises du secteur forêt-bois et de la viticulture.

L'offre de service de FCBA est déployée dans l'optique de permettre en priorité aux entreprises de

compléter en interne leurs démarches de R&D et de traçabilité.

Après la mise en œuvre de notre méthodologie spécifique pour préparer l'ADN, les marqueurs sont "photocopiés" sélectivement par PCR (cf GNIS 2007) et révélés à l'aide d'un équipement fonctionnant sur la base de la spectrométrie de masse à haute résolution (Sequenom MassArray, plateforme Xyloforest Xylomic) permettant de différencier par leur poids les fragments d'ADN différant par une seule base ("lettres" constituant le "texte" de l'ADN).

Le diagnostic de l'espèce de chêne est actuellement réalisable avec une efficacité satisfaisante sur des arbres vivants de tous âges ou sur du bois coupé depuis moins de 6 mois sans avoir subi de séchage forcé. Le résultat se présente sous la forme du diagnostic (chêne sessile, pédonculé ou hybride) assorti d'un niveau de probabilité (qui permet par exemple d'évaluer à quel point un hybride est proche du sessile ou du pédonculé, figure 2). Le diagnostic est posé au niveau individuel (gland, plantule, arbre, grume ou pièce de bois frais).

L'analyse portant sur l'origine consiste à comparer les variants de l'ADN chloroplastique retrouvés dans un lot de bois (ou de glands, plantules ou arbres) à ceux décrits dans notre base de données pour la forêt ou la région géographique (qui ne correspond pas forcément à un zonage administratif mais à la

zone géographique vis-à-vis de laquelle il y a une question ou une présomption, soit une zone géographique de taille variant typiquement entre celle d'une forêt et celle d'une moitié de l'Europe - Est ou Ouest). Il faut analyser plusieurs échantillons individuels (plusieurs plants, arbres ou merrains par exemple) par lots, aussi bien pour pouvoir détecter plusieurs variants ADN (il faut au minimum un individu pour chacun des variants qui seraient connus pour la région en question et au strict minimum un individu supplémentaire porteur d'un éventuel autre variant qui ne collerait pas avec la région attendue) mais aussi pour assurer une représentation minimale du lot complet et compenser la dégradation avancée (de l'ADN) de certains échantillons qui en rendrait impossible l'analyse. A la lumière de l'expérience combinée de l'INRA et de FCBA, un effectif minimal standard a été fixé à 30 échantillons par lot (donc par exemple 30 plants forestiers ou 30 merrains par lot). Ce nombre est susceptible d'être augmenté en fonction de la situation et de la question posée. Le résultat se présente sous la forme d'une réponse en termes d'ADN à la question posée par lot : les variants ADN trouvés sont-ils ou non compatibles avec l'origine attendue? Le cas échéant, on peut compléter la réponse en précisant de quelles zones géographiques alternatives le lot peut ou ne peut pas être originaire.

DIAGNOSTIC	Probabilité	
	Sessile	Pédonculé
Sessile	0,999	0,001
	0,998	0,002
	0,995	0,005
	0,997	0,003
	0,996	0,004
	0,899	0,101
	0,974	0,026
	0,942	0,058
	0,967	0,033
	0,937	0,063
Hybrides	0,503	0,497
	0,297	0,703
	0,380	0,620
	0,565	0,435
Pédonculé	0,015	0,985
	0,082	0,918
	0,113	0,917
	0,034	0,966
	0,041	0,959
	0,029	0,971
	0,068	0,932
	0,079	0,921
	0,073	0,927
	0,041	0,959

Figure 2: Exemple de résultat (données fictives) du diagnostic ADN sur l'espèce (cas de la différenciation sessile/pédonculé). Une probabilité d'appartenance à l'une et à l'autre espèce est donnée pour chaque échantillon individuel.

Notre démarche d'amélioration continue, y compris par la mise sur pied de projets de recherche complémentaire, mène à une évolution constante des outils et méthodes afin de couvrir une gamme de situations plus étendue répondant aux besoins de la filière forêt-bois, de la graine au produit fini. Ces améliorations consistent en priorité à valider nos outils sur des situations plus difficiles, c'est-à-dire du bois à un stade de séchage et/ou de transformation plus avancé.

Par ailleurs l'utilisation de ces outils ne peut se faire que dans le cadre d'une démarche prenant en compte la situation du demandeur et les questions qu'il veut traiter.

Conclusions

Un procédé performant d'analyse de l'ADN est mis en œuvre en routine par FCBA au service de ses clients pour déterminer l'espèce de chêne à laquelle appartient une graine, un plant, un arbre vivant ou récemment abattu ou encore une grume (éventuellement un morceau d'aubier suffisamment épais) coupé depuis moins de 6 mois et n'ayant pas subi de séchage artificiel. Dans son principe, l'analyse peut être faite sur un échantillon unique (un seul arbre ou un seul billon par exemple) mais un minimum de commande de 1500 euros HT (correspondant à l'analyse de 30 échantillons) est demandé. Des recherches complémentaires nous permettront à l'avenir d'étendre ce diagnostic à d'autres espèces de chêne que le sessile et le pédonculé (et leurs hybrides).

Un autre procédé basé sur des parties plus persistantes de l'ADN du bois permet de diagnostiquer l'origine géographique (la provenance au sens génétique) sur du bois plus âgé (tout aussi bien que sur des glands, des plants forestiers ou des arbres vivants, du bois frais...) mais le principe même de ce diagnostic impose de travailler sur plusieurs échantillons (30 en standard) pour chaque lot (de plants, de grumes, de pièces de merrains ou autres pièces de bois). Ce même procédé est valable pour toutes les espèces de chêne.

Ce procédé peut fonctionner sur tonneau si on peut prélever des fragments de bois n'ayant pas subi de chauffe trop importante (au cœur des douelles par exemple). Des recherches complémentaires sont mise en œuvre pour lever progressivement cette limitation.

Bibliographie

1. Bakour, R. (2003) Influence de l'espèce et de la provenance de deux principaux chênes français (*Quercus robur* L.; *Quercus petraea* Liebl.) sur la structure anatomique et les propriétés physiques du bois de merrain. Thèse de doctorat, Paris, ENGREF, 250 pages.
2. GNIS (2007) L'amplification de fragments d'ADN in Vitro : la PCR. Document pédagogique en ligne <http://tinyurl.com/oks5k53>
3. Guichoux E, Petit RJ (2014), Déclaration d'invention (n° DI-RV-13-00566) auprès de l'INPI : Méthode de traçabilité géographique des bois de chêne.
4. Husson H. et Pardon P. (2002) Importance des extractibles du bois avec les perspectives de traçabilité des chênes pour la tonnellerie et la viticulture: Les nouvelles technologies au service de la tradition. Revue Française d'œnologie, mai/juin 2002 - N° 194, pages 26 à 32
5. Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, Dumolin-Lapègue S, Fineschi S, Finkeldey R. (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. Forest Ecology and Management. 156:1:5-26.
6. Kremer A. (2015) Migration et colonisation des chênes au cours des réchauffements climatiques. Jardins de France 634: 38-40 <http://tinyurl.com/olem6qo>
7. Kremer A., Petit R. and Ducouso A. (2002) Biologie évolutive et diversité génétique des chênes sessile et pédonculé. Revue Forestière Française 54: 111-130 en accès libre : <http://tinyurl.com/o5s2qr3>
8. Michel J. (2012) Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins (application du procédé oakscan). Université Bordeaux 2, Bordeaux, 252 pages.
9. Prida A., Boulet J.-C., Ducouso A., Nepveu G. et Puech J.-L. (2006) Effect of species and ecological conditions on ellagitannin content in oak wood from an even-aged and mixed stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl. Annals of forest science 63: 415-424
10. Prida A., Ducouso A., Petit R. m. J., Nepveu G. et Puech J.-L. (2007) Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: Strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. Annals of forest science 64: 313-320
11. Prida, A. (2015) Cahier technique: Contribution du fut de chene au profil tannique des vins. Revue française d'œnologie 269: 2-5 http://www.oenologuesdefrance.fr/gestion/fichiers_publications/545_article_541..pdf

Pour en savoir plus...

Label bois France garantie par FCBA :

<http://tinyurl.com/oo5eebt>

Le label CTB fut de tradition française :

<http://tinyurl.com/pbn5gk>

Projet Oaktrack :

<http://tinyurl.com/p64ny3r>

Contacts :

Luc HARVENGT

Responsable scientifique biotechnologie

Karine DURANDEAU

Ingénieur recherche

Tél. 05 56 79 95 00

sudouest@fcba.fr

FCBA – Pôle biotechnologie et Sylviculture Avancée
Campus Forêt de Pierroton.
71 route d'Arcachon
33610 CESTAS



INSTITUT TECHNOLOGIQUE

Oak DNA testing to optimize processes and traceability of the cooperage, forest nursery and forest management activities

Among other criteria, the geographic provenance and the species to which trees belongs determines the wood properties and its quality towards various uses. Diagnostic tools based on DNA used exclusively by FCBA to confirm documentary traceability of the geographical origin of oak wood and performances of tree seedlings on the one hand and to differentiate sessile from pedonculate oak on the other hand.

Introduction

Wine quality is determined by the properties of grapes and yeast as well as winemaking conditions. The contact of the wine with the wood in all its forms (tanks, barrels and other objects of various shapes and sizes -the "oenological products": wood powder, chips, planks...) brings the natural chemical compounds that influence fermentation, oxygenation and aromas.

The aromatic compounds provided by the wood are transformed during winemaking and are themselves strongly influenced by the characteristics of the wood like the grain (width of the tree growth rings). Together with other wood porosity parameters, the polyphenolic content of both wood and grape determine the oxygen consumption contributing to winemaking (Husson and Pardon 2002).

Like grapevines, oak trees react to their environment and climate according to their abilities and adaptations largely determined by genetics, which result in their growth pattern and ultimately the characteristics of their wood.



Genetics and DNA

The genetics of each oak tree is the heredity transmitted by its parents. This heredity is unique to each individual tree because the tree is a unique combination of the genes from its parents. But the tree's heredity is largely defined by the species and the population it belongs to..

The two main European oaks species are sessile (*Quercus petraea*) and pedonculate oak (*Quercus robur*). The second is much more demanding in terms of soil, light and water availability. While they are simultaneously present in most French forests, the two species therefore react differently to climate fluctuations. Growth and therefore including the grain of wood is influenced by their stress levels resulting from environmental variations (Bakour, 2003).

Successive studies have shown that the average chemical composition of wood also differs between the two species, particularly as regards to the content of aromatic molecules (Husson and Pardon 2002; Prida et al. 2006 and 2007).

Each forest location corresponds to a particular combination of the environmental parameters, a particular forest management practice and a

particular oak population with its genetics and proportion of each species.

So, oak tree species and geographical origin are the information that could sum up the characteristics we could expect of its wood and their impact on wine (Michel, 2012, Prida 2015).

The same information is important for seed merchants and nurseries as well as for their clients. Their customers and regulations are requiring this information to be mentioned during transactions.

This information is completely linked to the gene, they may be decrypted by the DNA analysis.

Several DNA types for different uses

Plants are containing three kinds of DNA. The first one is the core DNA (called nuclear DNA, constituting the chromosomes), which is inherited from both parents is the most complex (and therefore the richest in information, its "DNA text" is very "long") but present in a low copy number in cells of the plant. The other two DNA types are far shorter (and therefore less informative) but present in multiple copies in each cell. This is the DNA of the chloroplast (a small compartment within the plant cell where photosynthesis occurs) and mitochondrial DNA (another small compartment of the cell where energy is produced through respiration in animal and plant cells).

The two latter types of DNA are present in many copies in each plant cell. We can therefore get some copies intact in the wood has undergone ageing, drying and other treatments that affect DNA in general, gradually causing physical degradation and compromising the recovery of any piece of useful nuclear DNA.

Besides the physical DNA damage, wood maturation taking place inside the tree when alive and after its death is also accompanied by the accumulation of organic compounds that hinder the recovery and analysis of DNA. This process is still worsening as a consequence of wood processing.

The heredity (transmission by parents) of chloroplasts and mitochondria varies among plant species. In oaks and most hardwoods, chloroplasts as well as mitochondria are inherited from the mother. They are both a reflection of the local population. This reflection is insensitive to pollen intervention (paternal contribution to seedling heredity) actually but rarely transported over long distances. Various technical reasons (related in particular to the stability and the ease in isolating DNA from wood and plant tissues) explain that the oak population studies have primarily been based on chloroplast DNA.

Scientific investigation on oak provenances

The Biogeco unit of INRA Bordeaux began to study this subject in the late 1980s through DNA, pollen and field studies. An extensive collaborative partnership with European research teams lead to the early 2000s Atlas of chloroplast DNA variations found in more than 3000 oak forest (Figure 1). These results were remarkably synthesized in French (Kremer et al. 2002, corresponding to the scientific article by Petit et al. 2002) and more recently popularized by the same author (Kremer 2015). Further work in the early 2000s addressed the issue of traceability of wooden objects in particular to contribute to archaeological investigations (fossil wood and antiques) and to the development of traceability tools of industrial interest. They have shown that this type of markers can be successfully used on wooden items of which DNA has been damaged by aging and/or processing. The markers and methods of DNA purification and analysis have been extensively optimized in further work under the Oaktrack research project led by INRA (ANR funding for the rapid development of products and operational services) from 2011 to 2014.

Variations in the chloroplast DNA are found in the same way in all species of oak from the same population (same forest). They therefore can do nothing to differentiate species. Moreover, the reduced physical size of chloroplast DNA limits its information content, precluding its ability to help resolving complicated matters. Since the oak chloroplast DNA is inherited through the mother, sibs of the same maternal line (same mother and / or grandmother etc...) cannot be differentiated by chloroplast DNA, even in the case of those originating from different fathers.

Distinguishing oak species

So for the distinction of species, the use of nuclear DNA was necessary. It is also the case for ongoing studies of the detailed description of the oak adaptation to the environment (soil, climate, diseases, insects, various stresses ...) and production of wide range of biological molecules developed by the tree during its life (with among them aromatic or other substances of industrial interest).

The development of DNA markers to aid in the differentiation of oak species has been attempted for more than 15 years before leading to an efficient tool developed by INRA in the frame of the Oaktrack project funded by ANR (the French national agency for scientific research).

The differentiation of species is not as simple as it seems, especially in the absence of leaves and / or fruits, so that the staff trained in their reconnaissance in the field must very regularly attend a refresher training session (Ducouso, personal communication).

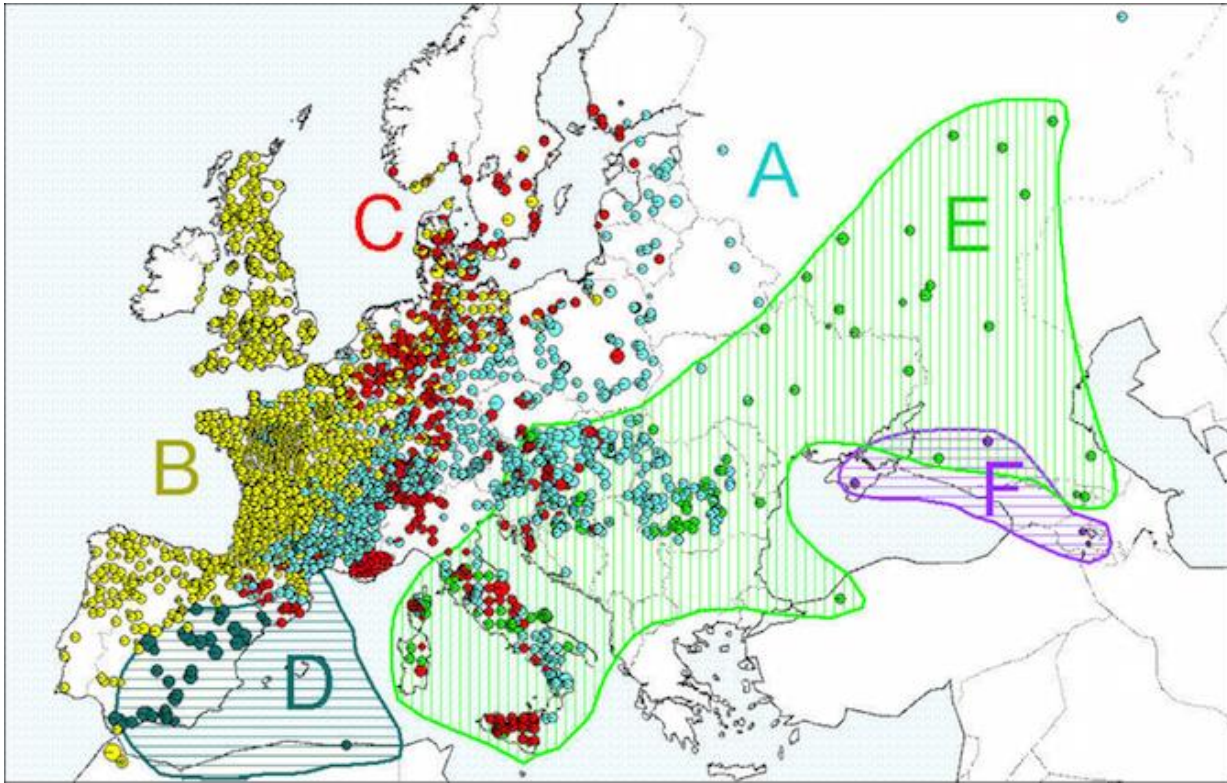


Figure 1: Distribution map of 6 large families (A to F) of European oak chloroplast DNA variants established during the first major research projects on this subject (from Kremer 2015). Each family comprises several to many variants.

Practical use of the DNA based tools

The tools of current practical interest were developed during the Oaktrack research project and patented by INRA (Guichoux and Petit 2014). FCBA negotiated an exclusive license allowing to make them available to the forest, cooperage and winemaking actors.

The FCBA service offer is deployed in order to enable its customers to complement their in-house R & D and traceability processes.

After the sample processing using our specific DNA purification methodology, markers are selectively "copied" through PCR (see GNIS 2007) and investigated with the help of a device operating on the basis of high resolution mass spectrometry. This instrument (the Sequenom MassARRAY of the Xyloforest Xylomic platform) allows to differentiate DNA fragments differing by a single base (bases are "letters" making up the DNA "text").

The oak species diagnosis is currently done efficiently from samples taken of living trees whatever their age (from young seedlings to old heritage trees) as well as wood samples up to 6 months from tree cut (only for wood having not experienced forced drying). The result is in the form of diagnosis (sessile oak, pedunculate or hybrid) together with a probability level (which allows for example to assess how a hybrid is close to the sessile or pedunculate, Figure 2). The diagnosis is made at an individual level (acorn, seedling, tree, log or piece of fresh wood).

The diagnosis on the geographical origin consists in the comparison of chloroplast DNA variants found in a lot or batch of wood pieces (or acorns, seedlings or trees) to those described in our database for the forest or the geographical area (which does not necessarily correspond to an administrative zoning but to the geographical area vis-à-vis which there is a question or a presumption of origin). The size of this area can typically range from that of a small forest to that of half Europe). We must analyze several individual samples (many plants, trees or dowel for example) per batch, both to be able to detect several DNA variants (you need at least one individual sample for each of the variants which are known for the region in question as well as for each additional variant that does not stick with the expected area) but also to ensure a minimum representation of the entire lot and compensate for the advanced (DNA) degradation of some samples that would make it unsuitable for analysis. In the light of the combined experience of INRA and FCBA, a standard minimum number was set at 30 samples per batch (so for example 30 seedlings or 30 staves per lot). This number may be increased depending on the situation and the question asked. The resulting answer is typically expressed as follows: the DNA variants found are compatible or not with the expected background. If necessary, the response can be further developed specifying what alternatives geographic area the questioned wood or seedlot may or may not be native from. Of course, young tree planted from non-local acorns are detected as aliens.

Our approach to continuous improvement, including the development of complementary research

projects, leads to a constantly evolution of the tools and methods in order to cover a wider range of situations that meet the needs of the forest industry, from the seed to end product. This is including attempts to adapt and validate our tools in ever more difficult situations i.e. wood at a more advanced stage of drying and / or processing.

Furthermore, the use of the available tools a particular time can only take place taking into account the peculiarities of client's activity and the issues he wants to address.

Conclusion

An efficient method of DNA analysis is routinely used by FCBA to identify the oak species corresponding to a seed, a plant, or a live tree recently felled or a log (possibly a piece of sapwood thick enough) cut for less than 6 months and not subjected to artificial drying. In principle, the analysis can be done on a single sample (a single tree or one timber for example) with a minimum order amount of 1500 euros (corresponding to the analysis of 30 samples, taxes not included) requested. Further research will help us to extend the diagnosis to other oak species than sessile and pedunculata (and their hybrids).

Another method based on more persistent parts of the wood DNA is used to diagnose the geographical origin (in the genetic sense) on older wood (as well as easier cases like fresh wood, standing trees, seedlings or acorns) but the principle of this diagnosis requires to work on several samples (30 taken as the standard) for each lot (of plants, logs, dowels or other wood pieces). This same diagnosis method is valid for all species of oak.

This process can be applied to the case of a barrel if we can find and collect wood fragments not subjected to extensive heating. Further research is pursued to gradually relieve this limitation.

References

1. Bakour, R. (2003) Influence de l'espèce et de la provenance de deux principaux chênes français (*Quercus robur* L.; *Quercus petraea* Liebl.) sur la structure anatomique et les propriétés physiques du bois de merrain. Thèse de doctorat, Paris, ENGREF, 250 pages.
2. GNIS (2007) L'amplification de fragments d'ADN in Vitro : la PCR. Document pédagogique en ligne <http://tinyurl.com/oks5k53>
3. Guichoux E, Petit RJ (2014), Déclaration d'invention (n° DI-RV-13-00566) auprès de l'INPI : Méthode de traçabilité géographique des bois de chêne.
4. Husson H. et Pardon P. (2002) Importance des extractibles du bois avec les perspectives de traçabilité des chênes pour la tonnellerie et la viticulture: Les nouvelles technologies au service de la tradition. Revue Française d'œnologie, mai/juin 2002 - N° 194, pages 26 à 32

5. Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, Cottrell J, van Dam B, Deans JD, Dumolin-Lapègue S, Fineschi S, Finkeldey R. (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*. 156:1:5-26.
6. Kremer A. (2015) Migration et colonisation des chênes au cours des réchauffements climatiques. *Jardins de France* 634: 38-40
<http://tinyurl.com/olem6qo>
7. Kremer A., Petit R. and Ducouso A. (2002) Biologie évolutive et diversité génétique des chênes sessile et pédonculé. *Revue Forestière Française* 54: 111-130 en accès libre : <http://tinyurl.com/o5s2gr3>
8. Michel J. (2012) Classification et influences des polyphénols du bois de chêne sur la qualité sensorielle des vins (application du procédé oakscan). Université Bordeaux 2, Bordeaux, 252 pages.
9. Prida A., Boulet J.-C., Ducouso A., Nepveu G. et Puech J.-L. (2006) Effect of species and ecological conditions on ellagitannin content in oak wood from an even-aged and mixed stand of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* liebl. *Annals of forest science* 63: 415-424
10. Prida A., Ducouso A., Petit R. m. J., Nepveu G. et Puech J.-L. (2007) Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: Strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. *Annals of forest science* 64: 313-320
11. Prida, A. (2015) Cahier technique: Contribution du fut de chene au profil tannique des vins. *Revue française d'œnologie* 269: 2-5
http://www.oenologuesdefrance.fr/gestion/fichiers_publications/545_article_541..pdf

Further information...

Label bois France garantie par FCBA :
<http://tinyurl.com/oo5eebt>
Le label CTB fut de tradition française :
<http://tinyurl.com/pbn5glk>
The Oaktrack project :
<http://tinyurl.com/p64ny3r>

Contacts :

Luc HARVENGT

Responsable scientifique biotechnologie

Karine DURANDEAU

Ingénieur de recherche

Tél. +33(0)5 56 79 95 00
sudouest@fcba.fr

FCBA

Pôle biotechnologie et Sylviculture Avancée
Campus Forêt de Pierroton.
71 route d'Arcachon
33610 CESTAS

