



**HAL**  
open science

# Les modifications des règles de la recombinaison homologue chez les Brassica

Franz Boideau

► **To cite this version:**

Franz Boideau. Les modifications des règles de la recombinaison homologue chez les Brassica. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2022. Français. NNT : 2022NSARC161 . tel-04066322

**HAL Id: tel-04066322**

**<https://theses.hal.science/tel-04066322>**

Submitted on 12 Apr 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

## AGROCAMPUS OUEST

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : Génétique, génomique et bio-informatique

Par

**Franz BOIDEAU**

## **Les modifications des règles de la recombinaison homologue chez les *Brassica***

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13 Juin 2022

Unité de recherche : UMR 1349 – Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes (IGEPP)

Domaine de la motte au Vicomte, Le Rheu, France

Thèse N° : n° de série C-161 et n° d'ordre 2022-10

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Mathilde GRELON, Directrice de recherche, INRAE, IJPB (UMR 1318), Versailles  
Avraham A. LEVY, Professeur, Weizmann Institute of Science, Israël

### **Composition du Jury :**

Président : Maria MANZANARES-DAULEUX, Professeure, Institut Agro Rennes-Angers

Examineurs : Emmanuel GUIDERDONI, Chercheur, CIRAD-BIOS, Montpellier

Dir. de thèse : Anne-Marie CHEVRE, Directrice de recherche, INRAE, IGEPP (UMR 1349), Le Rheu

Co-dir. de thèse : Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN, Chargé de recherche, INRAE, IGEPP (UMR 1349), Le Rheu



*A ma mère*





## Epigraphe

I will only remind you that meiosis is still a potential battleground where dead hypothesis litter the field or rest uneasily in shallow graves, ready to emerge and haunt any conscientious scientist who tries to consolidate a victory for any particular thesis. [...] I dare say it is unlikely that any of these old ghosts can be laid to rest forever.

– J. Herbert TAYLOR. 1974



## Remerciements

Le temps que j'ai passé au sein de l'IGEPP a été une expérience enrichissante énorme tant sur le plan personnel que sur le plan scientifique, et cela, grâce aux nombreuses rencontres que j'ai pu faire. Ainsi, je tiens à remercier chaleureusement les nombreuses personnes qui m'ont accompagné pendant ces trois années de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse. Anne-Marie (Chèvre) et Mathieu (Rousseau-Gueutin), vous avez accepté de me prendre pour un stage de M1 en 2017, j'étais déjà intéressé par les triploïdes, la méiose et un peu fou. Je n'oublierai jamais notre première réunion où vous avez fait le tour des programmes avec Olivier et Alexandre pour me donner un sujet de stage. Par la suite, vous m'avez fait confiance pour faire une thèse avec vous et je dois avouer que j'en suis fier et que je me suis énormément amusé scientifiquement et personnellement. Vous avez su me donner avec un juste équilibre des directions à suivre et la liberté de suivre mes idées. Vous avez été à l'écoute de mes états d'âme, vous avez su me conseiller et me donner confiance en moi, vous étiez là quand j'en avais besoin et vous aviez la patience de me suivre et de m'orienter. Même quand je voulais envoyer des triploïdes dans l'espace. Merci pour toutes ces pauses « chta clope » qui ont porté sur mes résultats, la science mais pas que et les délires de plans de croisements invraisemblables. Vous êtes des encadrants en or, vous avez même tous les deux bien dépassé votre rôle d'encadrant, vous êtes bien plus.

Je remercie l'ensemble des membres de notre équipe (BP puis DEBI), sans qui tout ce travail n'aurait pu aller aussi loin et pour la bonne ambiance familiale. Un grand merci à Cyril Falentin, Gwenaëlle Deniot, Maryse Lodé-Taburel, Frédérique Eber, Jérôme Morice et Gwenn Trotoux. Vous m'avez apporté vos connaissances, votre aide et votre soutien pendant cette thèse. Je remercie en particulier la plateforme cyto, (Olivier Coriton et Virginie Huteau). Grâce à vous deux, j'ai été capable de voir plein de beaux chromosomes, plus ou moins tordus, et j'ai également disposé d'une ressource quasi illimitée en café, en bons moments, en bonne humeur en délires et en soutien. Je remercie Marie Gilet, pour le travail colossal réalisé sur mon matériel végétal et les superbes discussions que nous avons partagé pendant les journées de croisements ainsi que dans ton bureau avec Christine Lariagon, quand je venais (souvent) l'embêter pour de l'azote ou que je voulais juste passer un bon moment avec vous deux. Je remercie également Julien Boutte et Gautier Richard pour m'avoir initié à la bioinfo,

pour m'avoir passé une partie de leur passion pour les lignes de codes et les bons moments passés ensemble. Merci à Anael Brunet et Coleen Tanguy, les deux stagiaires que j'ai eu la chance de co-encadrer pendant ma thèse. Elles ont réalisé un travail remarquable sur mon projet de thèse et mon beaucoup appris humainement.

Plus généralement je tiens à remercier toutes les personnes l'IGEPP, avec qui j'ai pu discuter et passer de bons moments. Merci à Pascale Le Nevé pour la gestion administrative de ma thèse et à Sophie Collet pour nos OM, et sa confiance vis-à-vis d'Albert. Merci à l'équipe serre pour l'entretien de mes plantes et plus particulièrement à Patrick Rolland, qui a su me convaincre de jeter mes vieilleries. Je tiens à remercier les membres du bureau du fond (LBDF), anciens (Thanina Azibi, Grégoire Bianchetti, Erwan Corlouer, Julie Ferreira de Carvalho) et encore présents (Anani Missinou, Youssef Bouargalne, Mathilde Petitpas, Marianne Laurençon), pour les discussions (scientifiques et pas que), la bonne ambiance et nos sorties / balades. Merci à la team pause-café, composée du LBDF et des CDD et stagiaires pour les bons moments partagés. Je remercie également toutes les personnes qui ont accepté de me covoiturer pour diverses occasions, en particulier Anne-Marie, Youssef, Loeiz et Julie. Un grand merci à Youssef pour toutes les sorties chez Bernard, Fabrice et Martine, ainsi que nos nombreuses discussions sur tout et rien, surtout rien et l'ensemble de nos délires. Un énorme merci à Loeiz Maillet, nous avons commencé à peu près ensemble à l'IGEPP. Je peux donc dire que nous avons partagé de nombreux moments ensemble. Tu as su me soutenir pendant mes moments difficiles de carto et tu m'as énormément aidé pour simplifier ce travail colossal. Tu as su également être un excellent compagnon de blagues et ami.

Je tiens à remercier les personnes extérieures à l'IGEPP, en particulier les membres de mon comité de thèse, Matthieu Falque, Daniel Grimanelli et Eric Jenczewski, pour vos idées et nos discussions scientifiques qui m'ont permis d'orienter une partie de ce travail de thèse. Je remercie également les membres de mon jury de thèse, composé de Mathilde Grelon, Avraham Levy, Maria Manzanara-Dauleux (IGEPP) et d'Emmanuel Guiderdoni, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie la plateforme GENTYANE, pour leur conseils et bienveillance quant à l'extraction d'ADN de mes plantes et au génotypage d'une partie de mes échantillons. Je remercie également Sébastien Erhel, responsable du Fonds Ancien Sciences et Philosophie de la bibliothèque universitaire de Rennes 1. Notamment pour sa patience envers mon intérêt pour l'ouvrage de Mr Sageret (1826). Merci à Stéphanie Le Bras, qui en L2 a su me donner envie de creuser scientifiquement une question simple que j'ai posé à la fin d'un TD, ce qui m'a finalement amené à contacter Anne-Marie puis à faire cette

thèse. Je souhaiterais également remercier deux doctorantes qui sont venues en « stage » à l'IGEPP, merci Andrea Botero-Ramirez pour les discussions *in english* et cette belle balade au mont St Michel et merci Marie Casado pour ta bonne humeur et ton énergie débordante, ainsi que pour cette superbe aprèm pancake.

Pour finir, je tiens à remercier mes proches, ma famille et mes amis pour leur soutien au cours de ces trois années et leur compréhension. En particulier Katia, Erika, Tomy, Vince, Jak, Vincent, Linh Chi, Thomas et Céline. J'ai une pensée particulière pour ma mère, qui a su me donner la force d'avancer, de continuer et d'aller aussi loin. J'en suis là grâce à elle et elle a été auprès de moi à chaque instant. Je lui dédie ainsi cette thèse.



## Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	4
I.    La méiose et la recombinaison méiotique.....	5
I.A. Description cytologique des différents stades de méiose.....	5
I.B. Description moléculaire des différents stades de méiose.....	10
I.B.1. Les cassures double brin de l'ADN.....	10
I.B.2. Les non-crossovers.....	13
I.B.3. Les crossovers.....	14
I.B.3.a. Les COs de classe I.....	14
I.B.3.b. Les COs de classe II.....	15
I.B.3.c. Autres voies de formation des COs.....	15
I.B.4. Interférence.....	15
I.B.5. Boucles de rétrocontrôle et checkpoints de la méiose.....	17
II.   Outils d'étude de la recombinaison méiotique.....	18
II.A. Outils d'étude directs.....	18
II.A.1. Nodules de recombinaison tardif.....	18
II.A.2. Immunomarquage des COs.....	18
II.A.3. Dénombrement des chiasmata.....	19
II.B. Outils d'étude indirects.....	20
II.B.1. Cartographie génétique.....	20
II.B.2. Suivi des échanges homologues en C-banding.....	21
II.B.3. Suivi des échanges homologues en peinture chromosomique oligo-FISH.....	21
II.B.4. Pollen-typing.....	22
II.B.5. Le système DART (Double Antibiotic Resistance Technique)..	23
II.B.6. Fluorescent tagged lines (FTL) .....	23
II.B.6.a. Seed-specific FTL.....	23
II.B.6.b. Pollen-specific FTL.....	24
II.B.7. Approches de biochimie pour étudier la recombinaison.....	24



III.	Régulation de la recombinaison.....	25
	III.A. Contrôle de la recombinaison.....	25
	III.A.1. Fréquence.....	25
	III.A.2. Distribution.....	27
	III.A.3. Régulation de la recombinaison chez les polyploïdes.....	34
	III.A.3.a. La polyploïdie.....	34
	III.A.3.b. Autopolyploïdes.....	34
	III.A.3.c. Allopolyploïdes.....	35
	III.B. Modification de la recombinaison homologue.....	36
	III.B.1. Modification de la fréquence de recombinaison.....	36
	III.B.1.a. Facteurs externes.....	36
	III.B.1.b. Age des plantes.....	37
	III.B.1.c. Allèles et dosage de certains gènes.....	37
	III.B.1.d. Polyploïdie.....	40
	III.B.2. Modification de la distribution de la recombinaison.....	41
	III.B.2.a. Marques histones.....	41
	III.B.2.b. La voie de neddylation.....	41
	III.B.2.c. La kinésine PSS1.....	42
	III.B.2.d. Polymorphisme SNP et hétérozygotie.....	42
	III.B.2.e. Les variations structurales.....	43
	III.B.3. Modification simultanée de la fréquence et de la distribution...44	
	III.B.3.a. Température.....	44
	III.B.3.b. Gènes de méiose.....	45
	III.B.3.c. Méthylation de l'ADN.....	47
IV.	Modèle Brassica.....	48
	IV.A. Contexte socio-économique.....	48
	IV.B. Origine du colza.....	48
	IV.C. Décryptage de l'origine de <i>Brassica rapa</i> et de <i>Brassica oleracea</i> .....	51
	IV.C.1. La navette <i>Brassica rapa</i> .....	51
	IV.C.2. Le chou <i>Brassica oleracea</i> .....	52

IV.D. Structure génomique.....	52
IV.E. Elargissement de la diversité génétique du colza par exploitation de croisements et de la recombinaison.....	55
IV.E.1. Les colzas resynthétisés.....	56
IV.E.2. Les hybrides allotriploïdes.....	56
V. Objectifs de la thèse.....	59
Chapitre II : Impact du niveau de ploïdie sur le profil de recombinaison chez les Brassica....	60
I. Introduction .....	61
II. A Modified meiotic recombination in <i>Brassica napus</i> largely improves its breeding efficiency – Publication in <i>Biology</i> (2021).....	62
III. Conclusion.....	79
Chapitre III : Impact du niveau de ploïdie et de l’hétérozygotie partielle sur le profil de recombinaison chez les <i>Brassica</i> .....	81
I. Introduction .....	82
II. Modifying on demand the homologous recombination landscape in <i>Brassica</i> by switching between allotriploidy and allotetraploidy – Manuscript in preparation.....	83
III. Conclusion.....	102
Chapitre IV : Impact de la méthylation de l’ADN et des variations structurales sur le profil de recombinaison du colza <i>Brassica napus</i> .....	103
I. Introduction.....	104
II. Epigenomic and structural events preclude recombination in <i>Brassica napus</i> – Publication in <i>New Phytologist</i> (2022).....	105
III. Conclusion.....	120
Chapitre V : Discussion générale.....	122
I. Modification du profil de recombinaison.....	123
I.A. Résultats .....	123
I.B Etudes des différentes étapes de la méiose qui pourraient être affectées...124	
I.B.1. Initiation de la méiose.....	124
I.B.2. Réparation des CDB en COs.....	124

I.B.3. La durée de la méiose.....	126
I.C. Régulations fonctionnelles.....	126
I.C.1. Impact possible des gènes impliqués dans la méiose.....	128
I.C.2. Impact possible des modifications de la structure de la chromatine.....	129
II. Modifications structurales .....	130
II.A. Résultats .....	130
II.B. Variations structurales .....	130
II.C. Augmentation de la recombinaison en seconde génération.....	131
III. Maintien, réversibilité du phénotype et exploitation en amélioration des plantes.....	132
III.A. Résultats.....	132
III.B. Perspectives pour l'utilisation de la voie triploïde grâce à la réversibilité du système .....	133
III.B.1. Exploitation de la voie AAC.....	133
III.B.2. Exploitation de la voie allotriploïde avec d'autres espèces de Brassica.....	134
III.B.3. Autotriploïdes <i>Brassica</i> .....	136
III.B.4. Triploïdes avec des génomes distants .....	136
III.B.5. Exploitation chez d'autres espèces.....	136
Annexes .....	138
Une Machine à recombinaison chez les Brassica, <i>ASF</i> , Chèvre et al. 2020.....	141
Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in <i>Brassica rapa</i> . <i>Frontiers in Plant Science</i> , Boutte et al. 2020.....	142
Long-read assembly of the <i>Brassica napus</i> reference genome Darmor-bzh. <i>GigaScience</i> , Rousseau-Gueutin et al. 2020.....	143
Sequencing and chromosome-scale assembly of plant genome, <i>Brassica rapa</i> as a use case. <i>Biology</i> , Istace et al. 2021 .....	144
Références bibliographiques.....	145

## **Introduction générale**



## Introduction générale

L'amélioration variétale a pour objectif de générer de nouvelles variétés capables de maintenir un rendement sous les nouvelles contraintes biotiques et abiotiques. L'outil principal utilisé en amélioration variétale est la recombinaison méiotique. Elle permet de brasser la diversité génétique à chaque génération via la génération de nouvelles combinaison alléliques. Ce processus est partagé par la majorité des organismes eucaryotes ayant un mode de reproduction sexuée. Cependant, ce processus est très régulé en termes de fréquence et de distribution. En effet, rarement plus de trois événements de recombinaison ont lieu par paire de chromosomes homologues (indépendamment de leur taille) et ces événements ont lieu principalement à l'extrémité des chromosomes. Du fait de cette régulation, le brassage génétique est limité, ce qui représente un frein à l'amélioration variétale. Il est donc important de trouver des moyens pour modifier ces régulations de la recombinaison méiotique afin de brasser plus efficacement la diversité génétique.

Chez les *Brassica*, les allotriploïdes AAC ( $2n = 3x = 29$ ), issus du croisement entre le colza *Brassica napus* (AACC,  $2n = 4x = 38$ ) et l'un de ses progéniteur diploïde la navette *Brassica rapa* (AA,  $2n = 2x = 20$ ), présentent une modification du profil de recombinaison intéressant vis-à-vis de cette problématique. En effet, ces hybrides possèdent une augmentation de la fréquence de crossovers (COs) qui est associée à une modification de la distribution de la recombinaison, avec la présence de COs dans les régions habituellement froide de la recombinaison que sont les régions péri-centromériques. Ces résultats ont été obtenus en comparant un diploïde AA et un allotriploïde AAC et offrent des perspectives intéressantes pour l'amélioration variétale, l'augmentation de fréquence de recombinaison permettant un brassage plus efficace de la diversité génétique et la présence de COs dans les régions proches des centromères permettant d'exploiter de la diversité auparavant inaccessible. Cependant, la comparaison du profil de recombinaison entre un allotriploïde AAC et un allotétraploïde de type colza (AACC) reste à déterminer, ainsi que le possible maintien ou la réversibilité de ce phénotype de recombinaison dans les générations suivantes de l'allotriploïde AAC. De plus, afin de comprendre les processus modifiés chez les allotriploïdes AAC il est important de connaître les éléments régulant le profil de recombinaison chez le colza.



Dans ce contexte nous avons cherché au cours de cette thèse à apporter des éléments de réponse à ces différentes questions en étudiant le profil de recombinaison d'hybrides *Brassica* de différents niveaux de ploïdie, de première ou de seconde génération et enfin l'impact de la méthylation de l'ADN et des variations structurales sur le profil de la recombinaison chez le colza.

Avant de présenter nos résultats nous commencerons par une synthèse bibliographique qui reprendra d'abord les connaissances actuelles concernant le déroulement de la méiose et les mécanismes gouvernant la recombinaison méiotique. Ensuite, nous présenterons les méthodes d'étude de la recombinaison puis les moyens dont nous disposons actuellement pour modifier cette dernière.

Dans le second chapitre, nous présenterons nos résultats sur la comparaison du profil de recombinaison de trois niveaux de ploïdie (2x vs 3x vs 4x). Ces résultats nous ont permis de déterminer que le niveau de ploïdie intermédiaire AAC était responsable des modifications de ce profil.

Au cours du troisième chapitre, nous exposerons nos résultats portant sur le maintien et la réversibilité du profil de recombinaison des hybrides AAC. En comparant des hybrides de première et seconde génération, nous avons été capables de démontrer qu'en maintenant la structure AAC il est possible de maintenir les modifications du profil de recombinaison, tandis qu'un retour à une structure AACC permet de retrouver un profil de recombinaison similaire à un colza.

Au sein du quatrième chapitre nous présenterons les résultats que nous avons obtenus sur les facteurs qui régulent le profil de recombinaison chez le colza, en particulier ceux qui préviennent la formation de COs, tels que la méthylation de l'ADN et les variations structurales.

Dans la dernière partie nous discuterons de l'apport de l'ensemble de nos résultats au regard de la recombinaison méiotique et de l'amélioration variétale.





## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**



## Chapitre I : Synthèse bibliographique

### **I. La méiose et la recombinaison méiotique**

La méiose est une division cellulaire spécialisée qui correspond à un seul cycle de réplication de l'ADN, suivi par deux divisions successives du matériel génétique, permettant ainsi de produire depuis une cellule progénitrice diploïde des gamètes possédant un nombre haploïde de chromosomes. Par la suite, la fécondation permettra de rétablir le niveau de ploïdie initial de l'espèce. Lors de ce processus particulier, un brassage génétique est réalisé via la recombinaison méiotique qui permet, par des échanges partiels et réciproques de chromatides non-sœurs entre les chromosomes homologues parentaux, de générer de nouvelles combinaisons alléliques. Nous présenterons ce chapitre sur la méiose et la recombinaison méiotique en trois sous-parties, portant sur : 1) sur la description cytologique des différents stades de méiose, 2) la description moléculaire des différents stades de méiose, puis 3) les outils permettant l'étude de la recombinaison.

#### I.A. Description cytologique des différents stades de méiose

La première description de la méiose (reconnue comme telle) a été réalisée par Edouard van Beneden (1883) chez le vers parasite *Ascaris megalocephala* (Hamoir 1992). Cette division cellulaire particulière est spécifique de la reproduction sexuée et est commune à de nombreux lignages eucaryotes. Elle serait apparue, il y a plus d'un milliard d'années, en amont du dernier ancêtre commun de tous les eucaryotes (Lenormand et al. 2016) et la machinerie moléculaire de la recombinaison serait, elle, issue de l'évolution de mécanismes primaires de réparation de l'ADN précédant ce dernier ancêtre commun (Egel & Penny, 2007).

Au début de cette division cellulaire particulière, la recombinaison méiotique intervient afin d'assurer la bonne ségrégation des chromosomes homologues (via la génération d'attachements physiques entre ces derniers) et de générer de la diversité génétique via la réassociation d'allèles issus des deux parents. En effet, la diversité génétique créée via la recombinaison méiotique est médiée par les crossovers (COs) qui correspondent à des échanges partiels et réciproques de chromatides-non sœurs entre des chromosomes homologues. Ces échanges permettent de générer un grand nombre de gamètes qui sont très différents génétiquement. Dans la suite de cette partie, je vais présenter les différents stades de la méiose et leurs caractéristiques.

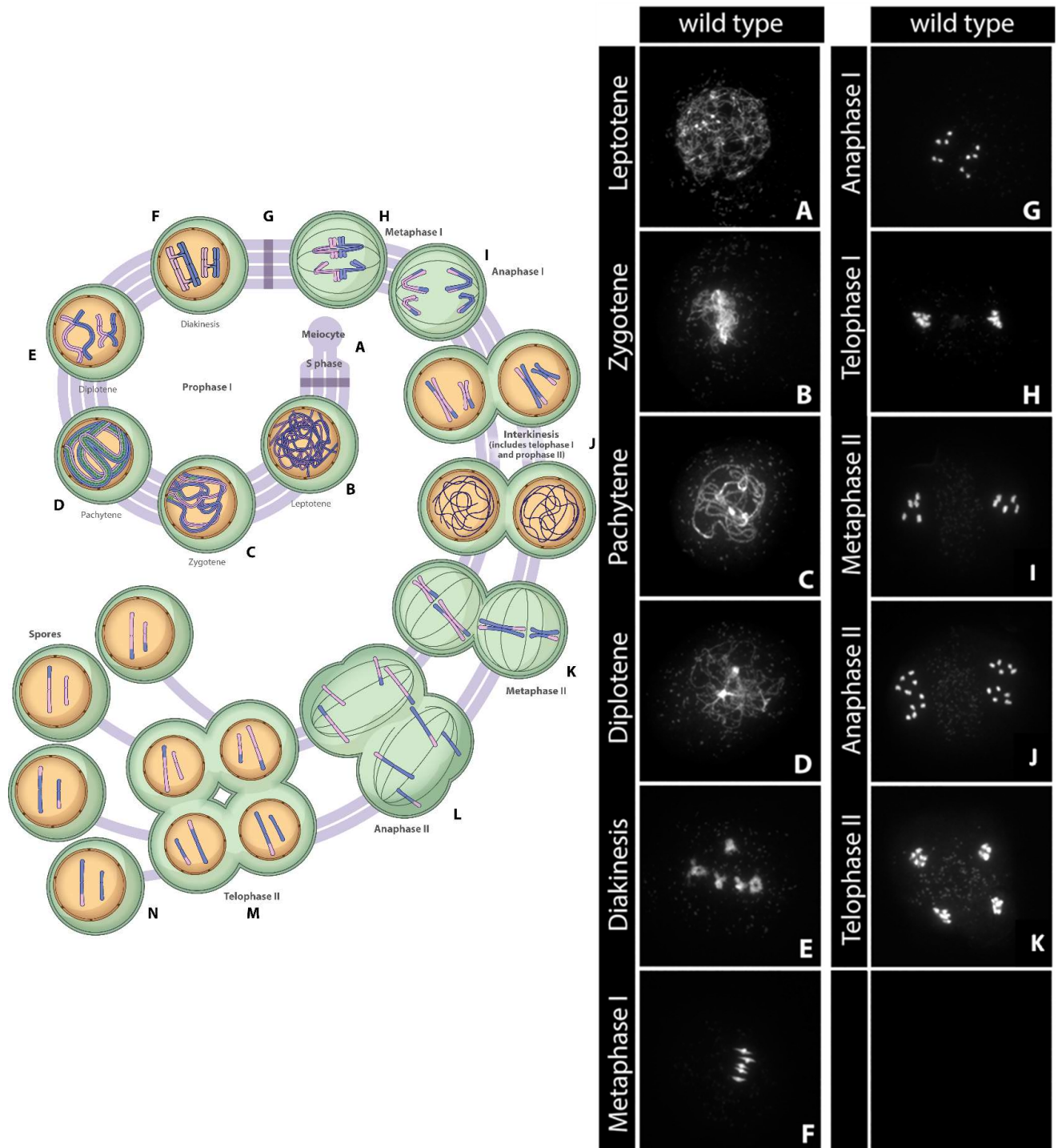


Figure 1 : Progression cytologique des différents stades de méiose chez *Arabidopsis thaliana*.  
 (a) Représentation schématique des différents stades de la méiose (d'après Mercier et al. 2015).  
 (b) microphotographie des différents stades de méiose chez *Arabidopsis thaliana*. Les chromosomes sont marqués au DAPI. (Adapté depuis Sims et al. 2021).

La méiose est précédée par une phase de réplication de l'ADN, correspondant à la **préprophase** de méiose. Cette réplication de l'ADN est très similaire à celle précédant la mitose.

En effet, les origines de réplication utilisées en mitose sont les mêmes que celles utilisées lors de la méiose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Collins & Newlon, 1994) et *Schizosaccharomyces pombe* (Heichinger et al. 2006). La plus grande différence entre les phases de réplication de l'ADN méiotique et mitotique correspond à la durée, puisque la phase S méiotique semble 2 à 3 fois plus longue que la phase S mitotique (Bennett & Smith 1972, Williamson et al. 1983, Cha et al. 2000). De plus, cette phase implique également des facteurs spécifiques de la méiose, comme par exemple la protéine REC8, qui est impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs (Cha et al. 2000). Ainsi à l'entrée de la méiose, chaque chromosome est présent en deux copies (paternelle et maternelle), possédant chacun deux chromatides sœurs. C'est pendant cette phase de réplication de l'ADN que les cohésines sont déposées afin de maintenir les chromatides sœurs ensemble pendant la première partie de la méiose. Les cohésines sont des complexes protéiques en forme d'anneau et composés des protéines SMC1, SMC3, SCC1, SCC3 (Bolaños-Villegas et al. 2017). Pendant la méiose, la protéine SCC1 est remplacée par la protéine REC8 afin de permettre le maintien de la cohésion des chromatides sœurs jusqu'à l'anaphase II de méiose (Watanabe & Nurse, 1999).

**La prophase** est le premier stade de la méiose et est elle-même subdivisée en cinq phases (Figure 1). Cette étape de la méiose a pour objectif de condenser les chromosomes et de former des paires entre les homologues afin d'assurer leur ségrégation correcte lors de la première division méiotique. C'est le stade le plus long (Bennett, 1977, Armstrong et al. 2003, Sanchez-Moran et al. 2007, Stronghill et al. 2014), occupant plus de 70% de la durée de la méiose. A titre d'exemple, cette phase est d'environ 20 heures pour une méiose d'une durée totale de 26 heures chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Prusicki et al. 2019).

Au sein du noyau interphasique post-répliatif (phase G2), tous les chromosomes sont sous la forme de fins filaments. Pendant le **leptotène**, les chromosomes vont subir une condensation via la formation d'une superstructure grâce à la formation de l'axe chromosomique. Cet axe chromosomique est composé de cohésines et des protéines méiotiques spécifiques de l'axe (ASY1 et ASY3) chez les plantes (Mercier et al. 2015). Les boucles de chromatine se forment à partir de l'axe chromosomique et semblent posséder des propriétés conservées chez de nombreuses espèces. Ainsi l'espacement entre les boucles semble constant avec une densité d'environ 20 boucles par  $\mu\text{m}$  (Kleckner, 2006).

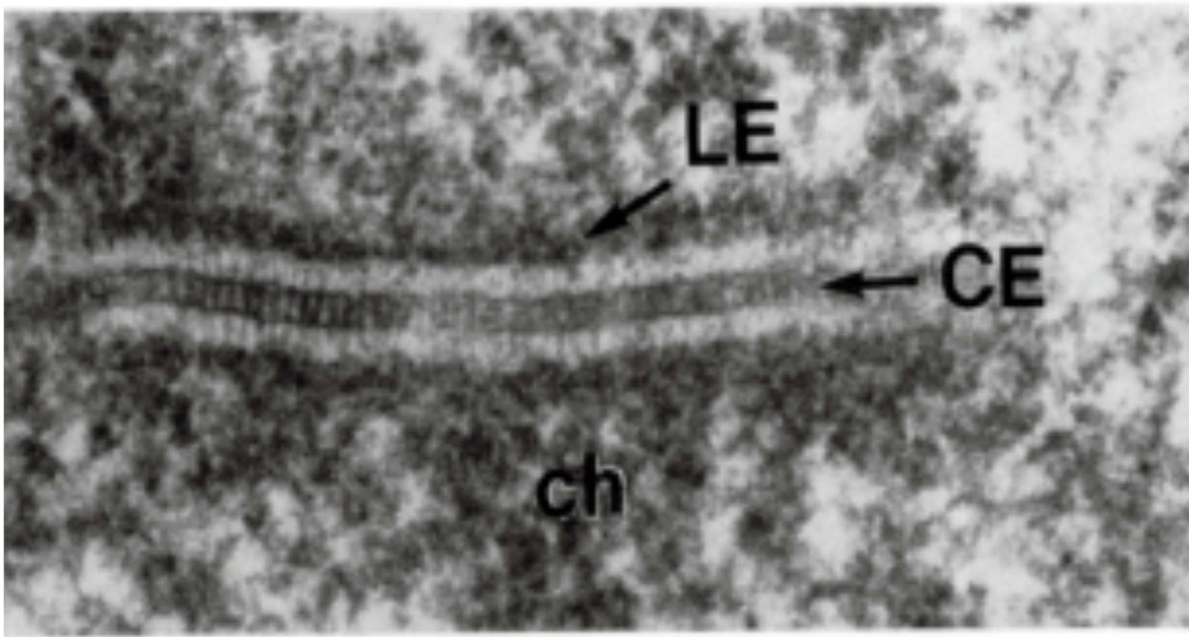


Figure 2 : Structure tripartite du complexe synaptonémal observée en microscopie électronique. LE : élément latéral, CE : élément central, chr : chromatine. (Depuis Zickler & Kleckner, 1999).

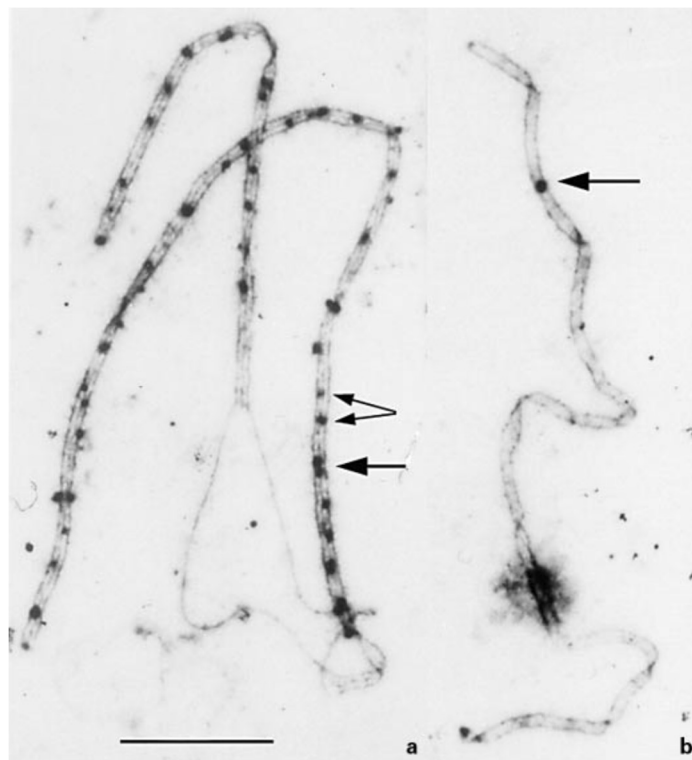


Figure 3 : Nodules précoces (a) et tardifs (b) de recombinaison, localisés le long de chromosomes aux stades zygotène et pachytène chez la tomate. Microscopie électronique, marquage à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb (depuis Stack & Anderson 1986).

Cependant, la taille des boucles peut être variable, ce qui permet de modifier ainsi la longueur de l'axe chromosomique puis plus tard du complexe synaptonémal (CS) avec une quantité similaire d'ADN, comme cela a pu être observé entre les méiocytes mâle et femelle chez l'humain (Kleckner et al. 2003). C'est au cours de cette phase du leptotène, dès la mise en place de l'axe chromosomique, que la recombinaison méiotique est initiée via la formation programmée de Cassures Double Brin de l'ADN (CDB) (Zickler & Kleckner, 1999). La formation de ces cassures sont médiées par des hétérodimères de la protéine SPO11, une endonucléase.

Au cours du **zygotène**, il y a la formation du bouquet, étape correspondant à la clusterisation des télomères à un pôle du noyau sur la membrane nucléaire. Cette conformation a été décrite pour la première fois par Gelei en 1921 au sein d'oocytes de la planaire lactée (Zickler & Kleckner 2016) et a été observée chez de nombreuses autres espèces telles qu'*Arabidopsis* (Hurel et al. 2018), le blé (Osman et al. 2021), le colza (Xin et al. 2016) ou encore le maïs (Harper et al. 2004). Cette conformation des chromosomes est retrouvée chez la levure *S. pombe* sous le terme « Horsetail stage » (Nambiar & Smith 2018). Cette conformation pourrait participer à la recherche et à l'appariement des chromosomes homologues, bien que cette théorie ne semble pas être applicable à l'ensemble des organismes étudiés (Zickler & Kleckner, 2016).

L'appariement correspond à l'association étroite des chromosomes homologues entre eux, avec une distance entre ces chromosomes supérieure à 300 nm (Zickler & Kleckner, 1999). Suite à l'appariement des chromosomes homologues, il a l'établissement du synapsis, qui correspond à la formation du Complexe Synaptonémal (CS) (Zickler & Kleckner, 1999).

Le complexe synaptonémal est une structure protéique tripartite observable en microscopie électronique (Figure 2). Elle est composée d'une région centrale et de deux éléments axiaux qui correspondent aux axes chromosomiques des chromosomes homologues. Cette structure a été décrite pour la première fois par Moses (1956, 1968). Cette structure permet de réduire la distance entre les deux axes chromosomiques à ~100 nm (Zickler & Kleckner, 1999).

Le long du complexe synaptonémal de larges structures protéiques denses aux électrons en microscopie électronique apparaissent pendant le leptotène (Figure 3). Ces structures correspondent aux nodules précoces de recombinaison (NPR), découverts en 1975 chez la *Drosophile* par Carpenter. Ils sont associés aux éléments axiaux du complexe synaptonémal et sont relativement nombreux le long des chromosomes.





Ces NPR sont plutôt hétérogènes en termes de taille et de forme (Anderson & Stack 2005). Certains de ces NPR sont en partie composés de protéines de type RecA (DMC1 et RAD51) (Anderson et al. 1997).

Au cours du **zygotène** et jusqu'en **pachytène**, les nodules précoces de recombinaison sont progressivement maturés en nodules tardifs de recombinaison (Anderson & Stack 2005). Ces NTRs correspondent aux chiasmata issus des deux voies de COs, étant donné qu'une seule partie des NTR sont marqués lors de l'immunomarquage de la protéine MLH1 (spécifique de la classe I des crossovers) chez la tomate (Anderson et al. 2014).

Pendant le **pachytène**, le complexe synaptonémal termine sa formation, permettant aux chromosomes homologues de s'apparier sur toute leur longueur et à la recombinaison entre les chromosomes homologues de se terminer. Pendant le **diplotène** le complexe synaptonémal se dissocie, laissant les chromosomes homologues attachés uniquement au niveau des COs, cytologiquement détectés comme des chiasmata. Au cours de la **diacinèse** les bivalents continuent à se condenser. En **métaphase I** les chromosomes homologues, présents sous forme de paires reliées uniquement par les chiasmata, sont alignés sur la plaque métaphasique à équidistance des deux pôles de la cellule, sous tension par les fuseaux méiotiques de microtubules qui tirent les homologues dans des directions opposées. L'**anaphase I** correspond à la division réductionnelle de la méiose, elle permet de séparer les chromosomes homologues et ainsi d'obtenir aux deux pôles de la cellule deux groupes haploïdes de chromosomes à deux chromatides. La cytokinèse (ou cytodierèse) chez la méiose mâle est classée en deux types, successive ou simultanée (De Strome & Geelen 2013). La cytokinèse successive, caractéristique des monocotylédones tel que le blé, correspond au fait que la cytokinèse a lieu en **télophase I** et en télophase II de méiose. Tandis que la cytokinèse simultanée, caractéristique des eudicotylédones, tel que chez les *Brassica*, a lieu uniquement en télophase II de méiose, ainsi la séparation des chromatides sœurs en seconde partie de méiose a lieu dans le même cytoplasme pour les deux jeux de chromosomes. Au cours de la **métaphase II**, les chromosomes possédant deux chromatides sœurs sont alignés au centre de la cellule, le fuseau méiotique, les chromatides sœurs étant tirées à des pôles opposés de la cellule, n'étant retenues entre elles qu'au niveau de leur centromère par des cohésines. En **anaphase II**, suite à l'intervention des protéases séparese, il y a un clivage des cohésines centromériques permettant la migration des chromatides sœurs aux quatre pôles de la cellule.



Pendant la **télophase II**, il y a la reformation de l'enveloppe nucléaire autour des quatre jeux de chromosomes. La cytokinèse a lieu pour la seconde fois chez les monocotylédones ou pour la première fois chez les eudicotylédones. Cela permet de former des parois entre les quatre jeux haploïdes de chromosomes ne présentant qu'une chromatide. Cela forme le stade tétrade qui, lorsque la paroi de la PMC se rompra, libérera les quatre microspores.

La durée de la méiose est variable selon les espèces allant de par exemple d'environ 30 heures chez *Arabidopsis* (Sanchez-Moran et al. 2007) à trois mois chez le pin corse (Chamberlain, 1935). Cette durée semble également variable selon le niveau de ploïdie au sein d'une même espèce. Ainsi, il semble que l'augmentation du niveau de ploïdie chez *Arabidopsis thaliana* (passage du niveau diploïde au niveau autotétraploïde) induit un allongement de la durée de la méiose (Prusicki, 2018). Cet allongement de la durée de la méiose est associée principalement avec une augmentation de la phase G2 et du début du leptotène. Ce qui est en désaccord avec les résultats de Bennett & Smith (1972) obtenus chez les céréales. De plus, selon les espèces, les méiocytes d'une anthère sont plus ou moins en synchronisés pour le stade méiose. Ainsi chez le blé, les méiocytes sont au même stade de la méiose pour une taille d'anthère donnée (Shunmugam et al. 2018). En revanche, chez *Arabidopsis* et les Brassica, différents stades de la méiose peuvent être observés au sein d'une même anthère, entraînant une certaine hétérogénéité.

Il faut garder à l'esprit que cette classification en étapes bien distinctes n'est qu'une conceptualisation et une simplification de la méiose qui est un processus dynamique où chacune des étapes s'enchaînent progressivement en suivant un continuum entre les étapes décrites. Cela est en partie lié au fait que les descriptions initiales de la méiose ont été réalisées sur des échantillons fixés (Zickler & Kleckner, 1998).

Du point de vue de la diversité, la méiose permet de générer de nouvelles combinaisons alléliques via la recombinaison entre les chromosomes homologues (brassage intrachromosomique) et cette diversité est également brassée via la ségrégation aléatoire des chromosomes lors des anaphases (brassage interchromosomique).

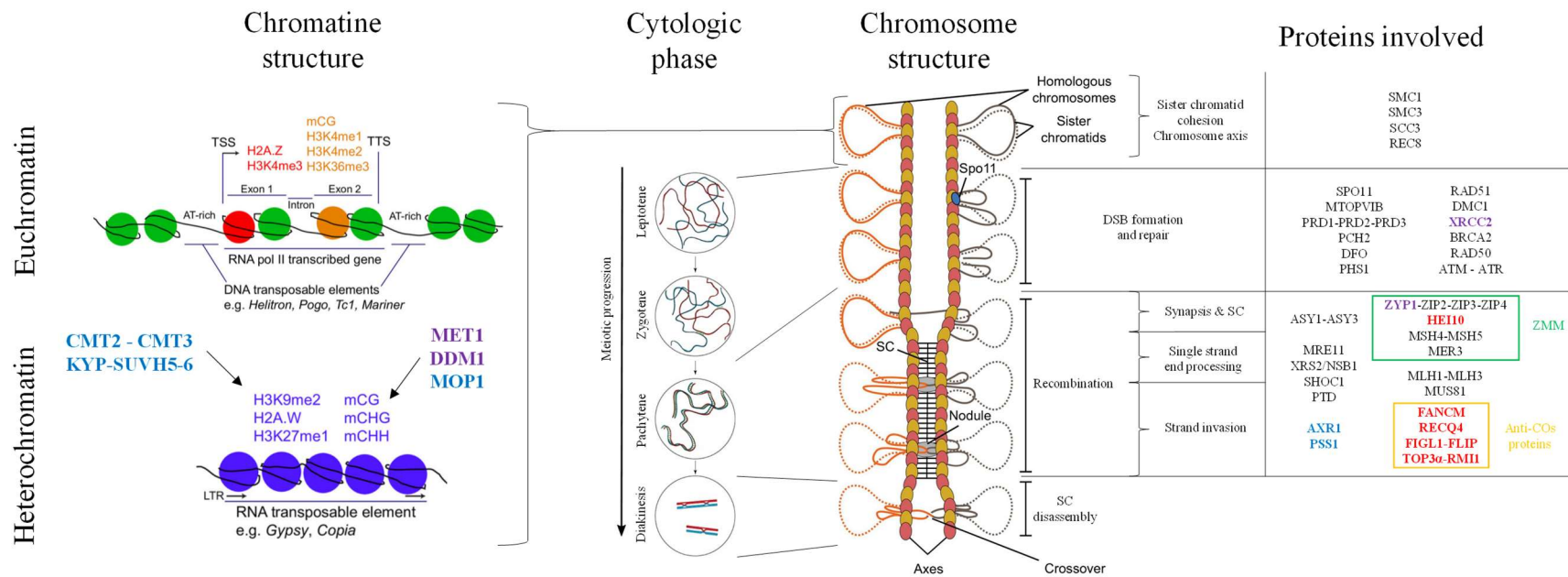


Figure 4 : Lien entre les stades de la prophase, la structure des chromosomes et les principales protéines impliquées dans la recombinaison méiotique. La nomenclature de protéines utilisée chez *A. thaliana* est utilisée ici par simplicité. Les protéines indiquées en rouge, bleu et violet représentent respectivement une augmentation de la fréquence de recombinaison, une modification de la distribution de la recombinaison, ou un effet sur ces deux aspects en cas de modification de l'expression des gènes codant pour ces protéines. Les protéines ZMM sont encadrées en vert et les protéines impliquées dans les voies anti-COs sont encadrées en orange. Adapté depuis Mézard et al. (2007), Tock & Henderson (2018) et Yadav et al. (2021).

## I.B. Description moléculaire des différents stades de méiose

Les différents stades cytologiques précédemment décrits mettent en jeu de nombreux acteurs moléculaires (Figure 4). Ainsi, dans cette partie je vais décrire succinctement les processus moléculaires impliqués dans la réplication de l'ADN, la formation du complexe synaptonémal, la formation des cassures double brins (CDBs) de l'ADN, la formation des non-crossovers (NCOs) et des crossovers (COs) ainsi que de l'interférence.

### *I.B.1 Les cassures double brin de l'ADN*

Lors du leptotène, le modèle actuel pour la formation des CDBs propose que la protéine SPO11 soit associée à l'axe chromosomique et que les boucles de chromatine présentant des hotspots de CDB soient apportées via des protéines annexes vers l'axe chromosomique afin que SPO11 puisse catalyser la CDB (Jing et al. 2019) (Figure 5). Chez les plantes comme *Arabidopsis*, le complexe responsable de l'activité catalytique, qui permet de former les CDBs, est composé des protéines SPO11-1, SPO11-2 et MTOPVIB (Grelon et al. 2011, Hartung et al. 2007, Vrielynck et al. 2016). Cependant, SPO11 a également besoin d'autres protéines pour réaliser les CDB (Figure 5). Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, cette protéine a besoin de neuf autres partenaires protéiques (Mercier et al. 2015). Parmi ces protéines accessoires, le complexe MRX-N (Mre11-Rad51-Xrs2/Nsb1) va cliver en position 3' de SPO11, afin de permettre sa libération du site de coupure (Lam & Keeney, 2015).

Les CDB ont lieu en excès comparé au nombre de COs observés en diacinèse et en métaphase I. Par exemple chez la plante modèle *Arabidopsis* environ 250 CDBs ont lieu et seulement onze sont réparées en COs (Mercier et al. 2015). De même, chez le maïs, 200 à 500 CDBs ont lieu par méiose et seulement 20 sont réparées en COs (Sidhu et al. 2015). Le nombre de CDBs peut être variable au sein d'une même espèce. Chez le maïs, il existe des variétés présentant une fréquence élevée ou faible de CDBs et un hybride issu du croisement entre des parents contrastés pour ce phénotype présente un phénotype intermédiaire (Sidhu et al. 2015). Au sein des chromosomes, il existe des hotspots de CDBs qui ne sont pas toujours associés à des hotspots de recombinaison. Il est aussi à noter que les régions dépourvues de recombinaison présentent tout de même des CDBs (He et al. 2017), même si ces dernières sont en plus faible nombre (Choi et al. 2018, Underwood et al. 2018). Après la formation de la CDB, la protéine SPO11 reste liée de façon covalente à l'extrémité 5' de la CDB de l'ADN (Mercier et al. 2015). Cette propriété de SPO11 a permis d'établir une cartographie fine de la distribution des CDB le long du génome en séquençant les morceaux d'ADN liés à SPO11.

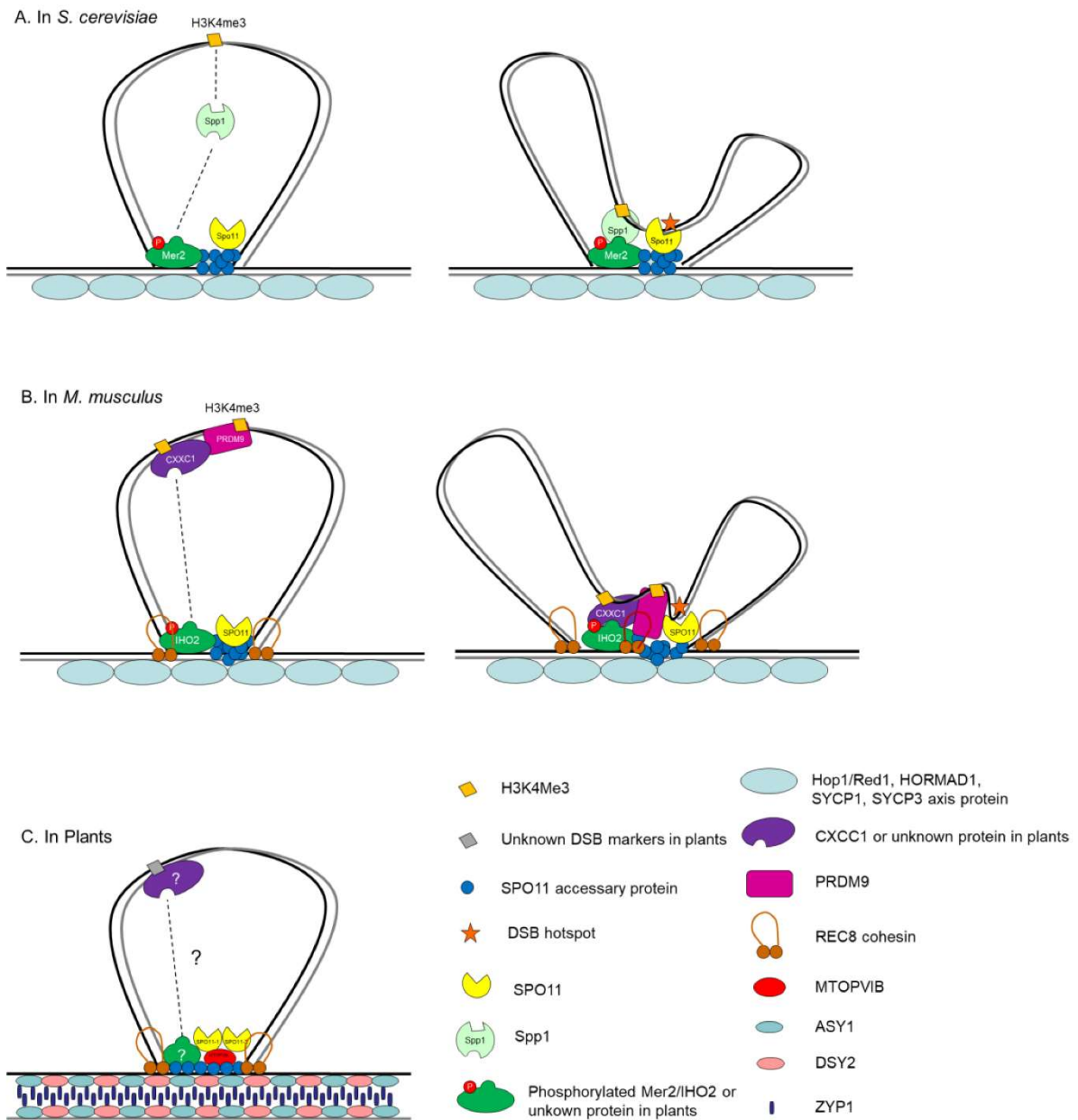


Figure 5 : Réalisation des cassures double brin chez la levure *S. cerevisiae* (a), la souris *M. musculus* (b) et chez les plantes (c). (D'après Jing et al. 2019).

Cette technique « SPO11-oligo » a été utilisée par exemple chez les levures *S. cerevisiae*, *S. pombe*, la souris ou encore *Arabidopsis* (Pan et al. 2011; Fowler et al. 2014; Lange et al. 2016, Choi et al. 2018). Des approches par immunomarquage SPO11 ont aussi permis de visualiser et de quantifier ces cassures (Ku et al. 2020). Par la suite, il y a une résection de l'extrémité 5' de la CDB qui est réalisée par l'exonucléase Exo1 (Lam & Keeney, 2015), ce qui permet d'agrandir le fragment 3' simple brin libre. Les régions d'ADN simple brin 3' de la CDB sont ensuite prises en charge par les protéines de type RPA, ces protéines lient l'ADN simple brin sous la forme d'un complexe hétérotrimérique pour protéger de la dégradation, éviter la formation de structures secondaires (garder linéaire l'ADN simple brin) et faciliter le chargement des protéines impliquées dans la recombinaison (Sakagushi et al. 2009, Wang & Copenhaver, 2018).

Ensuite, les protéines RPA sont remplacées par les protéines DMC1 et RAD51 qui s'associent à cette extrémité 3' d'ADN simple brin, formant ainsi une structure nucléoprotéique (Figure 6). Les protéines DMC1 et RAD51 sont des protéines orthologues de la recombinaise RecA des bactéries qui permettent l'invasion de l'ADN simple brin au sein de l'hélice d'ADN du chromosome homologue (Brown & Bishop, 2015). RAD51 fonctionne comme protéine accessoire de DMC1, la délétion de son site catalytique n'entraînant pas de modification de la fonction du complexe chez *Arabidopsis* (Mercier et al. 2015).

Ces deux protéines biaisent la réparation de l'ADN en utilisant la matrice ADN du chromosome homologue plutôt que celui de la chromatide sœur. Ce mécanisme est prévenu en mitose mais assuré en méiose par DMC1 (Mercier et al. 2015). Ces deux protéines, DMC1 et RAD51, ont des rôles différents concernant l'appariement des chromosomes. Chez *Arabidopsis*, DMC1 est nécessaire pour l'appariement des centromères alors que RAD51 est important pour l'appariement des bras chromosomiques (Da Ines et al. 2012). La détection des positions des cassures double brin le long du génome peut être réalisée via du RAD51 ChIP-seq, comme cela a été réalisé chez le maïs par exemple (He et al. 2017).

Le nombre de CDB peut également être estimé cytologiquement par immunomarquage de RAD51 ou de DMC1, comme cela a pu être montré chez le blé tendre (Osman et al. 2021) ou encore *Arabidopsis* (Girard et al. 2015). La formation de CDB induit une phosphorylation de l'histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX), ainsi il est également possible d'estimer la fréquence de CDB par immunomarquage dirigé contre la marque d'histone  $\gamma$ -H2AX, comme cela a été utilisé par exemple chez *Arabidopsis* (Sanchez-Moran et al. 2007).



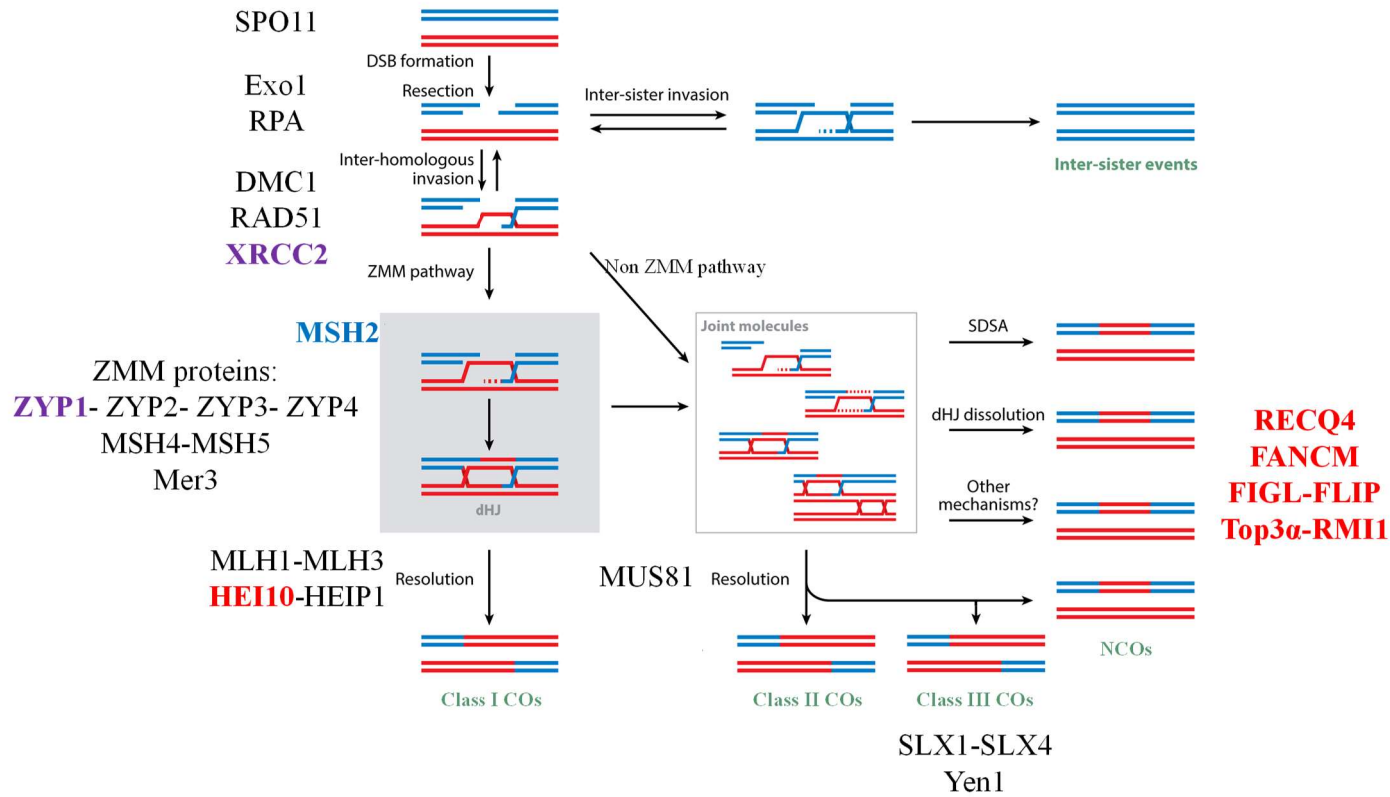


Figure 6 : Représentation schématique des voies de formation des COs et NCOs. Les modifications des protéines en rouge, bleu et violet induisent respectivement une augmentation de la fréquence de recombinaison, une modification de la distribution de la recombinaison, ou un effet sur ces deux aspects en cas de modification de ces gènes. Adapté depuis Mercier et al. 2015.

L'invasion de l'ADN simple brin au sein de la chromatide non sœur du chromosome homologue va ainsi créer une boucle appelée la D-loop (pour displacement loop).

Cette invasion (Single end invasion) permet de former une jonction de Holliday (Holliday, 1964). L'ADN simple brin envahissant est ensuite prolongé via une synthèse d'ADN en utilisant comme matrice ADN le brin complémentaire du chromosome homologue.

Cette jonction de Holliday peut être résolue via SDSA (pour synthesis-dependant strand annealing), ce qui va conduire à la religature de ce brin néosynthétisé avec la CDB d'origine et ainsi former un NCO (non-crossover) (Figure 6).

Dans le cas où il n'y a pas de résolution par SDSA, il y a la « second end capture » qui correspond à l'association de la seconde CDB à la première. La formation de cette seconde jonction de Holliday permet de créer la structure double jonction de Holliday (djH). Cette djH pouvant être résolue par clivage asymétrique en COs ou un clivage symétrique en NCOs.

L'initiation de la synapsis se fait de manière locale sur les chromosomes via le complexe SCI (pour Synapsis Complex Initiation), contenant les protéines Zip2-3-4 et Spo16, qui vont ensuite recruter la protéine Zip1 chez la levure *S. cerevisiae* (Pyatnitskaya et al. 2019).

La polymérisation de la protéine Zip1 entre les deux axes chromosomiques des chromosomes homologues permet la mise en place de l'élément central du Complexe Synaptonémal, les axes chromosomiques représentant les éléments latéraux (composé des protéines ASY1 et ASY3), ce qui forme ainsi la structure tripartite du CS observé en microscopie électronique (Figure 2). Il est important de noter que certains synapsis sont dépendants des CDBs comme chez la levure, la souris ou encore Arabidopsis (de Boer & Heyting 2006), tandis que chez la Drosophile et *C. elegans* la formation du CS est indépendante des CDBs (Lake and Hawley 2012, Rog and Dernburg 2013). Similairement, la recombinaison peut être indépendante de la formation du CS comme chez Arabidopsis (Capilla-Perez et al. 2021) et la formation du CS peut être indépendante de la recombinaison, comme chez la Drosophile ou *C. elegans* (Dernburg et al. 1998; McKim et al. 1998; Villeneuve and Hillers 2001).

La longueur du Complexe Synaptonémal est corrélée avec la fréquence de recombinaison (Kleckner et al. 2003). Cependant, il permet de ne faire que des comparaisons semi-quantitatives entre des individus au sein d'une même espèce sans pouvoir donner d'estimation de la fréquence ou de la distribution de la recombinaison.



Par ailleurs des résultats discordants ont été observés chez *Arabidopsis*, une augmentation de la fréquence de recombinaison étant associée à une diminution ou à une augmentation de la longueur du CS selon la température imposée lors de la méiose (Lloyd et al. 2018). Les cassures double-brin (CDB) générées par SPO11 peuvent être réparées par différents processus qui aboutiront dans la majorité des cas à des conversions géniques (également appelé non-crossovers (NCOs)) ou plus minoritairement à des COs.

### *I.B.2. Les non-crossovers*

Les CDBs sont réparées en grande majorité par des non-crossovers (NCOs) (Mercier et al. 2015). Les NCOs correspondent à des échanges partiels et non-réciproques entre chromatides non-sœur de chromosome homologue, on parle également de conversion génique (Figure 6). Les événements de conversion génique sont de petite taille (20-50 bp chez *Arabidopsis*), rendant leur détection difficile et nécessitant l'utilisation du séquençage sur les quatre produits d'une même méiose (Wang & Copenhaver, 2018). La SDSA (pour synthesis-dependant strand annealing) est la voie majoritaire de formation des NCOs (Wang & Copenhaver et al. 2018). Lors de la SDSA, au sein de la D-loop, il y a une synthèse de l'ADN du brin invasif qui utilise comme matrice ADN le brin complémentaire du chromosome homologue.

Par la suite, le brin invasif est dissocié de sa matrice complémentaire et réassocié avec son brin d'origine. La voie SDSA semble être sous le contrôle d'hélicases, telles que SGS1 chez la levure *S. cerevisiae* ou RECQ4 chez *Arabidopsis* (Andersen & Sekelsky, 2010). Suite à ce mécanisme SDSA, si à un locus considéré il y a un polymorphisme allélique entre les deux chromosomes homologues et qu'un événement de NCOs a lieu, alors il y aura une perte d'un des deux allèles du premier homologue. Ainsi, il y aura donc une ségrégation de type 3:1 lors de la méiose pour ce locus considéré. Il semble que la taille de ces événements de conversion génique soit régulée par le complexe Mlh1-Mlh2 chez la levure *S. cerevisiae* (Duroc et al. 2017). Bien que les NCOs se forment principalement via la SDSA, ils peuvent également être formés via la résolution symétrique de la djH par les protéines ZMM (Mercier et al. 2015) ou une dissolution de la djH par l'hétérodimère TOP3-RMI1 (Kaur et al. 2015). De plus, contrairement aux COs de classe I, les NCOs ne semblent pas soumis à l'interférence, comme cela a pu être montré chez la *Drosophile* (Miller et al. 2016).



### *I.B.3. Les crossovers*

Les COs sont subdivisés en deux grandes classes selon la machinerie moléculaire à leur origine et leurs propriétés vis-à-vis de l'interférence.

#### *I.B.3.a. Les COs de classe I*

Les COs de classe I sont des COs dit « interférents » ou sensibles à l'interférence. Ces COs sont formés via la machinerie ZMM, du nom des protéines impliquées dans ce complexe et découvertes chez la levure *S. cerevisiae* à savoir Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Msh4, Msh5 et Mer3 (Lynn et al. 2007) (Figure 6). Ces COs représentent les COs majoritaires chez de nombreux organismes tels que chez *Arabidopsis*, le blé, le maïs, la souris ou encore l'humain (Mercier et al. 2015). Ces protéines ZMM ont une fonction de stabilisation de la D-loop, qui vont permettre à cette structure d'évoluer pour former une double jonction de Holiday (djH).

La protéine Zip1 correspond à l'élément central du complexe synaptonémal, tandis que les protéines Zip2, Zip3 et Zip4 sont des protéines qui appartiennent au complexe d'initiation de la synapsis qui permettent la polymérisation de Zip1 afin de former le CS (Tsubouchi et al. 2006). Les protéines Msh4 et Msh5 appartiennent à la famille des protéines MMR (MisMatch Repair) et sont les orthologues de MutS chez les bactéries.

Ces protéines fonctionnent toutes les deux sous la forme d'un hétérodimère et participent à la stabilisation des jH (Snowden et al. 2004). La protéine Mer3 est un hélicase ATP-dépendante qui va permettre l'extension (déplacement) de la D-loop dans un sens 3' - 5' après la second-end capture (Nakagawa et al. 2001, Mazina et al. 2004). Après la stabilisation et l'extension de la djH, l'hétéroduplex MLH1-MLH3 va cliver de manière asymétrique la djH, ce qui va aboutir à la formation des COs de classe I. Ces deux protéines sont les orthologues de MutLγ chez les bactéries.

Par ailleurs, les protéines MLH1, MER3 et MSH4 ont également un rôle dans l'organisation spatiale des chromosomes et leur appariement chez *Sordaria* (Storlazzi et al. 2010).



### I.B.3.b. Les COs de classe II

Les COs de classe II sont des COs formés de manière indépendante aux protéines ZMM (Figure 6). Ils sont minoritaires chez la majorité des espèces (Mercier et al. 2015) à l'exception de *S. pombe* (Snow, 1979) et des espèces du genre *Aspergillus* (Egel-Mitani et al. 1982, Auxier et al. 2022) qui ne possèdent que cette voie de COs et de manière intéressante ne présentent pas non plus de CS.

Cette seconde voie de formation de COs a été découverte chez différents organismes suite à la présence de COs résiduels malgré le knockout (KO) de plusieurs gènes contrôlant la voie des COs de classe I (Mercier et al. 2005).

Les COs de classe II sont insensibles à l'interférence et leur formation dépend des protéines MUS81 et MMS4 qui fonctionnent en hétérodimère (De los Santos *et al.*, 2003, Gaskell et al. 2007, Cromie et al. 2006, Berchowitz et al. 2007). MUS81 est une endonucléase qui a la capacité de cliver les jH afin d'aboutir soit à des COs soit à des NCOs chez la levure *S. pombe* (Gaskell et al. 2007).

### I.B.3.c. Autres voies de formation des COs

Chez *Arabidopsis*, dans le double mutant *Zmm Mus81*, où aucune des deux classes de COs précédemment détaillées n'est présente, des COs subsistent (Mercier et al. 2015). Cependant, les acteurs moléculaires de ces événements restent à élucider, bien que des endonucléases telles que SLX1-SLX4 et Yen1 semblent être de bonnes candidates. Il est possible que cette troisième voie de formation des COs ne soit active que lorsque qu'aucune des deux voies principales n'est fonctionnelle (Wang & Copenhaver, 2018).

### I.B.4. Interférence

L'interférence correspond au fait que deux COs de classe I ont peu de chance de se trouver à proximité l'un de l'autre comparé à une distribution indépendante. Ainsi, il existe une distance minimale entre deux COs de classe I contrôlée par le phénomène de l'interférence. L'interférence est un phénomène complexe retrouvé chez de nombreuses espèces et dont l'élucidation moléculaire n'a pas encore été réalisée. Il existe actuellement plusieurs modèles théoriques pour décrire l'interférence (Figure 7), avec notamment le « counting model », le « Beam-film model » ou encore le « compartmentalized signaling model ».



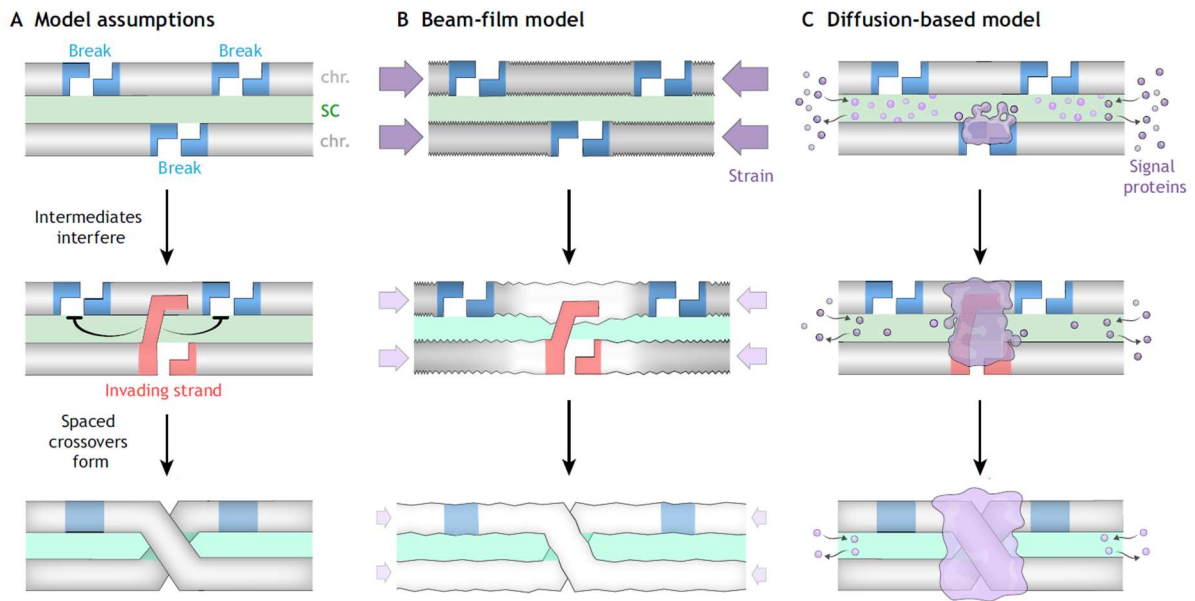


Figure 7 : Représentation schématique de deux modèles de l'interférence. L'interférence a lieu dans l'espace entre les chromosomes (gris) occupé par le complexe synaptonémal (aire verte). (A) Représentation graphique modèle général de l'interférence. De nombreuses cassures double brin (bleu) ont lieu le long des chromosomes, à un stade avancé de la réparation des cassures il y a l'invasion simple brin de l'homologue (rouge) qui empêche la réparation des CDB adjacentes en COs, aboutissant à la formation de COs régulièrement espacés. (B) Modèle « Beam-film ». Des forces de tensions (flèches mauves) existent le long des chromosomes et favorisent la réparation aléatoire d'un sous set de CDB en COs. La formation de COs modifie les forces de tensions ce qui ne permet pas de former de nouveaux COs à proximité du premier. (C) Modèle de diffusion. Des protéines impliquées dans la désignation des COs (éléments mauves) diffusent le long des chromosomes. Des sites de nucléation de ces protéines forment des foci au niveau des CDB. Cette nucléation induit une séquestration compétitive des protéines, ce qui déplete les régions adjacentes en ces protéines. Seuls les sites possédant une concentration suffisante de ces protéines permettront la formation de COs, les régions adjacentes formant ainsi pas de COs à proximité du premier. (D'après Diezmann & Rog, 2021).

Il existe d'autres modèles, débattus et disponibles dans Pazhayam et al. 2021. Le « counting model » propose que des recombinaisons soient capables de compter les intermédiaires de recombinaison et d'espacer les futurs COs d'un certain nombre de NCOs (Pazhayam et al. 2021). Les modèles mécanistiques proposent que l'interférence corresponde à des forces physiques qui se propagent le long des chromosomes (Diezmann & Rog, 2021). Le modèle « Beam-film » propose que les chromosomes soient soumis à des forces de tensions physiques ; lorsqu'un COs se forme, il y a une déstabilisation de ces forces localement, ce qui prévient la formation de COs dans les régions adjacentes (Kleckner et al. 2004, Zhang et al. 2014, Figure 7). Le modèle de diffusion repose sur le principe de la diffusion de molécules pro-COs qui vont se concentrer au cours du temps au niveau de certaines djH au détriment des régions adjacentes (Diezmann & Rog, 2021). Les molécules candidates pour ce modèle sont les protéines de la famille ZIP3, telle que HEI10 chez *Arabidopsis* (Morgan et al. 2021, Diezmann & Rog, 2021, Figure 7).

Une autre protéine candidate pour médier l'interférence est celle composant l'élément transverse du CS, ZYP1. En effet, le KO de ce gène induit une perte de l'interférence chez *Arabidopsis thaliana* (Capilla-Pérez et al. 2021).

Les méthodes d'étude de la force de l'interférence se basent sur la superposition de modèles mathématiques aux données expérimentales de recombinaison. On dispose ainsi de modèles mathématiques pour le modèle « Beam-film » (Zhang et al. 2014), le modèle Gamma (qui est une approche statistique se basant sur le « counting model ») (Gauthier et al. 2011) et le modèle de diffusion (Morgan et al. 2021).

Il est important de noter qu'une modification de fréquence de recombinaison n'est pas toujours associée à une modification de la force de l'interférence. Cela a été montré chez *Arabidopsis thaliana* où une différence de fréquence de COs entre la voie mâle et la voie femelle a été observée sans modification de l'interférence (Giraut et al. 2011).

D'une manière similaire, une augmentation de la fréquence de COs de classe I a été observée suite à une augmentation de la température mais sans modifier la force de l'interférence chez *Arabidopsis* (Modliszewski et al. 2018).

Par ailleurs, il a été montré chez la tomate qu'il était possible qu'il existe une interférence entre les COs de classe I et les COs de classe II, en se basant la distribution physique (en  $\mu\text{m}$ ) des nodules tardifs de recombinaison en pachytène couplé à de l'immunomarquage MLH1 (Anderson et al. 2014).

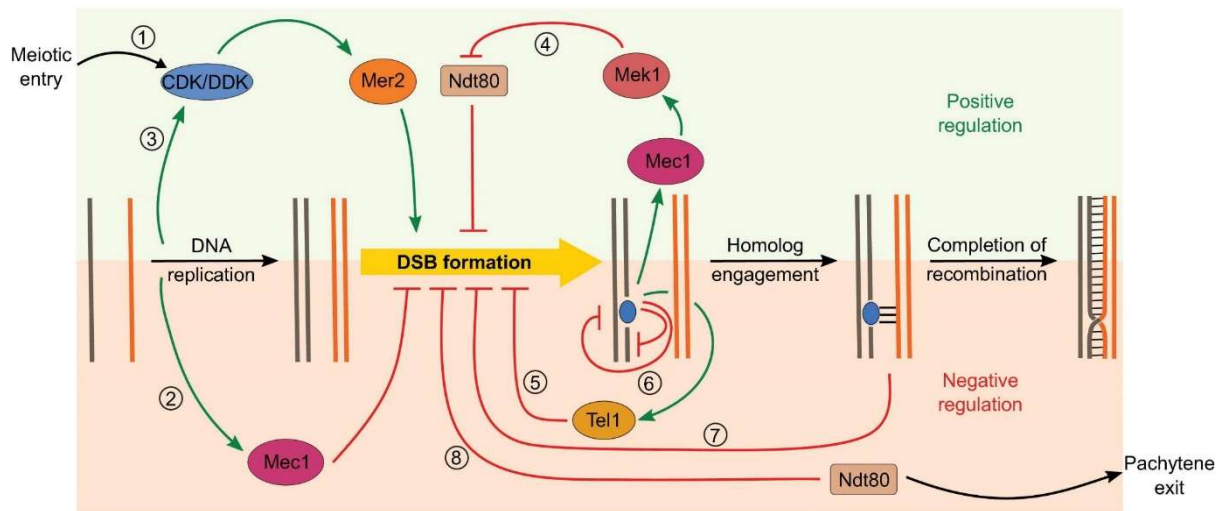


Figure 8 : Boucles de rétrocontrôle de la formation des cassures double brin.

(1) La formation des CDB dépend de l'activité de CDK et DDK par la phosphorylation de Mer2. (2) La réplication de l'ADN inhibe la formation des CDB via l'activation de Mec1. (3) La réplication de l'ADN est également capable de promouvoir la formation des CDB via la phosphorylation de Mer2. (4) Les défauts de recombinaison activent Mec1, prolongeant la durée de la prophase en inhibant l'activation de Ndt80. (5) l'activation de la kinase Tel1 inhibe la formation d'autres CDB. (6) Interférence entre les hotspots de CDB en cis et trans. (7) La synapsis induit l'arrêt de la formation des DSB via le déplacement des protéines des CDB par les protéines du complexe synaptonémal. (8) Sortie du stade pachytène via l'activation de Ndt80, empêchant la formation des CDB. (adapté depuis Yadav & Bouuaert, 2021)

Chez *Arabidopsis arenosa*, l'interférence est renforcée chez les autotétraploïdes afin de limiter la formation de multivalents entre chromosomes homologues pour favoriser la bonne ségrégation des chromosomes (Morgan et al. 2021). Ainsi chez cette espèce, les premières générations d'autotétraploïdes semblent présenter plus de COs que les autotétraploïdes établis à cause d'une plus faible efficacité de l'interférence comparée aux autotétraploïdes établis (Morgan et al. 2021). D'une manière similaire une augmentation de la fréquence de COs a été observée chez un autotétraploïde d'*Arabidopsis thaliana* comparé à son parent diploïde (Pecinka et al. 2011). Chez un autotétraploïde de la levure *S. cerevisiae*, une augmentation de la fréquence de recombinaison a été observée en lien avec une diminution de la force de l'interférence et une augmentation du nombre de CDB (Fang et al. 2021).

#### *I.B.5 Boucles de rétrocontrôles et checkpoints de la méiose*

Comme la mitose, la méiose comporte des checkpoints. Chez les levures et les mammifères il existe de nombreuses boucles de rétrocontrôles qui permettent la progression correcte des différentes phases de ce cycle cellulaire, en coordonnant différents processus. Par exemple, il existe une régulation spatio-temporelle de la formation des CDB. En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, tant que la réplication de l'ADN n'est pas terminée lors de la phase S, la formation des CDBs est inhibée via la protéine Mec1, tandis qu'elle est promue dès que la réplication est terminée via les protéines CDK/DDK et Mer2. Lorsque les CDB sont prises en charge par la machinerie de réparation de l'ADN, la formation des CDB est inhibée, via les protéines Mec1 et Mek1 qui vont réprimer le facteur de transcription Ndt80. La réparation des CDB en COs, ainsi que l'achèvement du synapsis va promouvoir la sortie du stade pachytène et le désassemblage du complexe synaptonémal. La présence de CDB résiduels va inhiber la sortie de prophase par la voie ATM/ATR qui sont les senseurs principaux des cassures de l'ADN. L'ensemble de ces boucles de rétrocontrôle permet ainsi de réguler temporellement la formation des CDB et leur homéostasie. Ces boucles de rétrocontrôle sont médiées par des modifications post-traductionnelles (telle que la phosphorylation) qui modulent l'activité de ces différentes protéines, mais également via des modifications du niveau de transcription de certains facteurs, via notamment Ndt80 (Subramanian & Hochwagen 2014, Kar & Hochwagen 2021, Yadav & Bouuaert 2021, Figure 8).

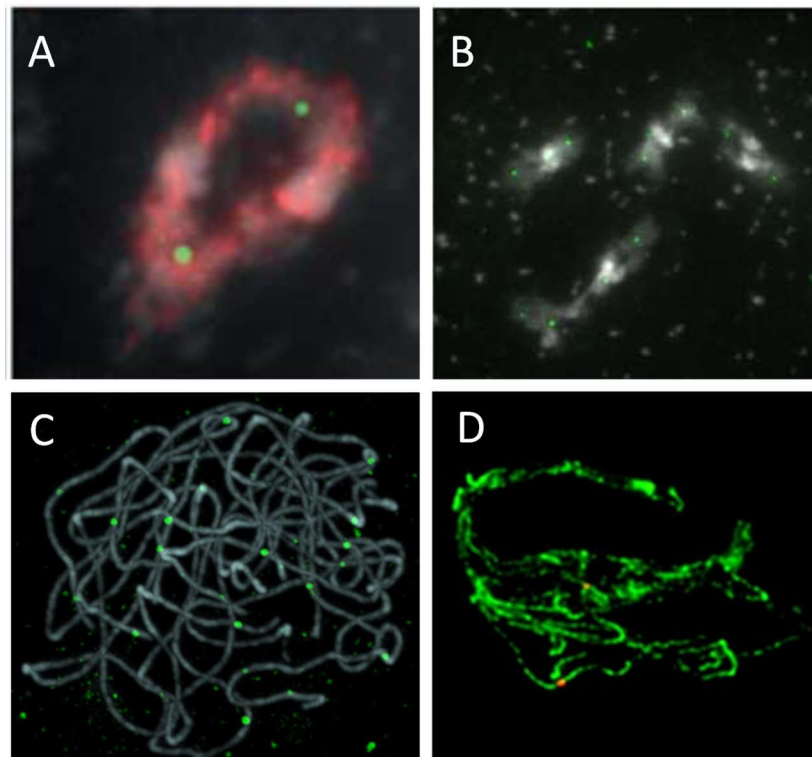


Figure 9 : Estimation de la fréquence de recombinaison par immunolocalisation.

(A) Immunolocalisation de la protéine MLH1 (vert) sur un bivalent (DAPI (gris) et immunomarquage de SCC3 (rouge) au stade diacinèse chez *A. thaliana* (Chelysheva et al. 2010). (B) Immunolocalisation de la protéine HEI10 (vert) sur des bivalents (DAPI, gris) au stade diacinèse chez *A. thaliana* (Chelysheva et al. 2010). (C) Immunolocalisation de la protéine MLH3 (vert) sur une cellule (chromosomes marqués au DAPI (gris) au stade pachytène chez l'orge (Phillips et al. 2015). (D) Immunolocalisation de la protéine MUS81 (rouge) le long du CS (immunomarquage de ZYP1, vert) au sein d'une cellule au stade pachytène chez *A. thaliana* (Varas et al. 2015).

## II. Outils d'étude de la recombinaison méiotique

Au cours de ce dernier centenaire, depuis la découverte de la recombinaison méiotique, différentes méthodes d'analyse ont été mises au point afin d'estimer la fréquence et/ou la distribution de la recombinaison méiotique.

### II.A. Outils d'étude directs

Il est possible d'estimer la fréquence et/ou la distribution de la recombinaison en étudiant directement ce qu'il se passe au sein des cellules en cours de méiose, notamment via i) le comptage de nodules de recombinaison tardifs, ii) l'immunomarquage de protéine de méiose et iii) le dénombrement de chiasmata.

#### *II.A.1. Nodules de recombinaison tardif*

Les nodules tardifs de recombinaison (NTR) sont des structures protéiques de 100nm de diamètre, observées en microscopie électronique et associées à l'élément central du CS des chromosomes au stade pachytène (Zickler & Kleckner, 1999, Anderson & Stack 2005, Figure 3). Ces nodules sont retrouvés chez différentes espèces telles que la Drosophile, le vers à soie, le maïs ou encore la tomate. Les NTR corrélerent très fortement avec la position des chiasmata et des COs détectés par cartographie génétique (Stack et al., 1989; Sherman and Stack, 1995; Anderson et al., 2003). Les NTR sont également soumis, comme les COs, à l'interférence (Sherman & Stack 1995). Ces structures correspondent aux COs. Chez la tomate, l'ensemble des NTR marque l'ensemble des COs, interférents et non interférents (Lhuissier et al. 2007). Le dénombrement de ces nodules permet donc de déterminer la fréquence de recombinaison (sans biais entre les deux classes de COs) et permet de mesurer la force de l'interférence physiquement en  $\mu\text{m}$ . Ainsi des cartes de recombinaison ont été établis par cette méthode, comme par exemple chez le maïs (Anderson et al. 2003) et la tomate (Sherman & Stack 1995).

#### *II.A.2. Immunomarquage des COs*

Il est possible de suivre le nombre de COs de type I en réalisant de l'immunomarquage des protéines impliquées dans la formation de ces COs. Ainsi, il est actuellement possible de réaliser l'immunomarquage des protéines MLH1, MLH3, HEI10 ou encore MUS81 (Figure 9).

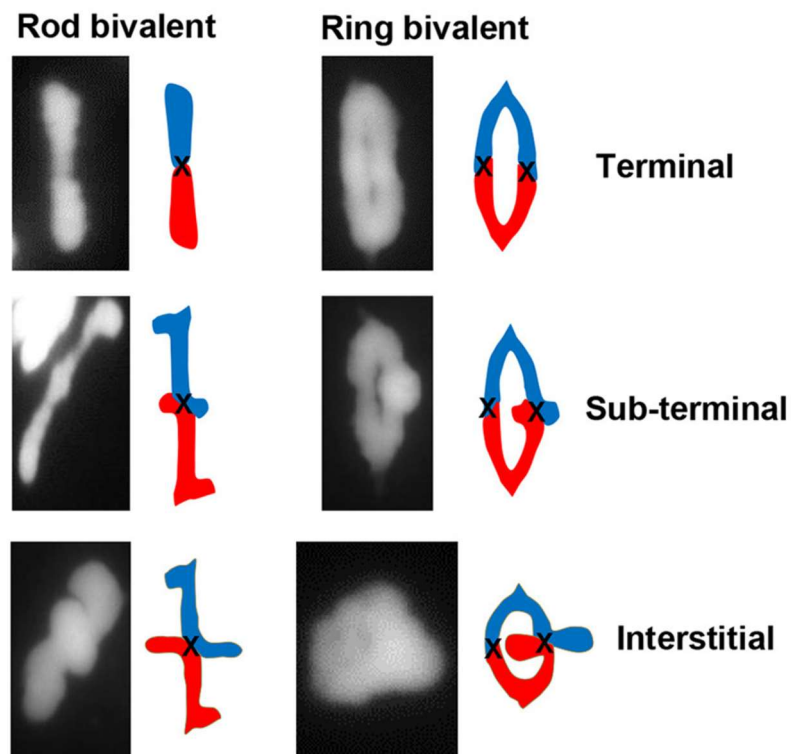


Figure 10 : Estimation de la fréquence et de la distribution de la recombinaison par l'étude des chiasmata. Un bivalent droit (rod bivalent) indique la présence d'un chiasma tandis qu'un bivalent en anneau (ring bivalent) indique la présence de deux chiasmata. La proximité des chiasmata par rapport aux régions télomériques est également identifiable, avec des chiasmata proches des télomères (terminal) ou plus éloignés (interstitiel). Coloration des chromosomes au DAPI. (D'après Osman et al. 2021)

HEI10 forme des foci sur les bivalents depuis le stade pachytène jusqu'en diacinèse, avec une réduction du nombre de foci pendant cette partie de la prophase, tandis que le nombre de foci MLH1 s'accroît jusqu'en diacinèse où les foci de cette protéine colocalisent avec ceux de la protéine HEI10. Ces foci contenant MLH1 et HEI10 en diacinèse colocalisent avec une partie des chiasmata (Chelysheva et al. 2010, Chelysheva et al. 2012). De plus, la fréquence et la distribution des foci MLH1 le long des chromosomes sont corrélées avec la fréquence et la distribution des COs chez l'humain, la souris, *Arabidopsis* et la tomate (Baker et al. 1996, Lipkin et al. 2002, Chelysheva et al. 2010, Lhuissier et al. 2007). Ainsi l'utilisation de ces protéines pour l'estimation de la fréquence et de la distribution de la recombinaison due aux COs de classe I par immunomarquage est communément admise au sein de la communauté méiose. Par ailleurs, la protéine MLH1 fonctionnant sous la forme d'un hétéroduplex avec la protéine MLH3 pour résoudre les djH, il est également possible de réaliser de l'immunomarquage de la protéine MLH3 pour suivre les COs de classe I, comme cela a pu être réalisé chez l'orge (Phillips et al. 2015).

Enfin, il est possible de réaliser de l'immunomarquage de la protéine MUS81, afin d'estimer la fréquence des COs de classe II, comme démontré chez *Arabidopsis* (Varas et al. 2015).

### *II.A.3. Dénombrement des chiasmata*

La détermination du nombre de chiasmata est une méthode demandant peu de moyens pour estimer la fréquence de recombinaison. Cela peut être réalisé en diacinèse ou en métaphase I et permet, par coloration au carmin ou au DAPI, de compter le nombre d'échanges entre chromosomes sans distinction entre les COs de type I ou II (Figure 10). Cependant cette technique est beaucoup plus facile chez les espèces possédant de grands chromosomes tels que le blé, mais plus difficile chez les espèces possédant de petits chromosomes du fait du risque de sous-estimation dans le cas de COs proches. Cette méthode est cependant utilisée chez des plantes telles qu'*Arabidopsis thaliana* ou encore le colza (Ziolkowski et al. 2015, Gonzalo et al. 2019).





## II.B. Outils d'étude indirects

Il est possible d'estimer la fréquence et/ou la distribution de la recombinaison en utilisant les produits de la méiose, c'est-à-dire les grains de pollen ou la descendance.

### *II.B.1. Cartographie génétique*

Une carte génétique correspond à l'ordonnement le long des chromosomes de marqueurs génétiques présents sur la séquence ADN. La première définition d'une carte génétique a été réalisée par Sturtevant (1913), qui a établi la première carte génétique sur le chromosome X de la *Drosophile* avec cinq marqueurs morphologiques. Il a défini l'unité de mesure 1 centiMorgan (unité faisant référence à son mentor puis collègue Thomas Morgan) correspondant à 1 CO pour 100 méioses. Cette définition du centiMorgan est correcte uniquement pour les distances génétiques inférieures à 10 cM, au-delà de ce seuil il existe une dérive qui nécessite d'être corrigée mathématiquement. C'est ainsi que Haldane en 1919 propose son modèle mathématique. Par la suite, Kosambi (1943) proposa un modèle mathématique plus complexe qui permet également de prendre en compte l'interférence (Semagn et al. 2006). La cartographie génétique ne permet pas de différencier les deux classes de COs.

Actuellement, il coexiste principalement deux méthodes de représentation graphique de la distribution de la recombinaison. Il est possible de cumuler les distances génétiques entre chaque marqueur positionné physiquement afin de réaliser une représentation en carte de Marey (Marey maps), ce type de carte a été développé initialement par Marey en 1885 pour les chemins de fer puis adapté à la visualisation de la distribution de la recombinaison par Chakravarti en 1991. Il est également possible de représenter la fréquence de recombinaison normalisée par la distance physique (cM/Mb) entre les marqueurs génétiques le long des chromosomes.

Les marqueurs utilisés en cartographie génétique sont très diversifiés, depuis les gènes utilisés par Sturtevant (1913) jusqu'au génotypage par séquençage (Elshire et al. 2011) en passant par les isozymes, les RAPD, les AFLP, les RFLP, les microsatellites (Single Sequence Repeats) et les SNP (issues de techniques KASPar, puces ou données de séquençage à haut débit). L'objectif est d'avoir, par chromosome, de nombreux marqueurs polymorphes entre les deux parents, afin de pouvoir déterminer la position des COs d'après la ségrégation des marqueurs génétiques dans la descendance (sous forme de gamètes ou d'individus). Chez les plantes, les marqueurs morphologiques ont également été utilisés, comme par exemple chez la tomate (Griffing & Langridge, 1963) ou chez le blé (Sears, 1977).

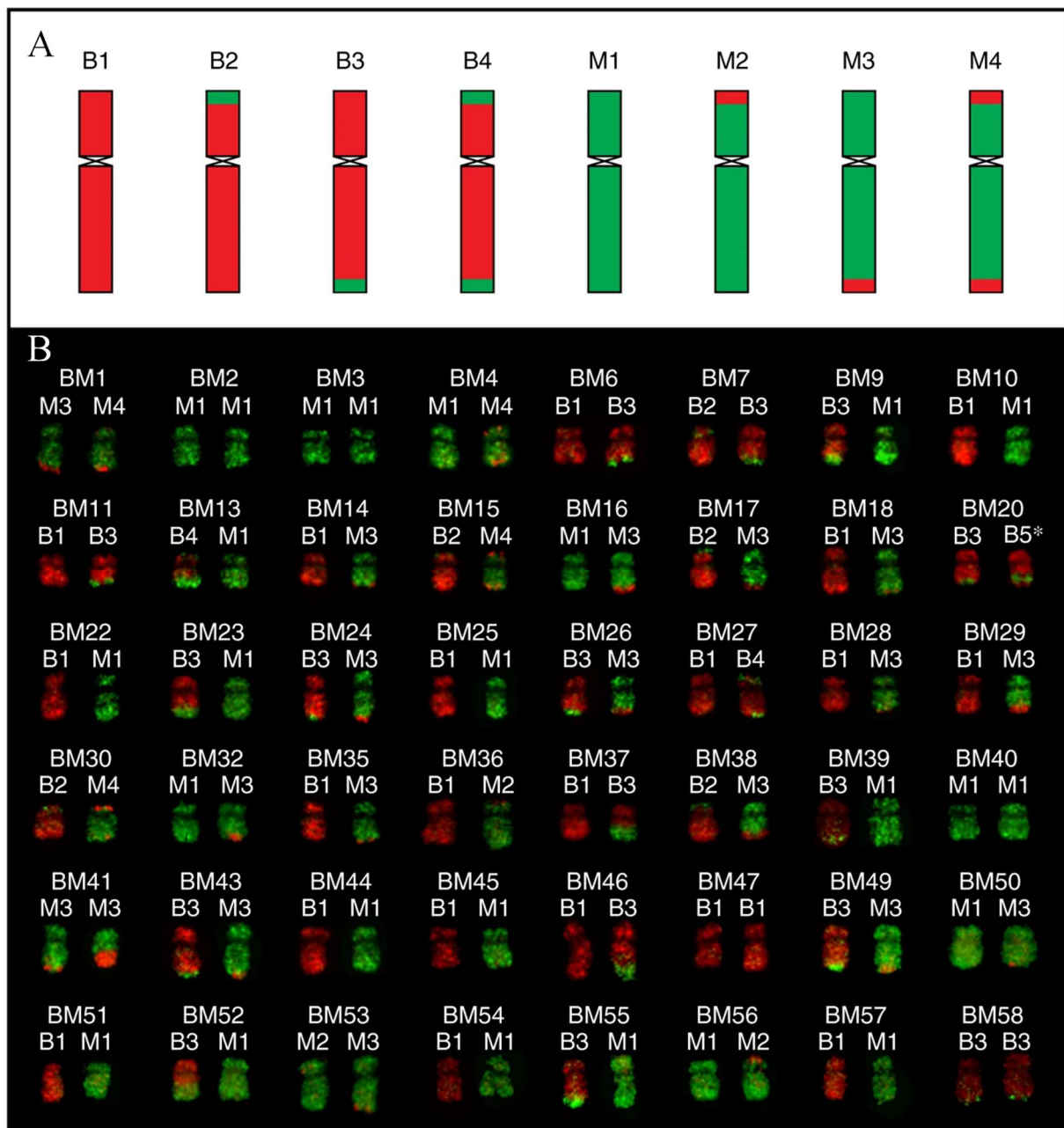


Figure 11 : Détermination de la distribution de la recombinaison par oligo-FISH sur des cellules mitotiques d'une population en ségrégation de maïs. (A) Diagramme représentant les huit types de chromosomes (parentaux et recombinants) retrouvés dans la population. (B) Représentation des deux copies du chromosome 10 dans 48 plantes F2. (D'après do Vale Martins et al. 2019).

### *II.B.2. Suivi des échanges homologues en C-banding*

Cytologiquement il est également possible de suivre la fréquence et la distribution de la recombinaison en estimant la position des échanges homologues grâce au suivi du pattern en C-banding des chromosomes des descendants d'un hybride F1 polymorphe pour ce type de profil. Cela a notamment été réalisé chez le blé dur, ce qui a permis d'établir le profil de recombinaison sur 11 bras de 6 des 7 chromosomes du génome B (Lukaszewski & Curtis, 1993). Cependant cette méthodologie est difficile d'utilisation chez les plantes possédant de petits chromosomes sans banding, telles que les *Brassica* (Olin-Fatih & Heneen, 1992).

Chez le maïs, des marqueurs cytologiques tels que les régions hétérochromatiques knob ont également été utilisées pour suivre les produits de la recombinaison homologue (Creighton & McClintock, 1931).

### *II.B.3. Suivi des échanges homologues en peinture chromosomique oligo-FISH*

De manière similaire à ce qui a été réalisé chez le blé pour le C-banding, il est possible aujourd'hui de déterminer la position et la fréquence des COs en analysant le profil de marquage oligo-FISH. En effet, en utilisant une banque de sondes oligo-FISH (une banque de sonde est composée d'un mélange de milliers de sondes de 45 bp spécifiques d'un individu parental et d'une région chromosomique) spécifiques de l'haplotype de chacun des parents, il est possible de repérer les échanges homologues qui ont eu lieu chez un hybride F1 en analysant les chromosomes mitotiques de sa descendance (do Vale Martins et al. 2019, Figure 11). Cette approche n'est possible qu'en disposant de l'assemblage *de novo* de chacune des variétés parentales afin de pouvoir définir des sondes spécifiques.



#### *II.B.4. Pollen-typing*

Afin d'avoir accès à l'ensemble des produits d'une méiose, il est possible de réaliser du génotypage sur les quatre plantes sœurs issues de l'isolation des quatre grains de pollen du mutant *qrt1*, mutant ne permettant pas la séparation des quatre grains de pollen d'une même méiose chez *Arabidopsis*. Après isolement, chaque grain de pollen est utilisé pour polliniser une seule fleur par grain de pollen. Cela donne ainsi accès aux COs issus d'une seule méiose à l'échelle du génome entier (Copenhaver et al. 1998).

Pour déterminer la recombinaison au sein d'un locus avec une grande précision, une technique s'inspirant du sperm-typing utilisée chez les mammifères (Cole et al. 2014) a été développée chez les plantes. Ce pollen typing permet, depuis une extraction d'ADN d'une population de grains de pollen issus d'un hybride F1 (suivi de dilution, d'amplifications PCR et de séquençage), de déterminer avec précision le nombre de COs, de NCOs dans un intervalle génomique donné. Cette technique a notamment été utilisée pour étudier un hotspot de recombinaison chez *Arabidopsis* (Drouaud et al. 2013).

Il est également possible de réaliser du génotypage de type KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR markers) sur des noyaux de grains de pollen isolés, bien que la quantité d'ADN disponible limite le nombre de marqueurs génétiques utilisables (Dreissig et al. 2015).

Actuellement, avec l'avancée des technologies et la réduction des coûts de séquençage il est possible de réaliser du séquençage « single-cell » sur des noyaux de grains de pollen, permettant d'avoir une information sur le profil de recombinaison le long du génome, à l'échelle du mégabase. Cette technique présente peu de différences par rapport à l'estimation des profils de recombinaison en utilisant une population d'haploïdes doublés et présente l'avantage d'éviter les biais issus de sélection post-méiotiques (Dreissig et al. 2017). En effet, l'utilisation d'haploïdes doublés nécessite la croissance et une régénération de plantes via la culture *in vitro*, ce qui peut induire un biais de sélection des plantes pour leurs capacités à survivre à ce mode de culture et à cette structure génomique particulière. Ainsi, en comparant les données de génotypage issues d'une population de grains de pollen par rapport à un jeu de données issus d'une population d'haploïde doublés (HD) spontanément, Dreissig et al. (2017) ont montré que des régions génomiques différentes entre les deux populations de cartographie génétique présentaient une distorsion de ségrégation, chez l'orge.

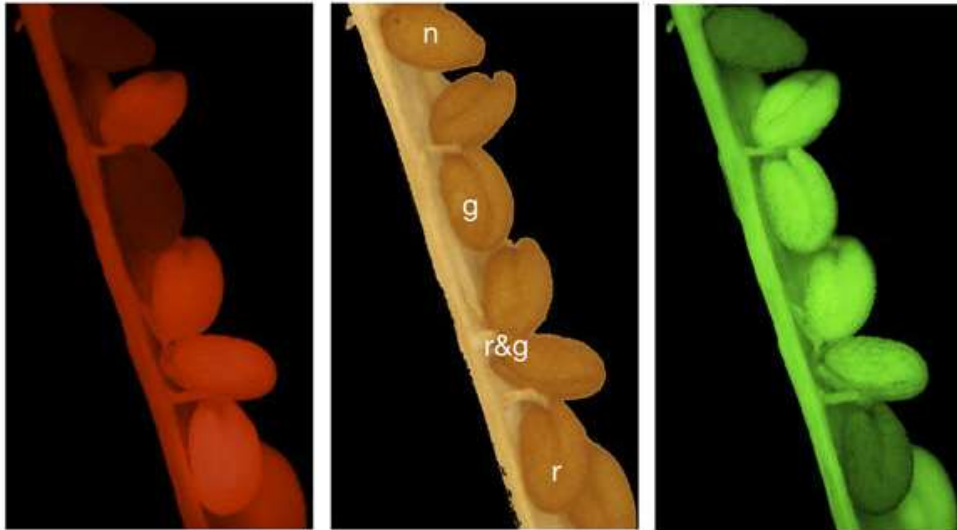


Figure 12 : Exemple de lignée fluorescente « seed-specific ». L'image de gauche représente la fluorescence rouge de certaines graines, tandis que l'image de droite représente la fluorescence verte de certaines graines. L'image centrale est prise à la lumière blanche et les graines présentant une fluorescence rouge (r), verte (g), rouge et verte (r&g) ou sans fluorescence (n) sont indiqués. (D'après Emmanuel et al. 2006).

Par ailleurs, la présence de distorsion de ségrégation observée au sein des haploïdes doublés ne semble pas lié au mode de production des haploïdes doublés (doublement spontané du génome ou induction par un traitement à la colchicine) chez le colza (Foisset et al. 1997).

Chez le maïs, une équipe a été capable de réaliser du séquençage sur des grains de pollen isolés depuis une même tétrade. Cela a ainsi permis d'avoir accès au nombre de COs, de NCOs et de déterminer avec précision la force de l'interférence (Li et al. 2015).

#### *II.B.5. Le système DART (Double Antibiotic Resistance Technique)*

Le système DART est le premier permettant d'estimer la fréquence de recombinaison dans un intervalle du génome à haut-débit. Des marqueurs génétiques conférant une résistance à la kanamycine et à l'hygromycine sont positionnés en trans (en répulsion) sur une paire de chromosome homologue. Le dénombrement des plantules double-résistantes permet ainsi de faire une estimation de la fréquence de recombinaison dans l'intervalle. Ce système permet d'étudier la recombinaison sur de grandes populations de plantules et plusieurs intervalles génomiques sont disponibles sur les différents chromosomes d'*A. thaliana*, à un coup moindre comparé à la cartographie génétique utilisant des marqueurs SSR et en seulement 14 jours (Barth et al. 2000).

#### *II.B.6. Fluorescent tagged lines (FTL)*

En complément du système DART, deux systèmes se basant sur des marqueurs génétiques fluorescents ont été développés : Seed-specific FTL and Pollen-specific FTL

##### *II.B.6.a. Seed-specific FTL*

En se basant sur la méthodologie développée par Barth et al (2000), Melamed-Bessudo et al. (2005) ont développé des lignées utilisant l'intégration d'un transgène codant la GFP ou RFP à une distance physique connue et dont l'expression est sous le contrôle un promoteur spécifique de la graine (*napA*). Plusieurs lignées ont été développées marquant plusieurs régions sur le génome. Ces marqueurs génétiques sont liés en cis (en couplage) et positionnés sur les différents chromosomes d'*A. thaliana*.



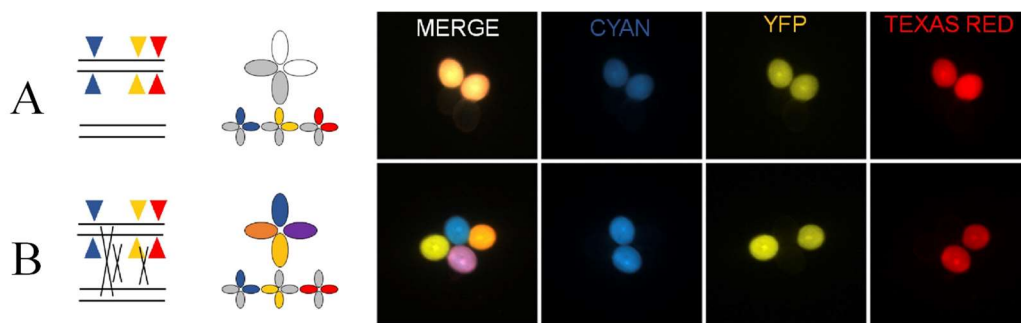


Figure 13 : Exemple de lignée fluorescente « Pollen-specific » avec la mutation « *qrt* ». (A) Dans le cas où il y a une absence de COs entre les chromosomes parentaux, l'ensemble des marqueurs sont retrouvés dans les mêmes grains de pollen. (B) Exemple de la formation d'un double COs entre les marqueurs bleu et jaune impliquant les quatre chromatides et un CO entre les marqueurs jaunes et rouges, ainsi que la représentation des grains de pollens issus de ce type de recombinaison. (D'après France et al. 2021).

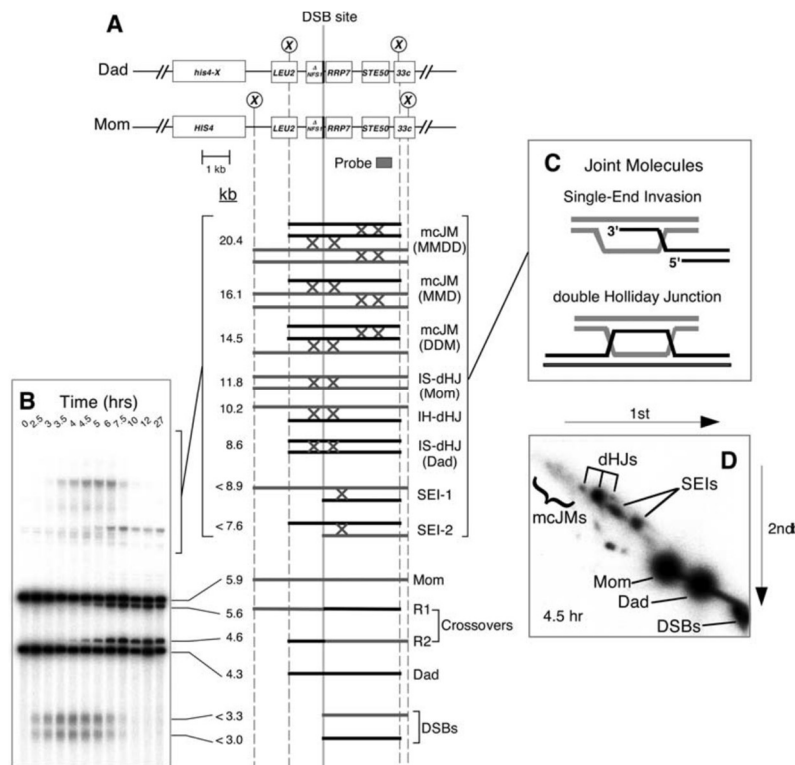


Figure 14 : Exemple du système HIS4LEU2 pour l'étude de la recombinaison. (A) Carte du locus HIS4LEU2, avec la position de la sonde (Probe) et les positions des sites de restriction de l'enzyme XhoI (cercles contenant une croix). Les différents types de molécules d'ADN détectable sont représentées schématiquement dessous. IH-dHJs : double jonction de Holliday entre homologues, IS-dHJs double jonction de Holliday entre chromatides sœurs, molécules jointes contenant trois ou quatre chromatides, M : chromatide maternelle, P : chromatide paternelle. (B) Image d'un gel southern blot en une dimension hybridé avec la sonde « Probe », illustrant les différents cas de figures détaillés en (A). (C) Structures prédites des intermédiaires des Single End Invasion et double jonction de Holliday. (D) Image d'un gel southern blot natif en deux dimensions où les structures en (A) sont indiquées. (Adapté depuis Oh et al. 2009).

Cela permet d'estimer la fréquence de recombinaison en dénombrant la fréquence de graines présentant une fluorescence rouge, verte, combinée ou sans fluorescence mais pour l'intervalle entre les deux marqueurs uniquement (Figure 12). Ainsi cette méthode ne nécessite pas de faire pousser les plantes, engendrant un gain de temps supplémentaire.

#### II.B.6.b. Pollen-specific FTL

En se basant sur la méthodologie de Melamed-Bessudo et al. (2005) et sur ce qui est fait chez la levure où la dissection d'asques permet d'avoir accès à tous les produits d'une seule méiose (Copenhaver et al. 2000), Francis et al. (2007) ont développé des lignées possédant des marqueurs génétiques (insertion d'un transgène) codant pour des marqueurs fluorescents (YFP, CFP, dsRed) sous le contrôle du promoteur LAT52, spécifique du grain de pollen. Ce système a été combiné à la mutation *qrt1* qui permet de maintenir ensemble les quatre grains de pollen issus d'une même méiose (Figure 13). Ce système permet de mesurer les COs, les NCOs ainsi que l'interférence et de détecter les doubles COs impliquant deux, trois ou quatre chromatides (Berchowitz & Copenhaver, 2008).

Ces trois derniers systèmes permettent notamment d'étudier la recombinaison dans un fond génétique homozygote.

#### *II.B.7 Approches de biochimie pour étudier la recombinaison*

Les gels d'électrophorèse à une dimension permettent de résoudre la localisation des cassures double brins de l'ADN de manière assez précise à l'échelle d'un gène ou même d'un promoteur, comme démontré chez la levure par Murakami et al. (2009) via l'utilisation d'enzymes de restriction et d'une sonde spécifique marquée. Ce type de southern blot permet de déterminer également certains types d'intermédiaires de la recombinaison, telles que les dHJ entre chromosomes homologues ou entre chromatides sœurs ou encore les molécules recombinantes (Oh et al. 2009).

Les gels d'électrophorèse en deux dimensions permettent d'obtenir d'autres informations sur les intermédiaires de la recombinaison. Ce type de migration permet notamment de différencier les molécules de type single end invasion, les jonctions simples et doubles de Holliday ou encore les molécules jointes contenant trois à quatre chromatides (Figure 14).

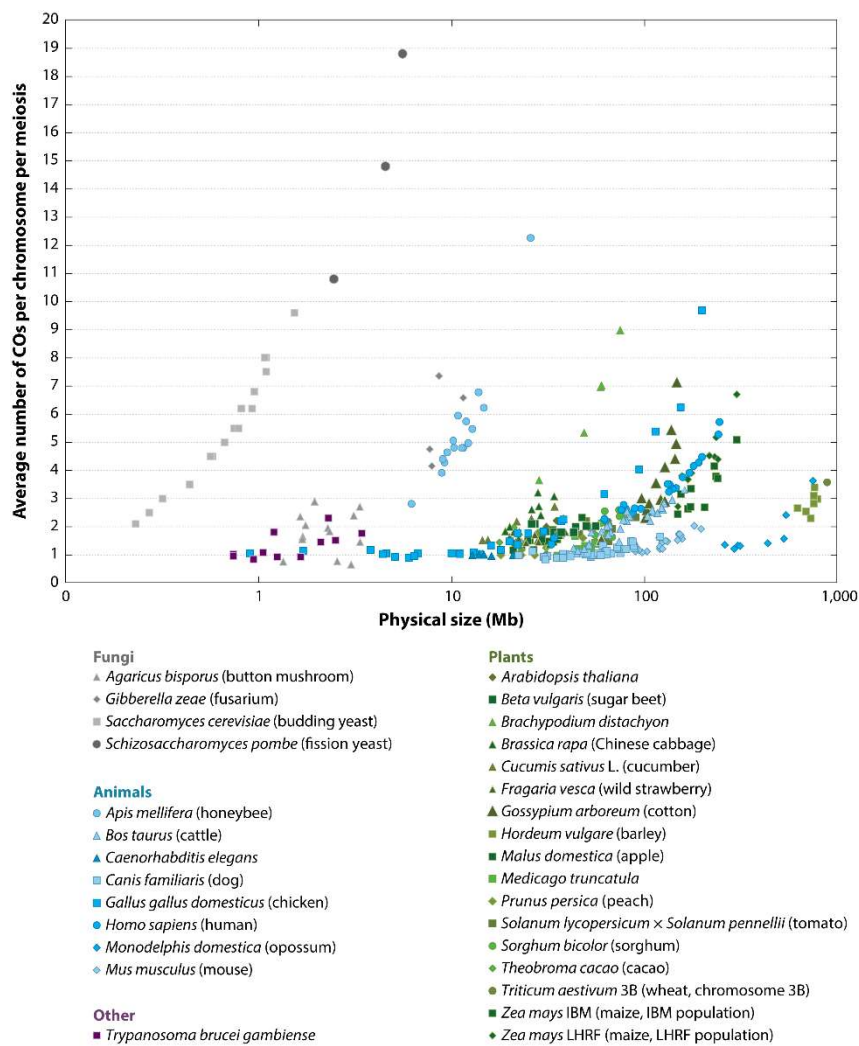


Figure 15 : Nombre moyen de COs par chromosome chez plusieurs eucaryotes. (Mercier et al. 2015)

### III. Régulation de la recombinaison

La méiose étant un processus central dans la reproduction chez de nombreuses espèces eucaryotes permettant la bonne ségrégation des chromosomes, ce mécanisme est très strictement contrôlé, aussi bien en termes de fréquence que de distribution de la recombinaison.

#### III.A. Contrôle de la recombinaison

##### *III.A.1. Fréquence*

La présence d'au moins un CO par paire de chromosome homologue (CO obligatoire) est nécessaire afin d'assurer la ségrégation correcte des chromosomes lors de la métaphase I et ainsi de produire des gamètes équilibrés en chromosomes et donc euploïde (Darlington & Dark 1932).

Chez de nombreuses espèces, rarement plus de trois COs sont présents par paire de chromosomes homologues (Figure 15), indépendamment de la taille des chromosomes (Darlington & Dark, 1932; Mercier et al. 2015; Fernandes et al., 2018), avec comme exemple en moyenne 2.6 COs pour le chromosome 3B du blé tendre *Triticum aestivum* faisant 1 Gb (Choulet et al. 2014) et de manière similaire 3 COs en moyenne pour le chromosome 1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* faisant 0.231 Mb (Chen et al. 2008).

Il existe une régulation du nombre total de COs par espèce. Ce phénomène appelé homéostasie des COs correspond au fait qu'un certain nombre de COs par méiose est requis et maintenu au sein d'une espèce afin d'assurer la bonne ségrégation de tous les chromosomes. L'homéostasie des COs est ainsi une résultante du CO obligatoire et du contrôle du nombre maximal de COs. Chez la majorité des espèces, il est observé 1 à 3 COs par paire de chromosomes homologues. Ainsi chez *A. thaliana*, pour les cinq paires de chromosomes homologues, il y a en moyenne 10 COs par méiose (Chelysheva et al. 2012, Underwood et al. 2018, Rowan et al. 2019).

Concernant les espèces présentant la plus forte fréquence de recombinaison, on peut citer la levure *Schizosaccharomyces pombe* qui ne présente que des COs de type non interférents (R. Snow, 1979) associé à une absence de complexe synaptonémal (Olson et al. 1978) avec en moyenne 15 COs par paire de chromosomes homologues (Munz et al. 1989). Actuellement le champignon et pathogène humain *Aspergillus fumigatus* est l'eucaryote présentant la plus forte fréquence de recombinaison avec en moyenne 29 COs par chromosome en absence d'interférence (Auxier et al. 2022).



Un autre niveau de contrôle de la fréquence de COs est celui de l'origine de la méiose. L'hétérochiasmie est la différence de recombinaison observée entre la méiose mâle et la méiose femelle au sein d'une même espèce. Le sens de cette différence est variable selon l'espèce considérée, avec par exemple plus de recombinaison lors de la méiose femelle chez l'hirondelle rustique *Hirundo rustica* (Malinovskaya et al. 2020), alors que chez *Arabidopsis thaliana* la voie mâle présente plus de recombinaison que la voie femelle (Giraut et al. 2011; Drouaud et al. 2007). Mais ceci n'est pas systématiquement retrouvé chez toutes les espèces, comme c'est le cas par exemple du maïs (Kianian et al. 2018) ou du colza (Kelly et al. 1997) où aucune différence n'a été observée entre les deux voies. L'exemple le plus extrême de l'hétérochiasmie est l'absence totale de chiasma (achiasmie) qui a lieu toujours chez le sexe hétérogamétique, ce qui suit la règle de Haldane-Huxley (Haldane 1922; Burt et al. 1991).

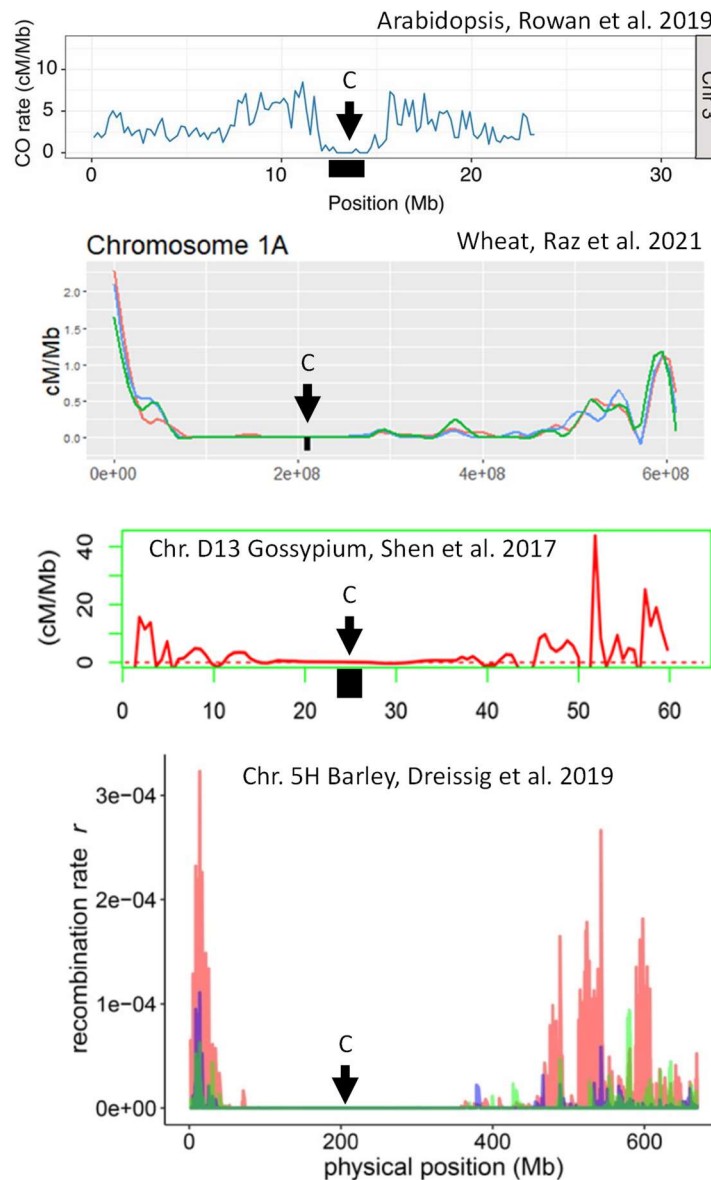


Figure 16 : Distribution de la recombinaison au sein de différentes espèces le long des chromosomes. Les axes x et y représentent respectivement la position physique le long des chromosomes considérés et le taux de recombinaison en cM/Mb. La position des centromères est indiquée par un bloc noir et une flèche noire surmontée de la lettre c. La distribution de la recombinaison est présentée pour le chromosome 3 *Arabidopsis thaliana* (d'après Rowan et al. 2019), pour le chromosome 1A du blé tendre (d'après Raz et al. 2021), pour le chromosome D13 du coton (d'après Shen et al. 2017) et pour le chromosome 5H de l'orge (d'après Dreissig et al. 2019).

Ainsi chez *Drosophila melanogaster* la voie mâle ne présente aucun CO ou chiasma même si les chromosomes homologues sont appariés grâce au complexe protéique Alternative Homolog Conjunction (Thomas et al. 2005; Adams et al. 2020). Les preuves de l'hétérochiasmie ont été obtenues soit en cytologie par le biais du dénombrement des chiasmata comme par exemple chez la plante *Delphinium ajacis* (Koul et al. 2020) ou par cartographie génétique comme par exemple chez *A. thaliana* (Girault et al. 2011).

Le mode de reproduction peut également avoir un impact sur la fréquence de recombinaison. En effet, les plantes autogames semblent présenter plus de recombinaison que les plantes allogames apparentées (Stebbins 1958, Grant 1958). Par ailleurs, la recombinaison semble de manière générale plus élevée chez la voie mâle comparé à la voie femelle chez les autogames (Lenormand & Dutheil, 2005).

### III.A.2. Distribution

La distribution des COs le long des chromosomes n'est pas homogène, avec des régions froides et des régions chaudes de recombinaison (Drouaud et al. 2006).

Chez plusieurs espèces près de 80% de la recombinaison a lieu dans moins de 25% du génome, avec soit une concentration de la recombinaison dans les régions péricentromériques comme *Arabidopsis thaliana* (Choi et al. 2013), soit une concentration dans les régions distales des chromosomes, comme chez le blé tendre *Triticum aestivum* (Saintenac et al. 2009, Raz et al. 2021), l'orge *Hordeum vulgare* (Dreissig et al. 2020), le maïs *Zea mays* (Kianian et al. 2018), le coton *Gossypium spp.* (Shen et al. 2017) ou encore l'humain (Myers et al. 2005), ces espèces possédant de larges génomes comparés à *Arabidopsis thaliana* (Figure 16).

Les chromosomes monocentriques sont principalement subdivisés en deux compartiments, la région proximale qui contient le centromère et le péricentromère et la région distale qui regroupe le bras chromosomique, le subtélomère et le télomère.





Les régions proximales des chromosomes (qui comportent les centromères et les péricentromères) sont définies par une chromatine de type hétérochromatique, qui est compactée, présentant des marques épigénétiques particulières telles que H3K9me2 (Naish et al. 2021), H2A.W (Yelagandula et al. 2014) et une très forte méthylation de l'ADN (Yelina et al. 2012). L'ADN de ces régions est riche en séquences répétées et relativement pauvre en gènes. A l'inverse, les régions distales des chromosomes sont définies par une chromatine de type « euchromatique », qui est décompactée et qui présente par exemple la marque épigénétique H3K4me3. L'ADN de ces régions est riche en gènes et pauvre en séquences répétées. Cet état de la chromatine est considéré comme transcriptionnellement active, les gènes présents étant très transcrits.

Les centromères sont les régions où le complexe du kinétochore se forme pour permettre l'ancrage physique des microtubules du fuseau méiotique, afin de ségréger les chromosomes lors de l'anaphase, aussi bien en mitose qu'en méiose. Les régions centromériques peuvent être définies de trois manières différentes : 1) Génétiquement, ces régions présentent une absence ou une très forte diminution de la fréquence de recombinaison comparée à la moyenne chromosomique (Copenhaver et al. 1999); 2) En termes de séquence, les régions centromériques sont définies par la présence de répétitions satellites spécifiques de ces régions comme CEN180 chez *Arabidopsis thaliana* (Copenhaver et al. 1999, Naish et al. 2021), CenBr1 et CenBr2 chez les *Brassica* (Harrison & Heslop-Harrison 1994, Xiong & Pires, 2011), CentO chez le riz (Cheng et al. 2002), CentC chez le maïs (Ananiev et al. 1998) ou encore Bilby chez le seigle (Francki 2005). Ces séquences satellites font entre 100 et 200 paires de bases et permettent l'ancrage de CENH3, comme démontré chez le riz pour CenO (Zhang et al. 2013) et chez *Arabidopsis thaliana* pour CEN180 (Nagaki et al. 2003), CENH3 étant le variant de l'histone H3 présent dans les centromères et qui permet l'assemblage du kinétochore (Collins et al. 2005). Ces régions chromosomiques comportent peu de gènes mais n'en sont pas totalement dépourvues (Copenhaver et al. 1999, Rousseau-Gueutin et al. 2020). Elles contiennent des rétrotransposons de type LTR comme démontré chez *Arabidopsis thaliana* où les centromères comportent des LTR de type ATHILA (Naish et al. 2021) ou encore chez le riz avec le rétroélément Huck (Ananiev et al. 1998).

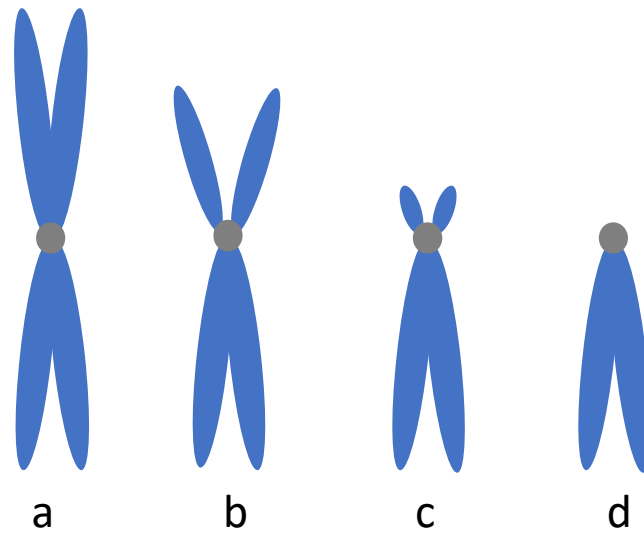


Figure 17 : Classification des chromosomes selon la position du centromère. Chromosome métacentrique (a), submetacentrique (b), acrocentrique (c) et télacentrique (d). Les bras chromosomiques sont colorés en bleu et le centromère est représenté par un disque gris. D'après Chowdhury et al. 2020.

Pour les chromosomes monocentriques, la position relative du centromère le long du chromosome permet une classification cytologique de ces derniers en différentes catégories, allant du chromosome métacentrique avec le centromère en position médiane, au chromosome télocentrique avec le centromère à une extrémité du chromosome (Figure 17).

Les péri-centromères sont les régions juxtaposant le centromère. Ils sont définis par une densité en gènes plus faible et une densité en séquences répétées plus élevée que la moyenne chromosomique (Yelina et al. 2012). Ces régions sont caractérisées par une forte méthylation de l'ADN et la présence de la marque histone hétérochromatique H3K9me2 (Zhang et al. 2008).

Les régions distales des chromosomes comportent les bras chromosomiques et les subtélomères (régions des bras chromosomiques les plus proches des télomères) concentrent la plus grande partie de la recombinaison chez de nombreuses espèces, telles que le blé (Saintenac et al. 2009). Les télomères correspondent à l'extrémité des chromosomes et chez *Arabidopsis thaliana*, ils sont caractérisés par des répétitions en tandem très importantes du motif (TTTAGGG)<sub>n</sub> (Richards & Ausubel 1988) qui semble conservé chez de nombreuses espèces comme par exemple les *Brassica* (Koo et al. 2011) ou encore le maïs (Richards & Ausubel 1988) et l'orge (Killian et al. 1995).

La distribution de la recombinaison observée chez les espèces possédant de larges génomes a permis de corréler la distribution de la recombinaison le long des chromosomes avec les différents territoires chromosomiques et leurs particularités. Ainsi la recombinaison a lieu préférentiellement dans les régions riches en gènes, pauvres en éléments répétés, de structure euchromatinienne avec relativement peu de méthylation de l'ADN comparé aux centromères. Une hypothèse pouvant expliquer qu'un mécanisme se soit mis en place pour prévenir la formation de COs dans les régions centromériques est que la présence d'échange de matériel génétique dans ces régions, qui forment la plateforme de recrutement du kinétochore, pourrait perturber la ségrégation des chromosomes et causer la formation de gamètes aneuploïdes (Nambiar & Smith 2016, Lamb et al., 2005; Rockmill et al., 2006).

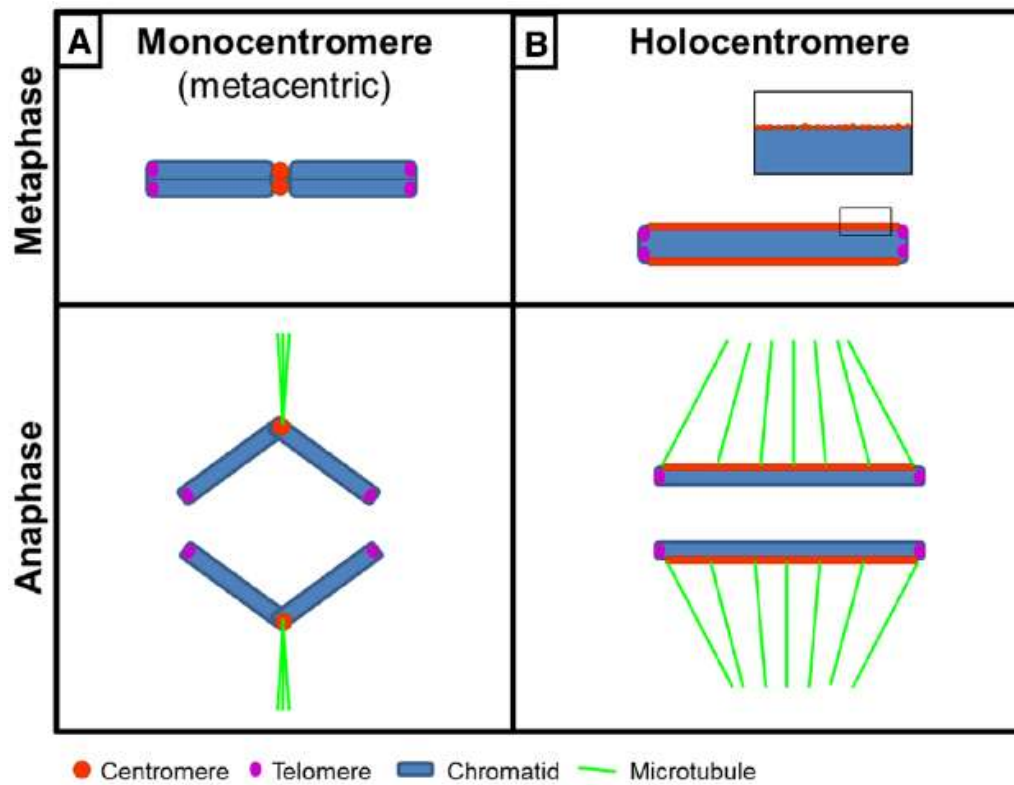


Figure 18 : Les deux grands types de chromosomes d'après la nature des centromères. (A) les chromosomes monocentriques ne présentent qu'un seul centromère qui est localisé le long des chromosomes. (B) les chromosomes holocentriques possèdent des centromères diffus le long des chromosomes (d'après Cuacos et al. 2015).

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de COs dans les centromères et péricentromères est que ces régions présentent moins de CDB que le reste du chromosome, comme observé chez *Arabidopsis* (Choi et al. 2018). Mais cela est en désaccord avec les données obtenues sur maïs où le nombre de CDB dans ces régions est inchangé comparé à la moyenne chromosomique, bien que la formation de COs soit inhibée dans ces régions chez cette espèce (He et al. 2017). Par ailleurs, chez la levure *S. pombe*, la formation de COs dans les régions proches du centromère est inhibée par la présence de la cohésine mitotique PSC3 au niveau des péricentromères lors de la méiose ce qui prévient la formation de CDB par SPO-11 dans ces régions (Nambiar & Smith 2018). Cependant, il reste à déterminer si ce mécanisme moléculaire est également retrouvé chez d'autres espèces.

Selon Haenel et al. (2018), l'absence de recombinaison au sein de la région proximale du chromosome semble être liée principalement à la taille des chromosomes. En étudiant les profils de recombinaison chez 62 espèces (animal, végétal et champignon), ils ont mis en évidence que la position du centromère le long des chromosomes avait peu d'importance sur le profil de recombinaison et qu'il était possible de retrouver une diminution de la fréquence de recombinaison au centre des chromosomes télocentriques et acrocentriques. Dans cette étude, ils émettent l'hypothèse que la forte fréquence de recombinaison observée aux extrémités des chromosomes est peut-être en lien avec l'appariement des chromosomes homologues qui commence par les régions distales (télomères) des chromosomes, ce qui pourrait laisser plus de temps aux CDB de se réparer en COs contrairement aux régions proximales. De plus, la formation précoce des COs dans les régions distales serait capable de prévenir la formation de COs plus loin sur le même chromosome via l'interférence.

En dehors des chromosomes monocentriques, il existe les chromosomes holocentriques, pour lesquels le centromère n'est pas localisé en un point mais diffus tout le long du chromosome ou présent sous la forme de plusieurs centres le long des chromosomes (Figure 18). Ces centromères sont fonctionnels comme le révèle la présence du variant d'histone CENH3 (Heckmann et al. 2014). Ce type de centromères permet l'attachement des microtubules tout le long des chromosomes lors de la métaphase de méiose ou de mitose. Le nématode *C. elegans* est une des espèces modèles pour l'étude du lignage et de la différenciation cellulaire, c'est également un modèle de l'étude des chromosomes holocentriques.



Chez ce vers, la méiose se déroule normalement en suivant les différentes phases, seul un CO est permis par paire de chromosomes homologues et la disjonction des chromosomes et chromatides sœurs est réalisée par un complexe protéique différent du système cohésine canonique (De Carvalho et al. 2008). Chez les plantes, ce type de centromère est souvent associé à une « méiose inversée », où la division réductionnelle a lieu avant la division équationnelle, ainsi la séparation des chromatides sœurs a lieu avant la séparation des chromosomes homologues (Whal 1940, Cabral et al. 2014). Ce type de centromères est apparu de manière indépendante à au moins 13 reprises au cours de l'évolution dans le lignage animal et végétal (Melters et al. 2012). Etant donné l'impact inhibiteur de la position du centromère sur la distribution de la recombinaison observée chez de nombreux organismes, il serait très intéressant d'étudier la distribution de la recombinaison chez les espèces possédant des chromosomes holocentriques et d'étudier l'impact de ces nombreux centromères sur la formation des COs à proximité de ces régions (Hofstatter et al. 2021).

A une échelle beaucoup plus fine, les COs ont lieu préférentiellement dans les régions de chromatine ouverte, caractérisée par les marques d'histones H3K4me3 et H2A.Z, une densité en nucléosome faible et une méthylation de l'ADN faible (Choi et al. 2013). Cette chromatine ouverte pourrait permettre un meilleur accès à l'ADN de la machinerie SPO11 pour réaliser les CDB, ce qui expliquerait que les COs colocalisent avec les hotspots de CDB SPO11 (Underwood et al. 2018). Cependant, chez le maïs, seul les hotspots de CDB SPO11 géniques sont enrichis en COs, ce qui peut être une spécificité du modèle maïs (He et al. 2017). Chez *Arabidopsis* et le maïs, les COs sont également localisés préférentiellement dans les séquences promotrices et terminatrices des gènes, caractérisées par ce type de chromatine (Choi et al. 2013, Kianian et al. 2018) tandis que chez la pomme de terre, l'ensemble du gène ainsi que son promoteur et 1kb après le site de terminaison de la transcription (TTS) semblent être des sites propices à la formation des COs (Marand et al. 2017).

Du point de vue global, les COs ont lieu préférentiellement dans les régions riches en gènes, tandis que les régions riches en éléments transposables (TEs) sont de manière générale pauvres en COs. Les TEs, découverts par Barbara McClintock en 1950, sont classés en deux grandes catégories selon leur mode de transposition, avec la classe I qui comprend les rétrotransposons qui se transposent selon un mode de « copier-coller » via un intermédiaire ARN et la classe II qui comprend les transposons à ADN qui se transposent via un mode de « couper-coller » (Wicker et al. 2007).





A une échelle plus fine, il y a de manière générale une corrélation négative entre la présence de TEs et de COs, bien qu'il existe des cas particuliers où certains TEs corréleraient de manière significative avec la présence de COs. Par exemple, il existe une corrélation négative entre la présence de clusters de TEs et la formation des COs, retrouvée chez le maïs (Fu et al. 2002). Également chez le maïs, l'insertion récente de rétrotransposons a été montrée comme inhibitrice de la formation de COs, liée principalement au fait que ces insertions récentes ont activé la machinerie de répression des TEs via la méthylation de l'ADN, ce qui a eu pour conséquence d'inhiber la formation de COs dans les régions génomiques à proximité de ces TEs (Donner & He, 2008 ; He & Dooner, 2009). Chez la pomme de terre, il existe une corrélation négative entre la recombinaison et les transposons de classe I mais une corrélation positive entre la recombinaison et la présence de transposons de classe II (Marand et al. 2017). Chez le blé tendre, l'analyse des séquences montre une plus forte fréquence de motifs de type transposon ADN TIR-Mariner dans les intervalles recombinants (Darrier et al. 2017). Chez l'humain, l'insertion de rétrotransposons de type Alu permet d'augmenter localement la fréquence de recombinaison dans une fenêtre de 2 kb autour de l'insertion (Whiterspoon et al. 2009). Et de manière similaire, chez le maïs l'insertion de TEs de type Mutador semble augmenter la fréquence de recombinaison localement (Yandeau-Nelson et al. 2005). La sélection différentielle des TEs est une théorie selon laquelle l'insertion d'un TE dans une région qui recombine peut entraîner, s'il y a un COs dans ce TE, une recombinaison ectopique, ce qui peut entraîner des remaniements chromosomiques importants et délétères qui seront contre sélectionnés au cours de l'évolution (Montgomery et al. 1991). Ainsi il existe actuellement une hypothèse selon laquelle il existe une coévolution entre les TEs et la recombinaison, où la sélection différentielle pousse les insertions des TEs vers les régions présentant peu de recombinaison. L'insertion des TEs en dehors de ces régions peu recombinogènes puis la répression par des mécanismes épigénétiques de ces TEs entraînent une diminution locale de la recombinaison (Kent et al. 2017).

Les hotspots de recombinaison correspondent à des petites régions de 1 à 2 kilobases centrées autour de CDB qui se réparent pendant la méiose en COs ou en NCOs (Mézard, 2006). Chez les mammifères la protéine PRDM9 (une histone-lysine triméthyltransferase) permet de réguler la distribution des CDB, ce qui impose la distribution des COs, comme chez les primates et la souris (Baudat et al. 2010, Myers et al. 2010).



Cette protéine reconnaît une séquence consensus lui permettant de se fixer à des sites spécifiques le long du génome et d'apposer la marque d'histone H3K4me3, ce qui réorganise la position des nucléosomes et permet la formation de CDB (Mihola et al. 2009). Aucun homologue de cette protéine ne semble exister chez les plantes (Choi et al. 2013), une sous-famille des protéines à domaine SET qui semble avoir été perdue chez les plantes (Zhang & Ma, 2012). Cependant il existe également des motifs nucléotidiques associés aux hotspots de recombinaison, avec notamment les régions AT riches et les répétitions de type CTT ou CNN (N étant A, C, T ou G) (Choi et al. 2013, Wijnker et al. 2013), le motif CTT étant retrouvé en aval du TSS au niveau des hotspots de recombinaison (Choi et al. 2013). Il est possible que le motif CTT soit reconnu par une des protéines de la machinerie de recombinaison, mais cela reste à déterminer (Choi & Henderson, 2015).

Les hotspots semblent être également dépendants du sexe de la méiose, avec 15% et 60% des hotspots qui sont uniques chez un sexe chez l'humain et les bovins respectivement (Kong et al. 2010, Ma et al. 2015). Chez le maïs, les COs ont tendance à former des clusters au niveau du site d'initiation de la transcription (TSS) lors de la méiose femelle et plutôt 400bp en amont du TSS lors de la méiose mâle (Kianian et al. 2018).

Enfin, l'interférence régule localement la position des COs en imposant un espacement minimal entre deux COs de type I (voir interférence partie I.B.4.).

La domestication semble également avoir un impact sur la distribution de la recombinaison. Par exemple chez l'orge, il a été observé une concentration des COs dans les régions distales des chromosomes des populations domestiquées comparées aux populations sauvages (Dreissig et al. 2019). Tandis que chez la tomate, la domestication semble avoir modifié plus ponctuellement la distribution de la recombinaison, notamment en changeant la position des hotspots de recombinaison, avec une disparition de ces hotspots dans des régions hétérochromatiques chez les populations cultivées comparées aux populations sauvages (Fuentes et al. 2021). Cependant, des résultats antérieurs basés sur le nombre de chiasmata semblait indiquer une augmentation de la recombinaison chez les plantes domestiquées comparées à leur progéniteurs sauvages (Ross-Ibara, 2004).

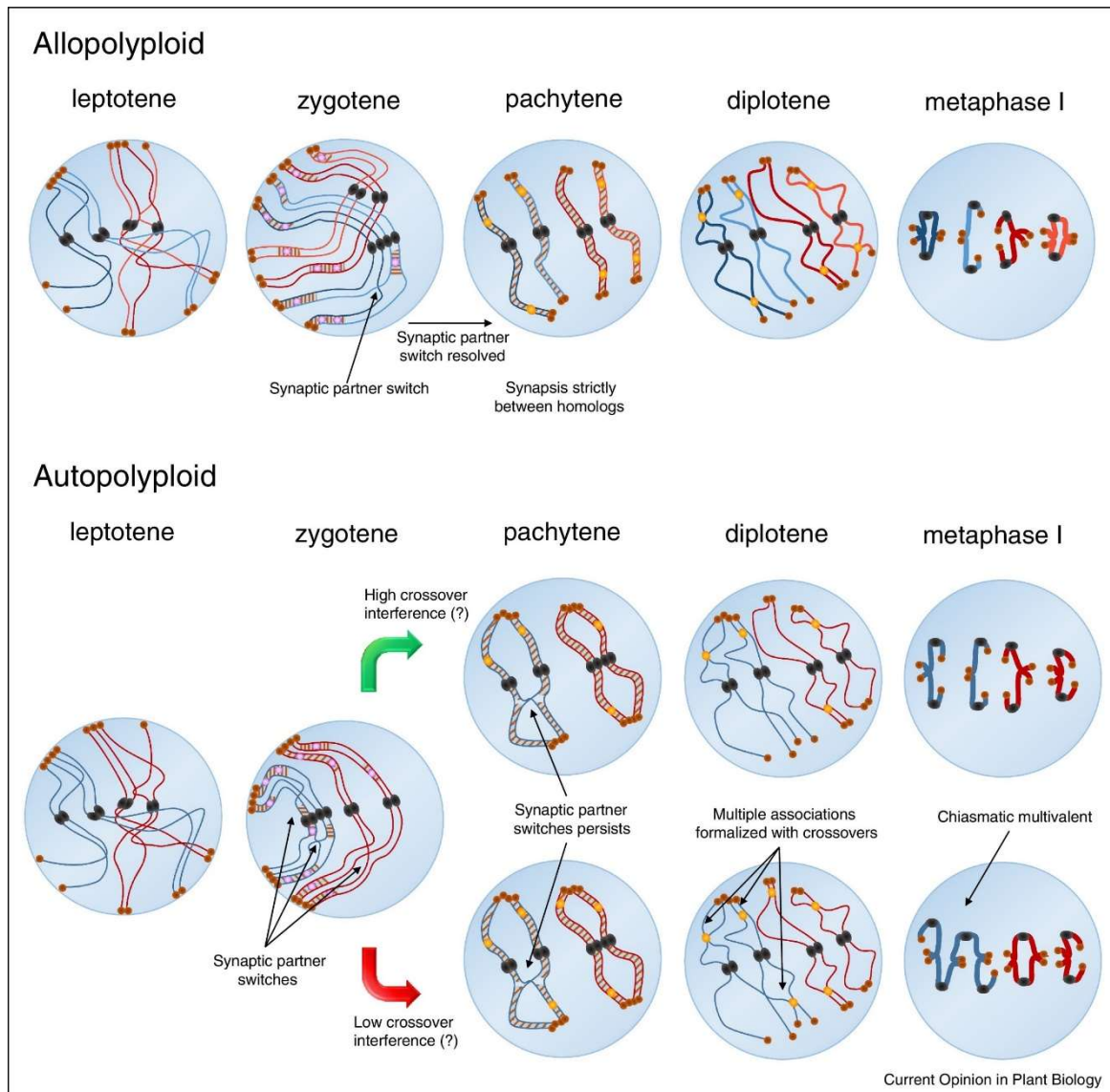


Figure 19 : Représentation graphique de l'appariement des chromosomes lors de la méiose chez des allopolyploïdes et des autopolyploïdes. (D'après Lloyd & Bomblies 2016).

### *III.A.3. Régulation de la recombinaison chez les polyploïdes*

#### *III.A.3.a. La polyploïdie*

La polyploïdie correspond au fait d'avoir plus de deux copies du génome. De nombreuses espèces d'intérêt agronomiques telles que le blé, le coton, la pomme de terre, le colza ou encore le bananier sont des espèces polyploïdes (Leitch & Leitch, 2008). La polyploïdie est un phénomène courant au cours de l'histoire évolutive des plantes mais qui est également présent chez les animaux (Van de Peer et al. 2017). Les polyploïdes peuvent être classés en deux grandes catégories selon la nature des génomes présents au sein de ces espèces, les autopolyploïdes et les allopolyploïdes.

Les autopolyploïdes sont des individus possédant plus de deux copies d'un même génome. Chez les plantes, on peut notamment citer *Arabidopsis arenosa*, la pomme de terre ou encore le bananier. Les allopolyploïdes sont des individus qui possèdent au moins deux sous génomes plus ou moins distants phylogénétiquement l'un de l'autre. Par exemple chez les plantes on peut citer le caféier, le coton, le blé ou encore le colza.

Il existe également des niveaux de polyploïde particuliers tels que les autoallopolyploïdes qui ont une partie de leur génome en deux copies et un génome d'une espèce apparentée, tels que les hybrides AAAACC chez les *Brassica* (McNaughton, 1973). Il existe plusieurs mécanismes de formation des polyploïdes qui ne seront pas explicités dans ce manuscrit mais qui sont notamment disponibles dans les deux revues suivantes : Pelé et al. 2018 et Gonzalo 2022. A une échelle de temps évolutive plus importante (plusieurs millions d'années), les polyploïdes retournent à un niveau diploïde via des réarrangements structuraux (Wendel, 2015). Ainsi des espèces diploïdes peuvent être des paléopolyploïdes tel que *Brassica rapa* (Wang et al. 2011) et *Brassica oleracea* (Parkin et al. 2014), qui sont considérées comme des paléohexaploïdes car ces espèces ont été sujettes à deux évènements proches de duplication de génome il y a environ 15-20 millions d'années.

#### *III.A.3.b. Autopolyploïdes*

Chez l'autotétraploïde *Arabidopsis arenosa*, il a été observé qu'au cours de son évolution, il y avait eu une réduction du nombre de COs afin de limiter le nombre de multivalents et d'assurer une ségrégation équilibrée des chromosomes dans les gamètes (Figure 19). Cette diminution de COs est médiée par une augmentation de la force de l'interférence (Morgan et al. 2021).



### III.A.3.c. Allopolyploïdes

Chez les allopolyploïdes, il est important que les COs aient lieu entre chromosomes homologues et non avec leur homéologue, afin d'éviter la formation de gamètes aneuploïdes, ne contenant pas chaque chromosome parental à l'état de copie unique (Figure 19). Il existe naturellement des locus capables de contrôler la recombinaison entre chromosomes homéologues chez les allopolyploïdes. L'exemple le plus étudié étant le locus Ph1 qui existe chez les blés polyploïdes (Rey et al. 2018). Le locus Ph1 correspond à une délétion de 70 Mb, soit un peu plus de la moitié de la taille du génome d'*Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Il est situé sur le bras long du chromosome 5B du blé tendre et du blé dur (Riley & Chapman, 1958, Sears & Okamoto, 1958). Ce locus est capable de réguler la recombinaison entre les chromosomes homéologues, via la promotion du synapsis entre les chromosomes homologues lors du stade bouquet et par la dissolution de djH entre chromosomes homéologues (Martin et al. 2014, Martin et al. 2017). L'activité du locus Ph1 serait en lien avec une activité de type CDK2 (Greer et al. 2012) et la présence d'une copie du gène ZYP4 appartenant à la machinerie ZMM de formation des COs (Rey et al. 2018). Par ailleurs, le locus Ph2 est une autre région génomique ayant un effet plus modéré sur les appariements homéologues. Le gène causal serait celui codant pour la protéine MSH7 appartenant à la famille des protéines MMR (Serra et al. 2021).

De manière similaire, le locus PrBn (pour Pairing Regulator in *Brassica napus*) du colza, localisé sur le chromosome C09, contrôle les appariement homéologues. Celui-ci a été observé en utilisant une descendance haploïde (AC,  $2n=1x=19$ ) en ségrégation issue d'un hybride F1 produit par croisement entre deux variétés, l'une présentant un taux faible et l'autre un taux fort d'appariement entre chromosomes homéologues A et C (on parle ici d'appariement allosyndétique) (Jenczewski et al. 2003, Liu et al. 2006). La région homéologue à PrBn (située sur le chromosome A09) contient le locus BnaPh1 qui contrôle également la recombinaison entre les chromosomes homéologues (Higgins et al. 2021, Sourdille & Jenczewski 2021). Cette dernière a été mise en évidence à partir d'une descendance issue d'un hybride produit par croisement entre un colza resynthétisé et un colza naturel.





### III.B. Modification de la recombinaison homologue

La recombinaison méiotique est très finement contrôlée génétiquement mais peut également être plastique sous différentes contraintes. Ainsi il est possible de modifier la fréquence et/ou la distribution de la recombinaison en jouant sur différents facteurs : âge de la plante, traitements chimiques, modifications des allèles ou de dosage de gènes anti ou pro-crossover.

#### *III.B.1. Modification de la fréquence de recombinaison*

##### III.B.1.a. Facteurs externes

Bien que la recombinaison soit soumise à un contrôle homéostatique, le nombre de COs peut être plastique sous l'effet de facteurs externes tels que les stress environnementaux (Modliszewski & Copenhaver, 2017).

#### **Traitements chimiques**

Il existe une grande diversité de composés chimiques affectant la fréquence de crossovers. Une grande quantité de composés a été étudiée chez la tomate (Griffing & Langridge, 1963) et chez la Drosophile (Würgler, 1991). Cependant les effets de ces composés semblent variables selon le traitement utilisé et les espèces étudiées. On peut citer par exemple la caféine, qui semble diminuer la fréquence de recombinaison chez la tomate (Griffing & Langridge, 1963) tandis que ce traitement est capable d'augmenter la fréquence de recombinaison chez la Drosophile (Yefremova & Filippova 1974). Par ailleurs, le type de voie de COs impliquée dans ces modifications de la fréquence de recombinaison et l'impact sur la distribution de la recombinaison reste à élucider (Fuchs et al. 2018).

#### **Traitements physiques**

Il est également possible d'augmenter le nombre de COs par des agents physiques tel que les irradiations gamma, qui sont capables d'augmenter la fréquence de COs chez la souris (Cai et al. 2011).



III.B.1.b Age des plantes

L'âge des plantes semble être un facteur capable de moduler la fréquence de recombinaison. Les premières études semblaient indiquer une diminution de la fréquence de recombinaison pour un intervalle sur le chromosome 4 avec l'âge grandissant des plantes chez la tomate (Griffing & Langridge, 1963). Une étude plus récente semble au contraire indiquer que l'âge des plantes induit une augmentation de la fréquence de recombinaison, bien que cette augmentation ne soit significative que dans quatre des neuf intervalles génomiques étudiés (Li et al. 2017).

III.B.1.c. Allèles et dosage de certains gènes**La modification du nombre de CDB**

L'augmentation du nombre de CDB ne semble pas modifier la fréquence de COs chez *Arabidopsis* (Varas et al. 2015). Cependant, la diminution du nombre de CBD via l'utilisation d'un mutant hypomorphe (ayant une activité plus faible que le sauvage) de SPO11 a été associée positivement et significativement avec une diminution de la fréquence de recombinaison, 9.5 vs 8.2 foci MLH1 pour le WT et le mutant respectivement (Xue et al. 2018). Par ailleurs, chez la levure *S. cerevisiae*, la diminution du nombre de CDB via un mutant similaire ne modifie pas le nombre de COs chez cette espèce (Martini et al. 2006). Cette différence peut être une véritable différence biologique inhérente à une différence évolutive entre les deux espèces ou à une différence liée à la méthodologie de ces études, avec une estimation de la fréquence de COs par immunomarquage MLH1 chez *Arabidopsis* et une estimation de la fréquence de recombinaison sur huit intervalles distribués sur trois chromosomes par l'analyse des tétrades chez la levure. Chez la levure *S. cerevisiae*, le ciblage d'un locus précis de SPO11 permet de générer *de novo* des hotspots de recombinaison (Pecina et al. 2002; Acquaviva et al. 2013; Sarno et al. 2016), cependant le ciblage de MTOPVIB (le partenaire de SPO11 lors du clivage de la CDB) au niveau d'un hotspot de recombinaison chez *Arabidopsis* ne semble pas suffisant pour augmenter significativement la formation de COs (Yelina et al. 2021). L'impact sur la recombinaison du ciblage de SPO11 chez le riz est actuellement en cours d'étude (Fayos et al. 2019).



### Les gènes pro-COs

Chez *Arabidopsis thaliana* il a été montré qu'il existait des variants naturels capables de modifier la fréquence de recombinaison, avec par exemple le gène HEI10. Un des variants naturel de ce gène présent au sein de l'écotype Landsberg erecta (et étant l'allèle le plus fréquent au sein de l'espèce *A. thaliana*) possède une mutation ponctuelle, par rapport à la référence Columbia, changeant l'acide aminé 264 d'une glycine en arginine (R264G). Cette modification d'acide aminé est responsable d'une augmentation de la fréquence de recombinaison d'un facteur 1,3 sur l'intervalle FTL 420 (Ziolkowski et al. 2017). Par ailleurs, il semble que ce gène HEI10 possède aussi un effet de dosage. Une augmentation du nombre de copies de ce gène avec son promoteur natif est capable d'augmenter la fréquence de recombinaison d'un facteur 2,7, comme démontré chez *Arabidopsis thaliana* qui ne possède naturellement qu'une copie de ce gène (Ziolkowski et al. 2017, Serra et al. 2018). Cette augmentation de la fréquence de recombinaison n'a lieu que dans les régions euchromatiques, sans modification de la distribution de la recombinaison (Ziolkowski et al. 2017). D'une manière similaire, une diminution du nombre de copies de HEI10 est capable d'induire une diminution de 40% du nombre de COs chez *Arabidopsis* (Morgan et al. 2021).

### Les gènes anti-COs

Une série de gènes ont été identifiés comme faisant partie de la classe des anti-COs, qui biaisent la résolution des D-loop vers des événements de NCOs. Le KO de ces gènes, décrits ci-dessous, induit de manière générale une augmentation des COs de classe II (minoritaires et non interférents).

#### FANCM

Chez *Arabidopsis*, le KO de FANCM (Fanconi Anemia Complementary group M) permet de rétablir un phénotype mutant zip4 déficient pour les COs de classe I en augmentant la fréquence de COs de classe II. Ce KO permet une augmentation de la fréquence de COs d'un facteur 3 en moyenne uniquement en contexte homozygote (Crismani et al. 2012). La voie anti-COs FANCM semble conservée au sein des Brassica, le KO de FANCM permettant également d'augmenter la fréquence de recombinaison chez *B. rapa* et *B. napus* (Blary et al. 2018). Cependant, chez le blé dur, le knock-down (KD) de FANCM par la méthode VIGS ne semble pas permettre de modifier la fréquence de recombinaison, au moins sur trois intervalles génomiques du chromosome 1A étudiés (Raz et al. 2021).



FIGL1 & FLIP

FIGL1 (Girard et al. 2015) et sa protéine partenaire FLIP (Fernandes et al. 2018) sont des protéines capables de lier DMC1 et RAD51 et de dissocier la structure D-loop, prévenant ainsi l'invasion de l'ADN simple brin sur la matrice ADN du chromosome homologue. Le KO de FIGL1 induit une augmentation de la fréquence de recombinaison de 72% sur six intervalles génomiques (Girard et al. 2015), tandis que le simple KO de FLIP induit une augmentation de la fréquence de recombinaison plus modérée de 15 à 40% sur quatre des six intervalles étudiés (Fernandes et al. 2018).

RECQ4, RMI1 et TOP3 $\alpha$ 

Les hélicases RECQ4 et la topoisomérase RMI1 et TOP3 $\alpha$  sont responsables de la déstructuration de la structure D-loop et le KO de ces gènes chez Arabidopsis induit une augmentation de la fréquence de recombinaison d'un facteur 1,5 à 6. Plus précisément, le double KO des copies recQ4a et recQ4b induit une augmentation de la fréquence de COs d'un facteur 6,2, sur quatre intervalles génomiques (Séguéla-Arnaud et al. 2015). Le KO de TOP3 $\alpha$  induit une augmentation d'un facteur 1,5 en moyenne sur 5 intervalles génomiques (Séguéla-Arnaud et al. 2015), tandis que le KO de RMI1 induit en moyenne une augmentation d'un facteur trois (Séguéla-Arnaud et al. 2016)

La combinaison des différents KO de FANCM, FIGL1, et RECQ4 induit toujours une augmentation de la fréquence de recombinaison, la meilleure combinaison étant le double KO des gènes RECQ4 et FIGL1 qui est capable d'induire une augmentation de la fréquence de recombinaison d'un facteur 7,8 chez Arabidopsis (Fernandes et al. 2018)

D'autre part, le KO de RECQ4 et FANCM a également été réalisé chez des plantes cultivées telles que la tomate, le riz et le pois, avec de manière similaire une augmentation de la fréquence de recombinaison qui pouvait aller jusqu'à un facteur  $\sim 3$  (Mieulet et al. 2018, Maagd et al. 2020).

**Combinaison de la voie pro et anti-COs**

Il est possible de combiner les modifications de ces deux voies afin d'augmenter de manière drastique la fréquence de recombinaison. Ainsi Serra et al. (2018) ont montré qu'en combinant l'ajout de copies HEI10 avec le KO des copies du gène RECQ4 permettait d'augmenter d'un facteur 4,1 la fréquence de recombinaison à l'échelle du génome. Chez ce dernier mutant, le nombre de CDB n'est pas modifié mais l'intensité de l'interférence semble diminuée.





### III.B.1.d. Polyploïdie

Chez les plantes, l'augmentation du niveau de ploïdie semble être associée à une augmentation de la fréquence de recombinaison entre chromosomes homologues. Ainsi le passage d'un niveau diploïde à un niveau allotétraploïde semble augmenter en moyenne d'un facteur deux la fréquence de recombinaison chez le coton (Brubaker et al. 1999, Desai et al. 2006), *Arabidopsis* (Pecinka et al. 2011) et *Brassicoraphanus* (Park et al. 2020). Chez le blé, la comparaison entre la fréquence de recombinaison chez le diploïde *Ae. tauchii* (DD,  $2n=2x=14$ ) et ce même génome D dans un contexte allohexaploïde au sein d'un blé synthétique (AABBDD,  $2n=6x=42$ ) montre une augmentation d'un facteur 2,3 en moyenne (Wan et al. 2021). De manière similaire le passage d'un niveau diploïde à un niveau autotétraploïde semble augmenter la fréquence de recombinaison d'un facteur deux chez *Arabidopsis* (Pecinka et al. 2011). Cette dernière étude a pris le soin d'utiliser des autotétraploïdes stabilisés présentant une méiose stable après trois générations d'autofécondation.

Par ailleurs, chez un autotétraploïde de la levure *S. cerevisiae*, une augmentation de la fréquence de recombinaison a été observée en lien avec une diminution de la force de l'interférence et une augmentation du nombre de CDB (Fang et al. 2021).

### Aneuploïdie

La présence de chromosomes surnuméraires semble capable de modifier la fréquence et la distribution de COs. Par exemple chez *Lolium perenne*, la présence de deux chromosomes de type B induit une diminution de la fréquence des chiasmata au niveau global mais permet la formation de COs dans les régions péri-centromériques (Harper et al. 2018).

### Univalents

Chez les plantes *Hypochoeris radicata* (Parker, 1975) et *Crepis capillaris* (Tease & Jones, 1976), la présence d'univalents semble capable d'augmenter la fréquence de recombinaison sur les autres chromosomes capables de former des bivalents. Des résultats similaires ont été obtenus chez le nématode *C. elegans*. La présence de la paire de chromosomes sexuels sous forme d'univalents induit un retard de la prophase qui est associée à une augmentation de la fréquence de recombinaison sur les autres chromosomes (Carlton et al. 2006). Ces résultats semblent indiquer qu'il existe un mécanisme compensatoire (peut être en lien avec l'homéostasie) qui reste à déterminer.



### *III.B.2. Modification de la distribution de la recombinaison*

#### *III.B.2.a. Marques histones*

Les gènes CMT2 et CMT3 (pour chromométhylase 2 et 3) codent pour des protéines capables de reconnaître les marques histones H3K9me2 et de méthyliser l'ADN associé dans le contexte CHH et CHG (Stroud et al. 2013). Les protéines SUVH5 et SUVH6 (pour suppressor of variegation homolog 5 et 6) associées à la protéine KYP (pour kryptonite, également appelée SUVH4) reconnaissent les cytosines méthylées et méthylent l'histone H3 au niveau de sa lysine 9 (H3K9) (Stroud et al. 2013). Ainsi ces deux systèmes interviennent comme une boucle de rétrocontrôle pour assurer le maintien de la méthylation de l'ADN de type non-CG et l'apposition de la marque d'histone H3K9me2. Le KO de CMT3 induit une diminution de la méthylation dans les contextes CHG et CHH ainsi qu'une augmentation de la fréquence de recombinaison au niveau des régions péri-centromériques et centromériques au détriment des bras chromosomiques, sans changer la fréquence globale de recombinaison. Et le KO *kyp/suvh5-6* induit une diminution de la méthylation de type CHG et CHH. Comme pour le KO CMT3, la perte de méthylation dans ce contexte induit une augmentation de la fréquence de COs dans l'intervalle péri-centromérique du chromosome 3 d'*Arabidopsis* (Underwood et al 2018).

#### *III.B.2.b. La voie de neddylation*

Le gène AXR1 code pour une enzyme E1 de la voie de modification post-traductionnelle de neddylation/rubylation. Le KO de ce gène induit une perturbation du synapsis associée à une perte du CO obligatoire. Cette modification des COs n'induit pas de changement de fréquence des COs de classe I mais plutôt une relocalisation des COs qui est associée à une modification de l'interférence (Tagliaro-Jahns et al. 2014). Cette relocalisation des COs observée cytologiquement par immunomarquage de la protéine HEI10 a été confirmée par cartographie génétique, avec l'observation d'une remobilisation des COs depuis les régions péri-centromériques vers les régions distales des chromosomes. Ceci est découplé à l'effet du KO AXR1 sur la méthylation de l'ADN de type CHH (Christophorou et al. 2020).

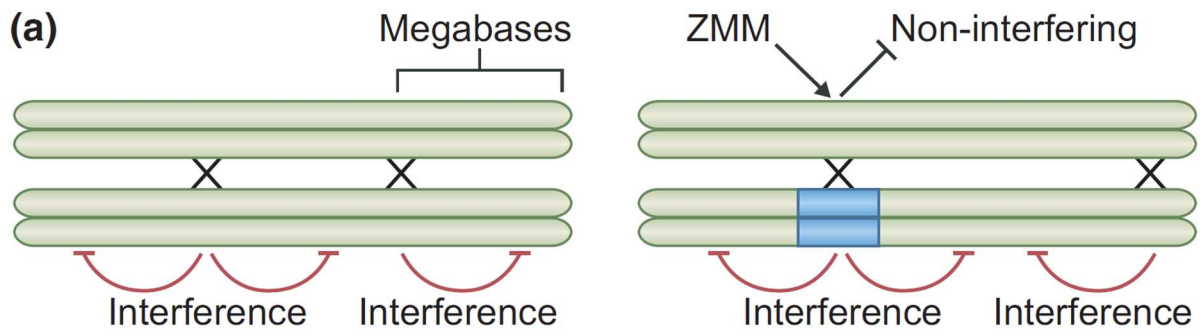


Figure 20 : La juxtaposition de régions homozygotes et hétérozygotes induit une redistribution des COs de classe I dans la région hétérozygote, induisant via l'interférence une diminution du nombre de COs dans les régions homozygotes adjacentes (d'après Ziolkowski & Henderson, 2017).

### III.B.2.c. La kinésine PSS1

La protéine PSS1 appartient à la famille des kinésines impliquée dans les mouvements moléculaires en lien avec le réseau de microtubules. Chez le mutant KO de PSS1, le synapsis est perturbé, cependant le nombre de COs total est similaire à celui d'un individu sauvage. Ainsi les COs se clusterisent au niveau des régions synapsées qui se situent en position distale des chromosomes (Duroc et al. 2014).

### III.B.2.d. Polymorphisme SNP et hétérozygotie

MSH2 est une protéine qui appartient au groupe de protéine du système MMR (MisMatch Repair), et qui est impliquée dans la réparation de l'ADN suite à la présence de nucléotides non complémentaires au sein d'une hélice d'ADN (Kunkel & Erie, 2005). Le KO de MSH2 induit une augmentation de la fréquence de recombinaison de 40% chez *Arabidopsis* sur un intervalle génomique (Emmanuel et al. 2006). De manière intéressante cette modification de la fréquence de recombinaison est variable selon qu'il s'agisse d'un fond homozygote ou hétérozygote. Une étude à l'échelle de l'ensemble du génome de l'effet du KO de MSH2 a montré que cette augmentation de la fréquence de recombinaison était d'avantage liée à une redistribution de la recombinaison depuis les régions centromériques vers les régions distales des chromosomes (Blackwell et al. 2020). Chez *Arabidopsis*, les régions centromériques sont des régions présentant un polymorphisme SNP important, MSH2 est ainsi capable de promouvoir la formation de COs dans ces régions (Blackwell et al. 2020).

A l'échelle du kilobase, les COs ont lieu préférentiellement dans les régions riches en SNP jusqu'à un certain seuil (Blackwell et al. 2020), tandis qu'à l'échelle du mégabase les COs ont lieu indépendamment de la densité en SNP et corrèle davantage avec l'état d'ouverture de la chromatine (Lian et al. 2022).

Par ailleurs, à une échelle locale, le polymorphisme est capable de jouer sur la distribution de la recombinaison. Par exemple la juxtaposition de régions hétérozygotes et homozygotes le long d'un chromosome a été montré chez *Arabidopsis thaliana* comme capable de modifier localement la distribution de la recombinaison sans modifier la fréquence globale de la recombinaison (Ziolkowski et al. 2015, Figure 20). La région hétérozygote semble capable d'attirer préférentiellement les COs de type I via l'intervention de MSH2 (Blackwell et al. 2020), ce qui, via l'interférence, appauvrit les régions adjacentes en COs.

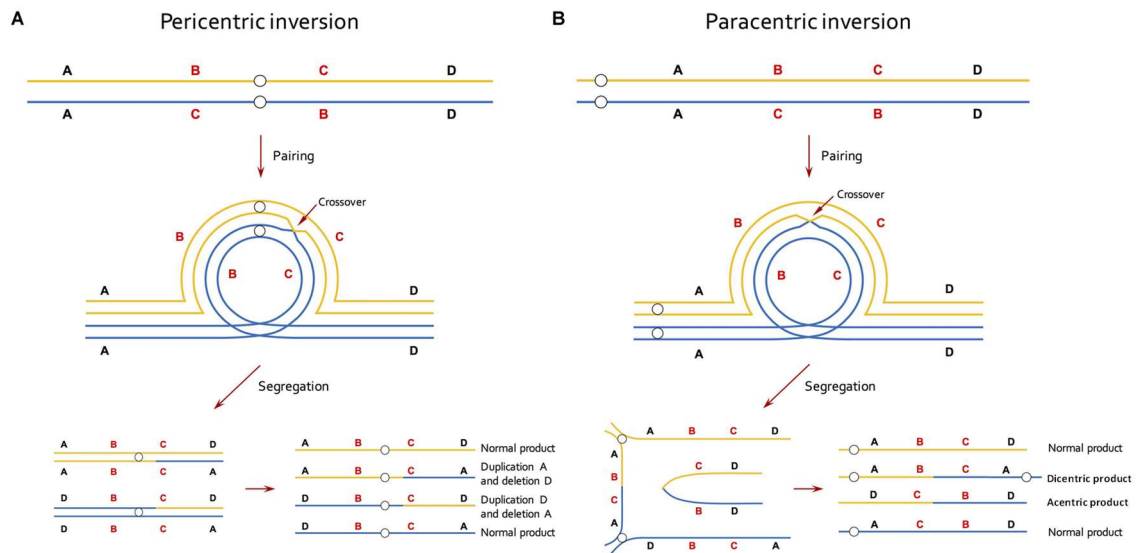


Figure 21 : La position d’une inversion chromosomique par rapport au centromère induit la formation de gamètes possédant des anomalies chromosomiques différentes (adapté de Huang & Rieseberg, 2020).

### III.B.2.e Les variations structurales

Les variations structurales correspondent à des différences locales en termes de séquence nucléotidique entre deux chromosomes homologues.

Ainsi parmi ces variations structurales on retrouve, les inversions chromosomiques, les translocations, les transpositions et les insertions/délétions (Rowan et al. 2019).

Ces variations structurales peuvent être retrouvées entre des espèces très proches phylogénétiquement comme chez le tournesol (Rieseberg, 2001), ou encore entre des variétés ou des écotypes d'une même espèce, comme chez les *Brassica* (Kinian & Quiros 1992, Boutte et al. 2020), le soja (Liu et al. 2020) ou encore chez *Arabidopsis thaliana* (Fransz et al. 2016).

Certaines variations structurales sont capables de prévenir la formation de COs dans ces régions à l'état hétérozygote, en particulier les inversions chromosomiques, les translocations et les transpositions chez *Arabidopsis* (Rowan et al. 2019).

#### Inversions chromosomiques

En 1921, Sturtevant a montré qu'il existait des variations structurales telles que l'ordre génétique de marqueurs est différent entre deux espèces proches de *Drosophiles*, correspondant à des inversions chromosomiques. A l'état hétérozygote, ces variations structurales ne permettent pas la formation de COs chez l'hybride F1. Plus précisément, si des COs se forment dans de telles régions, cela aboutit à la formation de gamètes portant des anomalies chromosomiques qui sont souvent létales pour le développement du futur zygote. Ainsi, les inversions chromosomiques empêchent la formation de COs via la production de gamètes qui donneront des zygotes non viables.

Les inversions chromosomiques sont classifiées en deux grandes classes, selon la position de l'inversion par rapport au centromère et l'impact de la formation de COs dans ces régions sur la structure des chromosomes (Figure 21). Il faut noter que la présence de recombinaison dans ces régions inversées impacte les régions adjacentes et non l'inversion en elle-même dans les gamètes produits.

Chez la *Drosophile*, la présence d'inversion chromosomique induit une augmentation de la fréquence de COs sur les autres chromosomes (Crown et al 2018).

Les inversions paracentriques correspondent à des inversions qui sont éloignées des centromères. La formation de COs dans des inversions de cette classe aboutit à la formation de gamètes équilibrés mais portant des chromosomes dicentrique ou acentrique pour les chromosomes portant l'inversion (Figure 21).



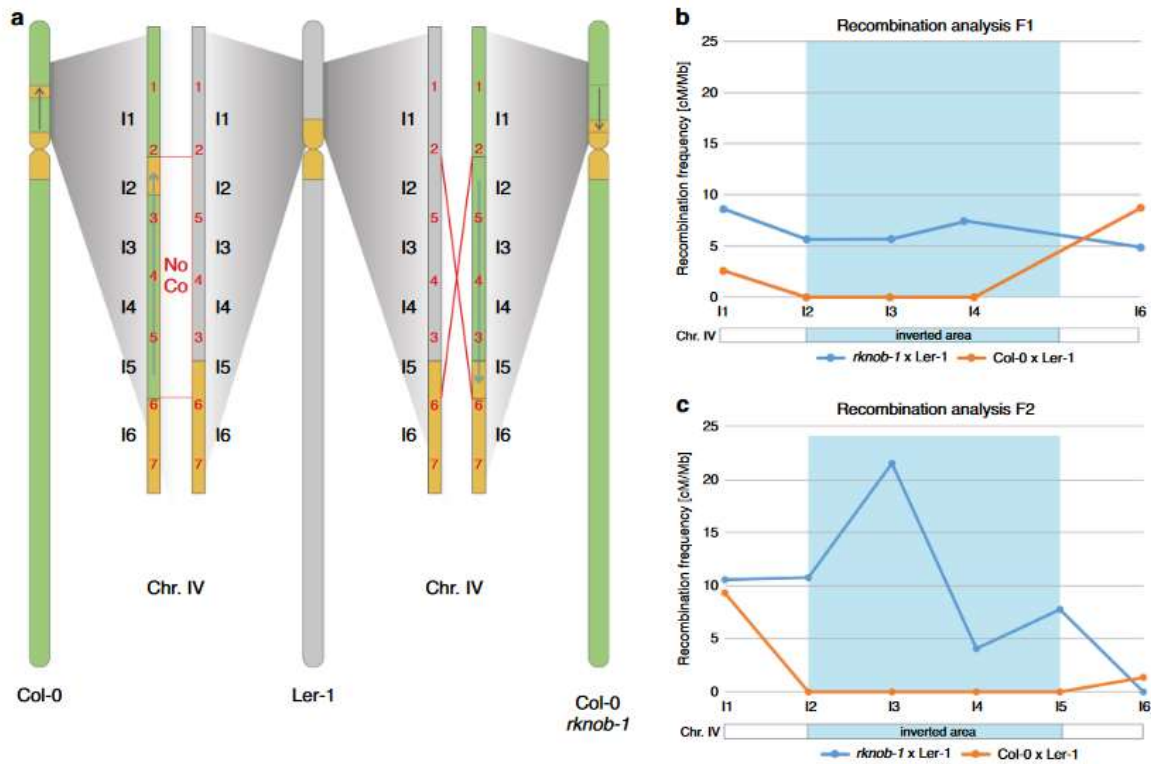


Figure 22 : L'inversion d'une inversion chromosomique par la technologie CRISPR/Cas9 permet de rétablir la recombinaison méiotique dans cet intervalle génomique. (a) Les écotypes Columbia (*Col-0*) et Landsberg erecta (*Ler*) présentent une inversion chromosomique sur le bras court du chromosome 4, cette inversion peut être inversée chez *col-0* via CRISPR/Cas9 (*Col-0 rknob-1*). L'inversion prévient la formation de COs entre *Col-0* et *Ler* mais la recombinaison peut avoir lieu lorsque cette région est inversée de nouveau (*Col-0 rknob-1* x *Ler*) aussi bien en F1 (b) qu'en F2 (c). D'après Schmidt et al. 2020.

L'inversion paracentrique la mieux étudiée étant celle présente sur le bras court du chromosome 4 d'*Arabidopsis thaliana* entre les écotypes Columbia et Landsberg erecta. Des études cytogénétiques ont pu montrer que cette région knob couvrant 1,17 Mb était capable de s'apparier mais pas de former de synapsis (Ji 2014, Fransz et al. 2016).

Récemment un lien direct entre la présence d'une inversion paracentrique et l'absence de recombinaison a été réalisé chez *Arabidopsis*. En utilisant la méthodologie CRISPR/Cas9, Schmidt et al (2020) ont réussi à changer l'orientation d'une inversion chromosomique de 1.17 Mb ce qui a permis de rétablir la capacité de cette région à former des COs au sein d'un hybride issu du croisement entre les écotypes Columbia et Landsberg erecta (Figure 22). La réorientation d'une inversion chromosomique a également été réalisée par cette technologie chez le maïs pour une région de 75 Mb (Schwartz et al. 2020).

Les inversions péricentriques sont des inversions où le centromère est présent au sein de la région. La présence de COs dans ces régions aboutira à la formation de gamètes équilibrées mais pour lesquels les chromosomes portant l'inversion auront des délétions ou des duplications des régions adjacentes à l'inversion (Figure 22).

### Translocation et transposition

Les translocations correspondent à des échanges entre régions génomiques entre chromosomes. Elles peuvent être réciproques ou non réciproques, dans ce dernier cas une région génomique est perdue et remplacée par une région ainsi en deux exemplaires. Les transpositions correspondent au déplacement d'une portion d'un chromosome à un autre endroit de ce même chromosome. Ces deux types de variations structurales sont responsables d'une diminution significative de la recombinaison dans le cas où cette région est à l'état hétérozygote au sein d'un hybride F1, comme démontré chez *Arabidopsis* par exemple (Rowan et al. 2019).

### *III.B.3. Modification simultanée de la fréquence et de la distribution*

#### III.B.3.a. Température

L'effet de la température semble variable selon les espèces et les températures étudiées. L'estimation de la recombinaison par le comptage des chiasmata a montré qu'une augmentation de la température était associée à une diminution du nombre de chiasma chez le blé (Bayliss & Riley, 1972) et chez l'orge (Higgins et al. 2012).



Un optimum de recombinaison semble exister à une température donnée et tout changement (augmentation ou diminution) de la température semble induire une augmentation de la fréquence de recombinaison, d'après les données obtenues chez *Arabidopsis* (Lloyd et al. 2018) et le blé (Coulton et al. 2020). Si la température dépasse un certain seuil cela semble entraîner une déstabilisation de la recombinaison comme observé chez le blé au-dessus de 23°C (Bayliss & Ridley 1972, Coulton et al. 2020) ou encore chez l'ail à 35°C (Lloyd, 1989). Dans cette dernière étude, la température semble perturber fortement le synapsis des chromosomes. Les effets de la température sur la recombinaison semblent variables selon le locus considéré chez *Arabidopsis* (De Storme & Geelen, 2020) ou encore le chromosome considéré chez le blé (Coulton et al. 2020). L'augmentation de la recombinaison en lien avec la modification de la température semble impliquer la voie des COs de classe I chez *Arabidopsis* (Lloyd et al. 2018, Modliszewski et al. 2018) et la voie des COs de classe II chez l'orge (Phillips et al. 2015). L'augmentation de la fréquence de recombinaison est associée à une augmentation de la longueur du complexe synaptonémal chez l'orge (Phillips et al. 2015) mais à une diminution de la longueur de ce dernier chez *Arabidopsis* (Lloyd et al. 2018), sans modification de l'interférence (Modliszewski et al. 2018). De plus, chez *Arabidopsis*, il semble que l'augmentation de la recombinaison se fait via des mécanismes différents à basse et à haute température, bien qu'impliquant la voie des COs de classe I (Lloyd et al. 2018). Bien que ces résultats soient parfois contradictoires entre ces différentes études, il semble que globalement l'augmentation de la température induit une augmentation de la fréquence de COs. Par ailleurs, l'augmentation de la température semble relocaliser les COs depuis les régions distales des chromosomes vers les régions proximales chez l'orge et le blé (Higgins et al. 2012, Phillips et al. 2015, Coulton et al. 2020).

### III.B.3.b. Gènes de méiose

#### ZYP1

Le KO de la protéine ZYP1 est associée à une augmentation de la fréquence de recombinaison globale d'un facteur 2 en lien avec une perte de l'interférence (France et al. 2021, Capilla-Perez et al. 2021), tout en induisant une déficience du synapsis des chromosomes homologues et une perte du CO obligatoire pour chaque chromosome. Chez le riz *Oryza sativa*, le KO partiel de ZEP1 (orthologue de ZYP1) permet également d'augmenter la fréquence de recombinaison d'un facteur 1,01 à 3,57 sur les 18 intervalles observés et répartis sur deux chromosomes.



Cette augmentation de la fréquence de recombinaison est également associée à une perte de l'interférence comme chez *Arabidopsis* (Liu et al. 2021). Ce KO permet également de modifier la distribution de la recombinaison, en permettant l'augmentation similaire de la fréquence de recombinaison dans les régions centromériques.

### XRCC2

Le KO du paralogue de RAD51, XRCC2, chez *Arabidopsis* induit une augmentation de la fréquence de recombinaison de 50% (Serra et al. 2013) tandis que le KD de ce même gène chez le blé dur induit une augmentation de la fréquence de recombinaison de 82% dans un intervalle subtélomérique et de 57% dans un intervalle péricentromérique. A l'échelle globale du génome, une augmentation de 25% de la fréquence de recombinaison a été observée, avec une variabilité entre les chromosomes et une modification de la distribution de la recombinaison, avec certaines régions péricentromériques possédant une augmentation de 136% de la fréquence de recombinaison (Raz et al. 2021).

### Le complexe SMC5/6

Le complexe SMC5/6 est composé de plusieurs protéines et participe à la maintenance de l'intégrité du génome via des fonctions associées à la réparation de l'ADN (Aragon, 2018). Chez *Arabidopsis*, le KO de SN1, un gène codant pour une protéine du complexe cohésine SMC5/6, est capable d'induire une faible augmentation de la fréquence de recombinaison, associée à une redistribution des COs depuis les régions péricentromériques vers les bras chromosomiques. Cytologiquement une diminution des COs de classe I a été observée, associée à une diminution de l'interférence, ce qui peut indiquer une augmentation de la fréquence de recombinaison via la classe II de COs (Zhu et al. 2021). Les mutants des autres composants de ce complexe tel que NSE4a, ASAP1, SMC6a et SMC6b et NSE2 semblent présenter un phénotype similaire, en particulier une augmentation de la fréquence de recombinaison dans un intervalle génomique (Zhu et al. 2021).



### III.B.3.c. Méthylation de l'ADN

Le gène MET1 (pour METHyltransferase 1) code une méthyltransférase qui est responsable de la maintenance de la méthylation de type CG (Saze et al. 2003). Le KO de ce gène induit chez *Arabidopsis* une modification de la distribution de la recombinaison, avec un appauvrissement en COs des régions péricentromériques au profit des régions distales et proches des centromères, sans changer la fréquence de recombinaison au niveau global (Yelina et al. 2012, Mirouze et al. 2012). Chez le blé dur, le KD de MET1 induit une augmentation globale de la fréquence de recombinaison de 45%, due principalement à une augmentation de la fréquence de recombinaison sur trois chromosomes (Raz et al. 2021). Cette augmentation de la fréquence de recombinaison ne semble pas associée à une redistribution de la recombinaison contrairement à ce qui a été observé chez *Arabidopsis*.

Le gène DDM1 (pour Decrease in DNA Methylation 1) code une protéine qui appartient à la famille des « nucleosome remodeler » qui modifient et déplacent les nucléosomes afin de permettre l'accès à d'autres protéines à l'ADN, tel que les méthyltransférases (Zemach et al. 2014).

Le KO de ce gène chez *Arabidopsis* induit une perte de la méthylation de type CG et une augmentation de la fréquence de recombinaison, mais uniquement dans les régions euchromatiques, sans modifier le profil de recombinaison dans les régions péricentromériques (Melamed-Bessudo et al. 2012, Colomé-Tatché et al. 2012). Chez le blé dur, l'effet du KD de DDM1 semble plus faible, induisant une augmentation de la recombinaison que dans un intervalle euchromatique sur les deux étudiés le long du chromosome 1A (Raz et al. 2021).

Chez le maïs le gène Mop1 (pour Mediator of paramutation1) code pour une ARN polymérase ARN dépendante impliquée dans la voie RdDM (RNA-directed DNA Methylation) et qui est responsable de la méthylation de type CHH (Zhao et al. 2021). Le KO de ce gène induit une perte de la méthylation CHH et une augmentation de la fréquence de recombinaison sur les bras chromosomiques au détriment des péricentromères, sans changer la fréquence globale de recombinaison (Zhao et al. 2021).



Table 1. World production of major oilcrops

	2015/16	2016/17	2017/18 <i>f'cast</i>	Change 2017/18 over 2016/17
	<i>million tonnes</i>			<i>%</i>
Soybeans	316.3	350.5	337.9	-3.6
Rapeseed	70.2	71.5	75.6	5.8
Cottonseed	37.6	39.8	43.4	9.0
Groundnuts (unshelled)	39.0	41.9	43.2	3.0
Sunflower seed	43.6	50.1	49.7	-0.8
Palm kernels	14.5	16.2	17.2	5.9
Copra	5.1	5.2	5.7	9.1
<b>Total</b>	<b>526.3</b>	<b>575.2</b>	<b>572.6</b>	<b>-0.4</b>

Note: The split years bring together northern hemisphere annual crops harvested in the latter part of the first year shown, with southern hemisphere annual crops harvested in the early part of the second year shown. For tree crops, which are produced throughout the year, calendar year production for the second year shown is used.

Tableau 1 : Production mondiale d'huile par les plantes oléagineuses. (D'après FAO.org).

## IV. Modèle Brassica

### IV.A. Contexte socio-économique

Le colza est une plante d'intérêt agronomique, utilisée principalement pour sa production d'huile, avec un usage en alimentation humaine et dans l'industrie (lubrifiant et biocarburant) mais également pour la production de tourteau utilisé en alimentation animale. L'huile de colza est considérée comme ayant un impact globalement positif sur la santé, avec en particulier un effet cardioprotecteur par rapport à d'autres apports lipidiques (Lin et al. 2013). Cependant, des effets peu, voire non bénéfiques de la consommation d'huile de colza semblent possibles chez un modèle souris vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer et des capacités cognitives (Lauretti & Pratico, 2017).

Le colza est la seconde culture en termes de production d'huile dans le monde avec 75.6 millions de tonnes produites dans le monde en 2016/2017, derrière le soja (337.9 MT) mais devant le coton (43.4 MT) (Source FAO, Tableau 1). Le colza est également utilisable en tant que plante d'ornement d'intérêt touristique (Xiao et al. 2021).

### IV.B. Origine du colza

La détermination de la nature polyploïde et de l'origine des espèces parentales du colza a été un long travail au cours duquel on peut citer les quelques travaux clés suivants.

Plusieurs ouvrages font références au livre de Sageret, « Mémoire sur les cucurbitacées » de 1826, comme le premier essai documenté de croisements interspécifiques entre des *Brassica* (Focke 1881, Morinaga, 1930, Yarnell, 1956). Sageret semble indiquer qu'il est possible de réaliser des croisements entre des choux et des navets, parlant même de colzas artificiels. Cette référence à des colzas artificiels, bien que non argumentée, peut laisser penser que déjà à cette époque les navets et choux étaient supposés être les parents du colza, bien qu'aucune référence écrite ne semble décrire précisément cette hypothèse. Dans son livre « Bastarderzeugung im pflanzenreich » (soit « Des hybrides dans le règne des plantes ») paru en 1849, Gärtner a réalisé une synthèse bibliographique de croisements interspécifiques réalisés au cours de l'histoire, ainsi que de ses propres essais d'hybridation. Il a notamment testé les croisements entre des choux et du colza, qui se sont révélés infructueux pour la production d'hybrides F1. Il est remarquable de noter qu'un exemplaire de ce livre a été trouvé annoté dans la bibliothèque de Gregor Mendel. Il aurait permis à Mr Mendel de choisir son modèle de plante pour tester ses hypothèses mathématiques sur la ségrégation de caractères morphologiques héréditaires (Zirkle, 1951).



Par ailleurs, Gärtner cite de nombreuses fois les travaux de Sageret. Il est donc possible que le masquage de caractères parentaux chez des hybrides F1 puis leur réapparition en F2, décrits par Sageret et repris par Gärtner, ait intéressé et inspiré Mendel. En 1927, la scientifique russe Sinskaia a publié un article dont le résumé en anglais a été repris, traduit et discuté par le français Meunissier la même année. Des croisements entre différentes espèces du genre *Brassica* ont été réalisés afin d'établir les liens de parenté entre ces espèces. Il est à noter qu'à cette époque la classification des espèces ainsi que des genres n'étaient pas aussi bien défini qu'aujourd'hui, avec par exemple la classification des espèces du genre *Sinapis* classées auparavant dans le genre *Brassica* et le regroupement des espèces *napus* et *rapa* au sein de la même espèce. Ainsi certains croisements présentés comme interspécifiques dans cet article sont en réalité des croisements intraspécifiques. Cependant, ce qui ressort de cet article est que les croisements entre *B. napus* et *B. rapa* sont possibles mais pas toujours faciles. Il était également déjà souligné dès 1927 l'importance de ces recherches dans la production et la commercialisation des graines.

Dans son article de 1929, Morinaga a montré que les croisements entre *B. napus* et différentes variétés de *B. rapa* permettent tous de donner des graines et que ces hybrides F1 sont capables de produire des graines viables par auto-fécondation. Le comportement méiotique global de ces hybrides F1 était de 10 bivalents et de 9 univalents, ce qui suggère très fortement qu'il s'agissait d'allotriploïdes AAC ( $2n=3x=29$ ). Dans cette étude, quelques croisements entre des espèces considérées comme différentes à l'époque, *Brassica chinensis* et *Brassica pekinensis*, toutes deux aujourd'hui considérées comme deux sous-espèces de *B. rapa*, ont été réalisés, montrant l'interfécondité et la stabilité des hybrides F1, ce qui est cohérent avec le fait qu'il s'agit de croisements intraspécifiques. Il est à noter qu'actuellement *Brassica napella* var. « CHAIX » est enregistrée comme une variété de navette oléagineuse (*B. rapa* ssp. *oleifera*, INPN, 2022), cependant les résultats cytologiques de Morinaga semblent indiquer que les plantes de *Brassica napella* étudiées étaient des colzas *B. napus* ( $n=19$ ). Cela correspond également à l'une des premières preuves cytologiques que le colza possède 19 paires de chromosomes homologues contrairement à ce qui avait été montré jusqu'ici par Karpechenko (1928). Il est notable de préciser que Karpechenko est reconnu internationalement comme le pionnier de la formation et de l'étude des Raphanobrassica, hybrides allotétraploïdes (CCRsRs,  $2n=4x=36$ ) stables résultants du croisement interspécifique et du doublement spontané du génome de chou (*Brassica oleracea* CC,  $2n=2x=18$ ) et de radis (*Raphanus sativus*, RsRs,  $2n=2x=18$ ).

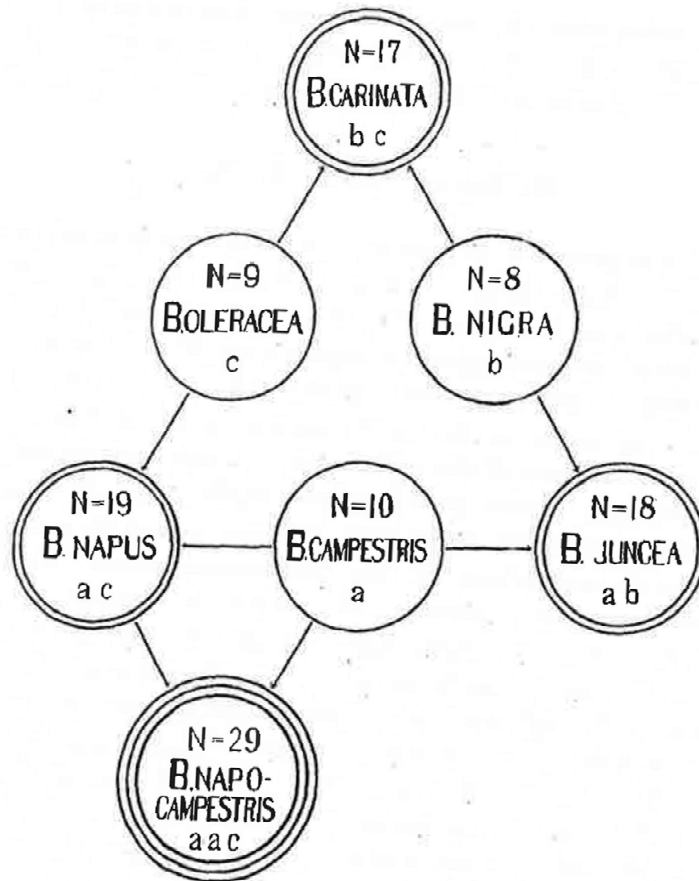


Figure 23 : Triangle de U : Relation génomiques entre les six espèces du genre *Brassica*. Le nombre de chromosomes est indiqué par la lettre N. Le type de chromosomes (a, b ou c) présents est indiqué par des lettres en minuscule d'imprimerie. Le nom des espèces est indiqué au centre de chaque cercle. Le nombre de cercle indique le niveau de ploïdie (un cercle = diploïde, 2 cercles = allotétraploïde, 3 cercles = autoallohéploïde). Ici, *Brassica rapa* est dénommé par son ancienne nomenclature *Brassica campestris*. (D'après U, 1935).

Cette nouvelle espèce a été utilisée jusque dans les années 1970 comme plante fourragère. De la même manière, des Brassicoraphanus, issus du croisement entre la navette (AA,  $2n=2x=20$ ) et le radis (RsRs,  $2n=2x=18$ ), sont des plantes stables qu'il est possible d'obtenir et dont des variétés sont commercialisées (Terasawa, 1932, Park et al. 2019). Enfin les travaux de Mr U sont reconnus internationalement comme l'étude pionnière qui a déterminé de manière certaine les liens de parenté entre six espèces du genre *Brassica*. En 1935, Mr U a présenté les travaux de plusieurs années de recherche qui ont consisté en des croisements interspécifiques et réciproques entre six espèces *Brassica* et en l'étude minutieuse des comportements méiotiques en métaphase I des hybrides obtenus. Il a ainsi pu déterminer le nombre de chromosomes de ces six espèces et combien de chromosomes étaient assez similaires pour s'apparier en métaphase I chez les hybrides F1. Cela lui a permis de réaliser le triangle de U schématisant leurs liens de parenté (Figure 23). Ainsi pour les croisements colza-navette, 10 bivalents et 9 univalents étaient observés en moyenne, tandis que, pour les croisements colza-chou, 9 bivalents et 10 univalents étaient observés en moyenne. Comme la navette présente 10 bivalents et le chou 9 bivalents en métaphase I, Mr U a conclu que le colza était de formule AAACC et issu du croisement interspécifique entre la navette et le chou. Il a par ailleurs également pu remarquer un doublement spontané du génome chez un hybride colza-navette, le rendant stable il a ainsi proposé une nouvelle espèce *Brassica napocampestris* (AAAACC,  $2n=6x=58$ ).

Ainsi le colza est issu de l'hybridation interspécifique entre le chou et la navette suivi d'un doublement spontané du génome. La datation de la formation du colza est encore débattue avec les approches botaniques qui estiment que le colza s'est formé il y a environ 600 ans (Gomez-Campo & Prakash 1999) tandis que des approches d'horloge moléculaire se basant sur la séquence ADN du colza datent son apparition au néolithique il y a environ 7500 ans (Chalhoub et al. 2014). Une origine méditerranéenne a été proposée pour le colza, zone possible de cohabitation de *B. oleracea* et de *B. rapa* (Olsson, 1960; Tsunoda, 1980), bien que cette hypothèse soit réfutée par Gomez-Campo & Prakash (1999) qui soulignent une plus probable origine dans un contexte d'agriculture, en lien avec le fait qu'aucune population naturelle de colza n'ait jamais été observée et qu'il est peu probable que des populations de navettes se soient retrouvées au niveau des falaises atlantiques, zone supposée de répartition naturelle des choux. Les études moléculaires basées sur la séquence chloroplastique semble indiquer que l'origine maternelle du colza serait *Brassica rapa* et que deux à trois événements indépendants sont à l'origine du colza (Allender & King, 2010).

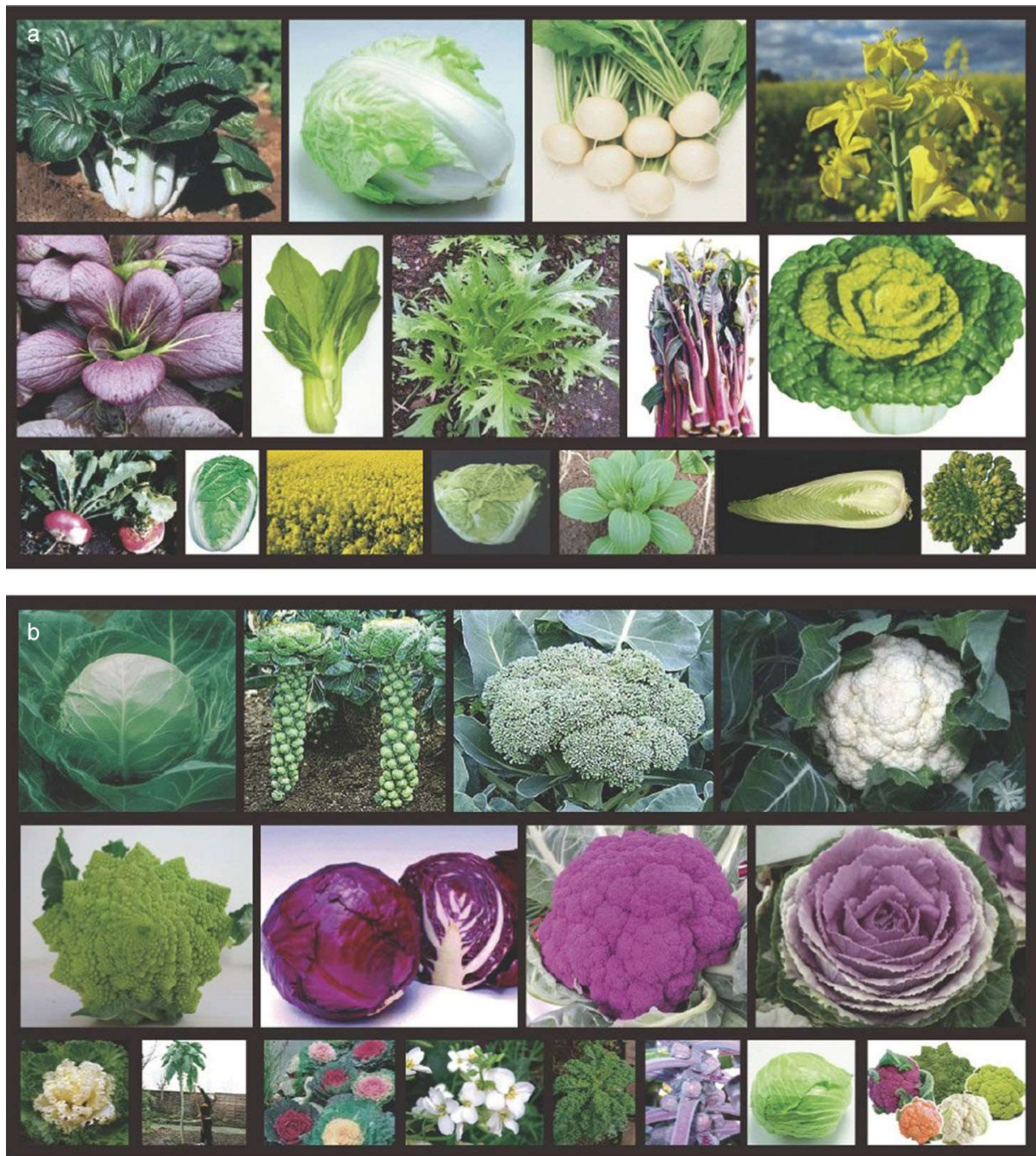


Figure 24 : Diversité morphologique présente au sein de la navette *Brassica rapa* (a) et du chou *Brassica oleracea* (b) (d'après Cheng et al. 2014).

#### IV.C. Décryptage de l'origine de *Brassica rapa* et de *Brassica oleracea*

La navette et le chou sont des espèces agronomiquement importantes et possédant également une très grande diversité morphologique (Prakash & Hinata, 1980, Figure 24). Ainsi l'origine et la diversification de ces différentes formes depuis la domestication des espèces sauvages est intéressante à étudier et à élucider.

Les *Brassica* sont un genre assez unique du point de vue agronomique. En effet, différentes parties de la plante sont consommées et ont subi des modifications morphologiques en lien avec leur utilisation en consommation humaine. Ainsi il existe des variétés consommées pour leurs feuilles (chou chinois, pak-choi, chou pommé, chou frisé, chou blanc, chou rouge, chou de Bruxelles), des variétés utilisées pour le renflement de leur collet (chou rave, navet, rutabaga), des variétés utilisées pour leur inflorescences (choux fleur, chou romanesco, chou brocoli), ou des variétés utilisées pour leurs graines produisant de l'huile (navette oléifère et colza oléagineux).

##### *IV.C.1. La navette *Brassica rapa**

En se basant sur des données botaniques et littéraires, l'origine de la domestication de la navette a été estimée plutôt en Europe, avec une domestication des formes navet et oléagineuse, suivi par une migration en Asie et une sélection des formes feuillues depuis un pool de navettes oléagineuses (Gomez-Campo & Prakash 1999). Cependant des données plus récentes se basant également sur des données GBS (génotypage par séquençage) de 416 accessions semblent plutôt indiquer une domestication en Europe centrale puis en Asie centrale il y a 3430-5930 ans. Les premières formes domestiquées auraient été les navets et les formes oléagineuses. Par la suite, les formes feuillues seraient issues de trois événements indépendants de sélection depuis les formes navet. Par ailleurs, il apparaît que les populations estimées comme sauvages en Europe et en Amérique seraient en réalité des échappées de culture retournées à l'état sauvage (populations férales). Les populations apparaissant plutôt sauvages seraient localisées en Italie, Sibérie et dans le Caucase (McAlvay et al. 2021), celles d'Afrique du Nord ayant été peu explorées jusque-là (Aissiou et al. 2018).





#### IV.C.2. Le chou *Brassica oleracea*

Les données botaniques et littéraires laissent penser à une origine de *B. oleracea* plutôt en Angleterre, avec une propagation par les celtes vers le bassin méditerranéen. Ceci aurait rendu possible le brassage de cette espèce avec d'autres *Brassicacées* possédant un cytodème similaire (i.e.  $n = 9$ ), pouvant expliquer la diversité de morphotypes retrouvés actuellement. Ainsi la forme initialement cultivée aurait été la forme feuillue (Gomez-Campo & Prakash, 1999). Cependant, une étude plus récente se basant sur le séquençage du transcriptome de 224 accessions de choux et d'espèces apparentées propose une origine unique des différentes formes domestiquées de choux. La zone méditerranéenne serait l'origine des formes domestiquées de cette espèce avec comme espèce de départ *B. cretica*. D'après les données archéologiques et littéraires, la domestication du chou se situerait vers la fin de l'Holocène, entre 3500 et 800 ans (Mabry et al. 2021). D'après Cai et al. (2022), la domestication du chou aurait eu lieu à la fin de l'Holocène, mais plus précocement, il y a environ 4581 ans. Par ailleurs, ces auteurs estiment que le début de la culture du chou et la diversification des morphotypes aurait eu lieu vers 400 ans avant J.C., avec phylogénétiquement une séparation des « formes feuillues » (ex : chou blanc, chou frisé) et des formes « inflorescence » (ex : chou-fleur, romanesco, brocoli).

#### IV.D. Structure génomique

A une échelle de temps beaucoup plus grande *Brassica rapa* et *Brassica oleracea* partagent une histoire évolutive très liée. Parmi les espèces diploïdes du genre *Brassica*, *B. rapa* (génom A) et *B. oleracea* (génom C) sont phylogénétiquement plus proches que de *B. nigra* (génom B) (Gomez-Campo & Prakash, 1999). En effet, les espèces *B. rapa* et *B. oleracea* ont divergé d'un même ancêtre commun il y a environ 3 millions d'années, alors que ces deux espèces diploïdes et *B. nigra* ont divergé d'un même ancêtre commun il y a environ 15-20 millions d'années (Arias et al. 2014)

D'après les données de cartographie génétique comparative, il existe une colinéarité entre les groupes de liaison des génomes A, B et C des diploïdes avec des réarrangements chromosomiques particuliers à chacune des espèces (Lagercrantz & Lydiate, 1996). De plus cette analyse a permis de mettre en évidence une triplication au sein de ces génomes, chaque région pouvant être retrouvée trois fois au sein d'un génome. Cette triplication a par la suite été confirmée avec une comparaison de la carte génétique de *B. nigra* avec celle de *A. thaliana* (Langercrantz, 1998).

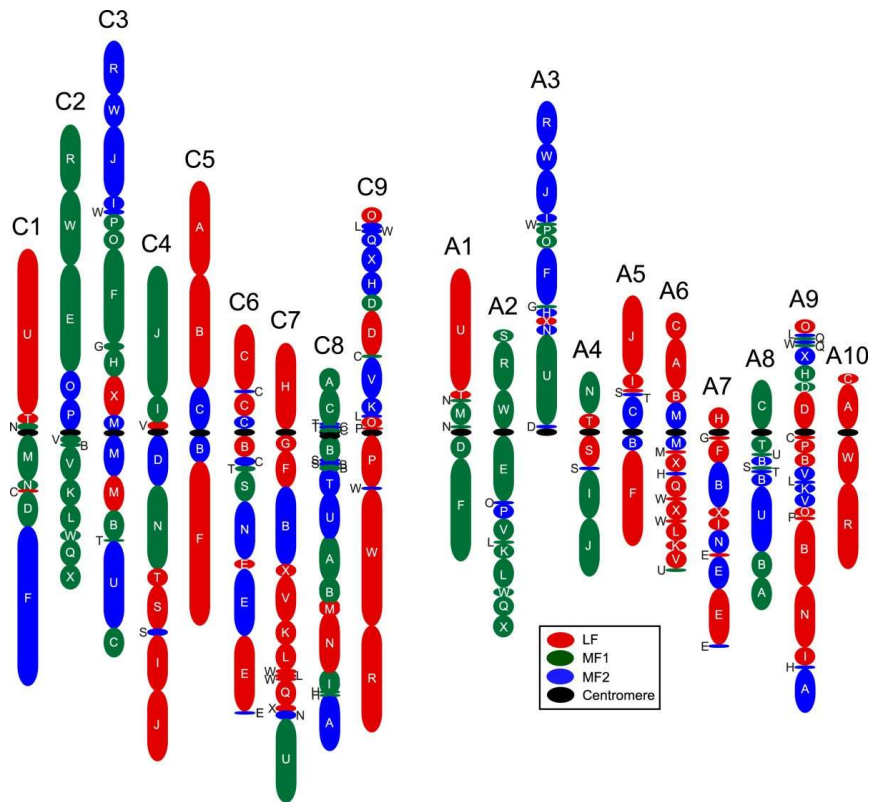


Figure 25 : Représentation des 24 blocs ancestraux le long des chromosomes du chou (A) et de la navette (B) et de leur niveau de fractionnement (LF, MF1 et MF2). (D'après Parkin et al. 2014).

Des données de cytogénétique comparative ont par la suite confirmé la nature tripliquée des génomes des *Brassica*. L'hybridation de sondes BACs fluorescentes couvrant les chromosomes de *A. thaliana* sur des chromosomes de *Brassica* au stade pachytène ont permis de montrer que chaque région chromosomique de *A. thaliana* pouvait être retrouvée en trois exemplaires chez *Brassica* (Lysak et al. 2005, 2007).

Ainsi un modèle simple présentant 24 blocs initiaux représentant l'ensemble du génome d'*Arabidopsis thaliana* ont été identifiés sous forme de triplications chez de nombreuses espèces telle que *Brassica rapa* (Lysak et al. 2006, Schranz et al. 2006). Par la suite les données de séquençage ont permis de retrouver les 24 blocs ancestraux en trois exemplaires sur les génomes assemblés de *Brassica rapa* (Cheng et al. 2013) et *Brassica oleracea* (Parkin et al. 2014) (Figure 25).

Les travaux de paléogénomique utilisant les génomes de référence de plusieurs Brassicaceae ont permis de retracer l'évolution du nombre de chromosomes et de leur structure chez cette famille (Murat et al., 2015). Via des études d'homologie de séquences géniques et de synténie entre génomes, ces auteurs ont été capables de déterminer l'évolution des caryotypes chez les Brassicaceae (Figure 26). Il y a 27 millions d'années, l'ancêtre commun aux Brassicaceae (ABK, Ancestral Brassicaceae Karyotype) aurait été composé de 8 chromosomes. Il aurait ensuite divergé et donner naissance d'une part à l'ancêtre commun aux Camelinae (Ancestral Camelinae karyotype ACK) et d'autre part à l'ancêtre commun aux Calepineae (proto-Calepineae karyotype PCK). Cette divergence s'est réalisée via des réarrangements chromosomiques différentiels entre ACK et PCK. Par la suite, il y a 23 millions d'années il y eu une divergence entre l'ancêtre des Brassicaceae et celui des Eutremae.

Au sein de la tribu des Brassicaceae il y a eu une triplication du génome, estimée s'être produite il y a environ 7 à 15 millions d'années (Wang et al. 2011). En se basant sur le génome de *B. rapa* et en étudiant le taux de divergence entre l'ensemble des gènes tripliqués ou dupliqués (dans le cas de perte d'une copie au cours de l'évolution via un phénomène de fractionnement), cette triplication se serait déroulée en deux temps, avec la formation d'un premier allotétraploïde, suivi par le croisement avec une autre individu diploïde (un ou deux millions d'années plus tard), à l'origine d'un individu hexaploïde à 21 chromosomes (Figure 25). Au cours de l'évolution, de nombreux réarrangements chromosomiques et la perte de certaines copies de ces gènes tripliqués ont eu lieu via un phénomène dit de fractionnement.

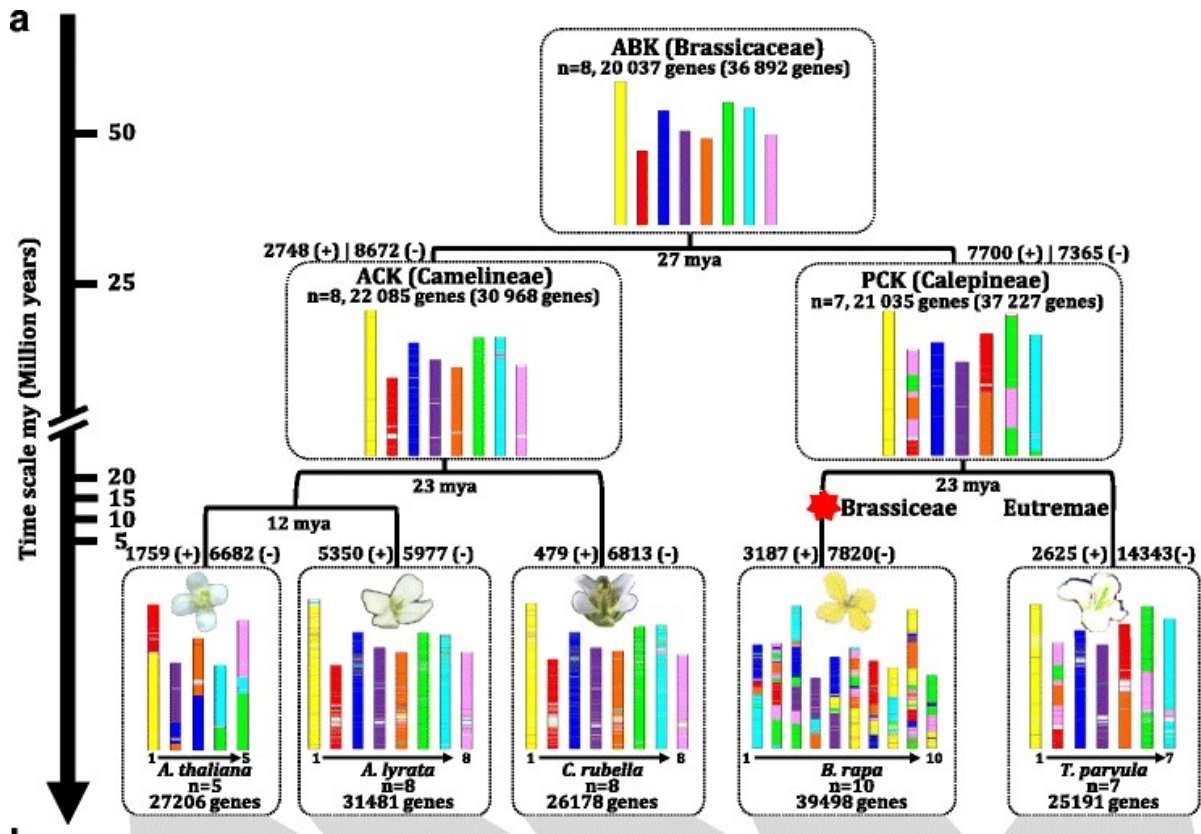


Figure 26 : Histoire phylogénétique des Brassicaceae (d’après Murat et al. 2015).

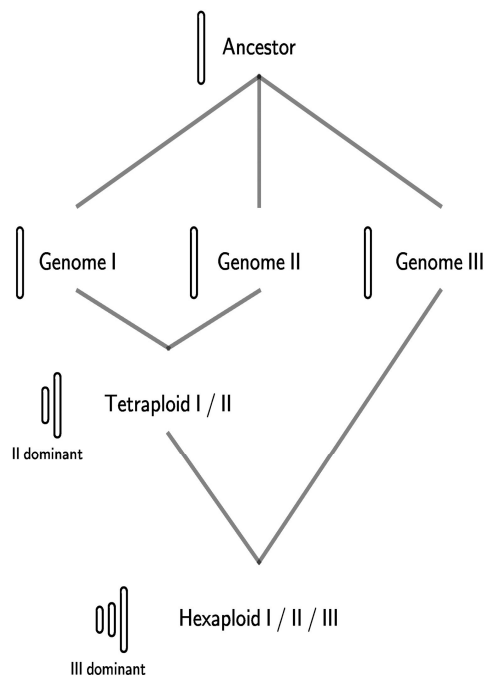


Figure 27 : Diagramme représentant le mode de formation en deux étapes de l’hexaploïde à l’origine de *B. rapa* et *B. oleracea*. L’ancêtre commun a divergé pour donner trois génomes, puis via une allotétraploïdisation, les génomes I et II ont été réunis, le génome II étant le dominant. Par la suite, le tétraploïde ainsi obtenu s’est hybridé avec le génome III pour former l’hexaploïde, ce dernier génome devenant le dominant (d’après Tang et al. 2012).

Néanmoins, même si les espèces diploïdes actuelles de *B. rapa* et *B. oleracea* ont perdu la majorité de ces gènes dupliqués et ne possèdent plus que 10 et 9 chromosomes respectivement, il est possible d'identifier les régions tripliquées au sein de leurs génomes. Ainsi, les espèces diploïdes ou paléohexaploïdes de Brassica possèdent deux sous-génomes très fractionnés (dit MF1 = medium fragmented et MF2 : most fragmented) issus du plus ancien événement de polyploïdisation et un sous-génome moins fractionné (LF : least fragmented) issu de l'événement de polyploïdisation plus récente (Tang et al. 2012, Figure 27). Chez certaines espèces polyploïdes, il a parfois été observé que ce fractionnement était biaisé, avec la perte préférentielle de copies provenant d'un sous-génome, comme cela a pu être observé chez le maïs (Schnable et al. 2011), la navette (Cheng et al. 2012) ou encore le coton (Renny-Byfield et al. 2015).

A une échelle de temps plus courte (probablement au cours du dernier millénaire ou de ces quelques dernières centaines d'années pour les variétés actuelles) les espèces diploïdes *B. rapa* et *B. oleracea* ont subi des réarrangements structuraux intra-chromosomiques qui peuvent différencier les différentes variétés ou les différents morphotypes, comme cela a pu être démontré chez *B. rapa* (Boutte et al. 2020), où la comparaison de deux variétés assemblées *de novo* a pu révéler une différence de taille de génome associée à une expansion d'éléments répétés et de rDNA différentielle, confirmée par cytométrie en flux et en cytogénétique. Chez *Brassica oleracea*, des analyses de cartographie génétique ont pu montrer que des variétés de choux présentaient des variations structurales différentes, dont les inversions chromosomiques très fréquentes (Kianian & Quiros 1998). Ces variations sont potentiellement liées à leur divergence évolutive qui peut être en lien avec la sélection humaine des différents morphotypes.

Comme le colza est issu de l'hybridation interspécifique entre les deux paléopolyploïdes *B. rapa* et *B. oleracea*, chaque gène peut être présent en 1 à 6 copies chez *B. napus*, sans compter les duplications récentes.

Chez *Brassica napus* il existe également une diversité structurale entre les variétés, les principales étant les échanges homéologues différentiels entre les variétés (Lloyd et al. 2018, Song et al. 2020, Bayer et al. 2021).



#### IV.E. Elargissement de la diversité génétique du colza par exploitation de croisements et de la recombinaison

Actuellement le pool génétique du colza présente une faible diversité. Cela est à mettre en lien avec le fait que dès le départ peu d'évènements ont conduit à la formation du colza (Allender & King, 2010). De plus depuis les années 1960, le colza a subi une forte pression de sélection humaine pour la qualité de la graine, notamment pour sa composition en acide érucique et en glucosinolates.

La variété Lihio est la première variété de colza sélectionnée présentant une faible teneur en acide érucique. Ce composé ayant des effets néfastes sur le système cardiovasculaire, il est considéré comme dangereux pour la consommation humaine (McCutcheon et al. 1976). Cette variété est issue d'une population hétérogène allemande qui a été sélectionnée au Canada pour son faible contenu en acide érucique (Stephansson et al. 1961).

La variété Bronowski (Krzymanski, 1966) est la première variété de colza présentant une faible teneur en glucosinolates, des composés ayant un effet négatif sur l'appétence chez les animaux pour le tourteau (Tripathi & Mishra, 2007). Cette variété polonaise présente ce phénotype à cause notamment d'une translocation non réciproque entre les chromosomes A02 et C02 (Kittipol et al. 2019).

Ces deux variétés ont été utilisées dans tous les programmes de sélection dans le monde pour améliorer la qualité de la graine, ce qui explique cette très faible diversité des variétés de colza actuelles. Il devient donc nécessaire d'apporter de nouveau de la diversité génétique au sein du colza afin de pouvoir continuer les programmes d'amélioration variétale et de pouvoir générer les variétés de demain qui seront capables de faire face aux nouveaux challenges environnementaux qui nous attendent.

Un des moyens est d'utiliser la diversité génétique qui est déjà présente au sein des espèces diploïdes progénitrices du colza, à savoir la navette *Brassica rapa* et le chou *Brassica oleracea*. Plusieurs stratégies ont été proposées : soit de régénérer des populations de colza resynthétisés, soit de croiser le colza avec l'une ou l'autre de ses espèces diploïdes parentales.





#### *IV.E.1. Les colzas resynthétisés*

Un des moyens d'apporter la diversité des deux progéniteurs diploïdes au sein du colza est de réaliser des colza resynthétisés, en croisant une navette avec un chou suivi d'un doublement du génome (naturel ou via un traitement par la colchicine). Le colza resynthétisé (AACC,  $2n=4x=38$ ) peut par la suite être croisé avec une variété élite afin d'apporter les caractères d'intérêt agronomiques présents chez les diploïdes au sein des variétés de colza actuellement cultivées.

Les colza resynthétisés ont l'avantage d'apporter simultanément la diversité génétique des deux génomes parentaux. Cependant cette voie présente quelques désavantages, tels que l'irrégularité de la méiose des hybrides resynthétisés S0, qui présentent de nombreux appariements homéologues, traduisant de la recombinaison entre des chromosomes A et C qui perturbent la méiose et aboutit à une fertilité réduite des hybrides générés (Gaeta et al. 2007 ; Szadkowski et al. 2010 ; Rousseau-Gueutin et al. 2017, Ferreira de Carvalho et al. 2021). Cependant, lors de croisements avec des variétés cultivées de colza, ces échanges homéologues peuvent parfois permettre l'introduction de caractères favorables y compris pour la qualité de la graine (Stein et al. 2017).

#### *IV.E.2. Les hybrides allotriploïdes*

Un autre moyen d'apporter de la diversité génétique des parents diploïdes au sein du colza est de réaliser des croisements interspécifiques entre le colza et le chou ou la navette. Les croisements entre colza et navettes produisent plus d'hybrides F1 que ceux entre le colza et le chou (U, 1935). Par ailleurs, un autre élément important pour le succès de l'introgession de caractères d'intérêt agronomique depuis des espèces distantes à une espèce cultivée est l'efficacité de la recombinaison méiotique, qui permet le brassage génétique lors de la méiose (Taagen et al. 2020, Blary & Jenczewski 2018).

Les hybrides allotriploïdes AAC, issus du croisement entre *Brassica napus* et *Brassica rapa* est un pont intéressant pour permettre d'introgesser des caractères d'intérêts agronomiques depuis la navette *Brassica rapa* vers le colza *Brassica napus*.

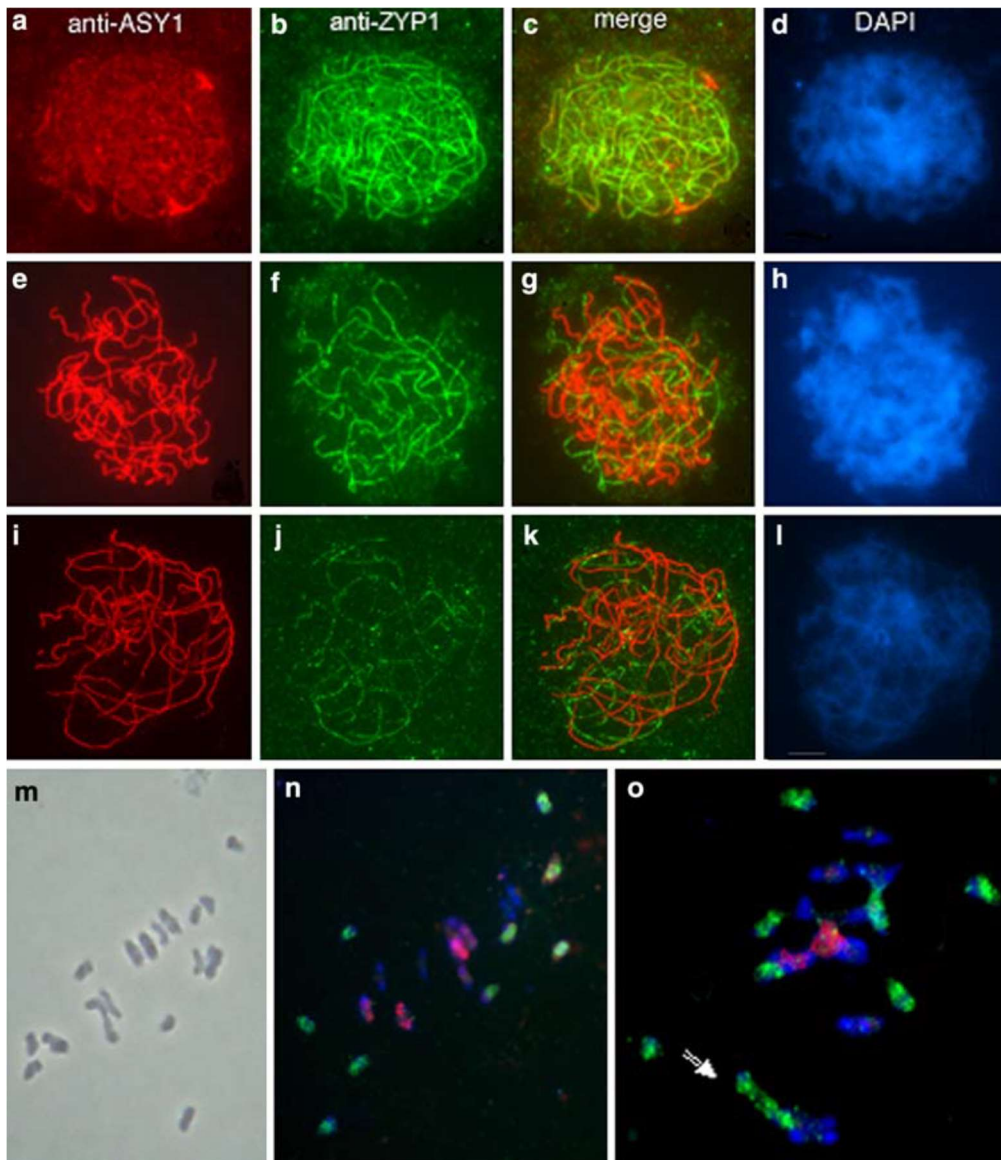


Figure 28 : Déroulement de la méiose chez un AAC.

Immunomarquage des protéines ASY1 (rouge) et ZYP1 (vert) chez le colza (a-d) et les hybrides allotriploïdes AAC (e-i) au stade pachytène. La persistance du marquage ASY1 et l'absence de marquage ZYP1 indique qu'une partie des chromosomes ne sont pas appariés. Métaphase I chez un allotriploïde AAC. Le marquage au carmin acétique révèle présence de dix bivalents et de neufs univalents (m). Le BAC-FISH révèle que les neufs univalents appartiennent au génome C (vert) et que les dix bivalents correspondent à des chromosomes A (trois paires de A sont marqués en rouge, les sept autres paires étant uniquement marquées au DAPI en bleu) (n). Des appariement autosyndétiques sont possibles entre chromosomes C (o, indiqué par une flèche) (d'après Leflon et al. 2006).

En 2006, Leflon et al. ont étudié le comportement en méiose d'un hybride AAC, issus du croisement entre un colza et une navette. Chez un hybride allotriploïde AAC au stade pachytène une partie des chromosomes semblent ne pas former de synapsis, comme le montre la persistance de l'immunomarquage ASY1 et l'absence d'immunomarquage ZYP1 (Figure 28). Ces résultats laissent suggérer que les chromosomes C ne forment pas de complexe synaptonémal chez cet hybride, tandis que les chromosomes A sont capables de s'apparier, de former le CS et de recombiner entre eux. Cela est confirmé par les résultats de comportement méiotique en métaphase I qui indiquent la présence de dix bivalents A et de neuf univalents C (Figure 28). Ainsi, au sein d'un hybride allotriploïde AAC la recombinaison homologue a lieu uniquement entre les chromosomes A. Comme les chromosomes C restent à l'état d'univalents en métaphase I, ils ségrégent de manière aléatoire lors de la méiose de l'hybride F1 AAC. La recombinaison homéologue entre les chromosomes A et C semble également possible mais à un niveau presque nul. Par ailleurs, cette structure AAC induit une faible diminution de la fertilité mâle (76% en viabilité pollinique) et de la fertilité femelle (diminution du nombre de graines par fleur pollinisée).

Par la suite, Leflon et al (2010) ont étudié la fréquence de recombinaison chez des hybrides possédant le même sous-génope A mais possédant trois niveaux de ploïdie différent, diploïde AA, allotriploïde AAC et allotétraploïde AACC. En utilisant de la cartographie génétique avec 19 marqueurs moléculaires positionnés sur le groupe de liaison correspondant au chromosome A07, ils ont pu déterminer que la fréquence de recombinaison chez un allotriploïde AAC était supérieure à celle chez un allotétraploïde AACC, qui est elle-même supérieure à celle d'un diploïde AA. L'immunomarquage de la protéine MLH1 au stade diacinèse semble suggérer que c'est la voie des COs de classe I qui est principalement impliquée dans cette modification de la fréquence de recombinaison chez la voie mâle, et confirme les résultats de cartographie génétique avec  $AAC > AACC > AA$ .

Afin de déterminer si le nombre de chromosomes C en addition est responsable de la modification de la fréquence de recombinaison observée chez les hybrides AAC, Suay et al (2014) ont généré des hybrides ayant les mêmes génotypes A à l'état hétérozygote mais un nombre différent de chromosomes C en addition et étudié la fréquence de recombinaison par cartographie génétique sur le chromosome A07. Il semble qu'il y ait un effet dose des chromosomes C en addition, avec une plus forte fréquence de recombinaison lorsque 9 chromosomes C sont en addition (AAC) comparé aux hybrides possédant zéro, trois ou six chromosomes C.

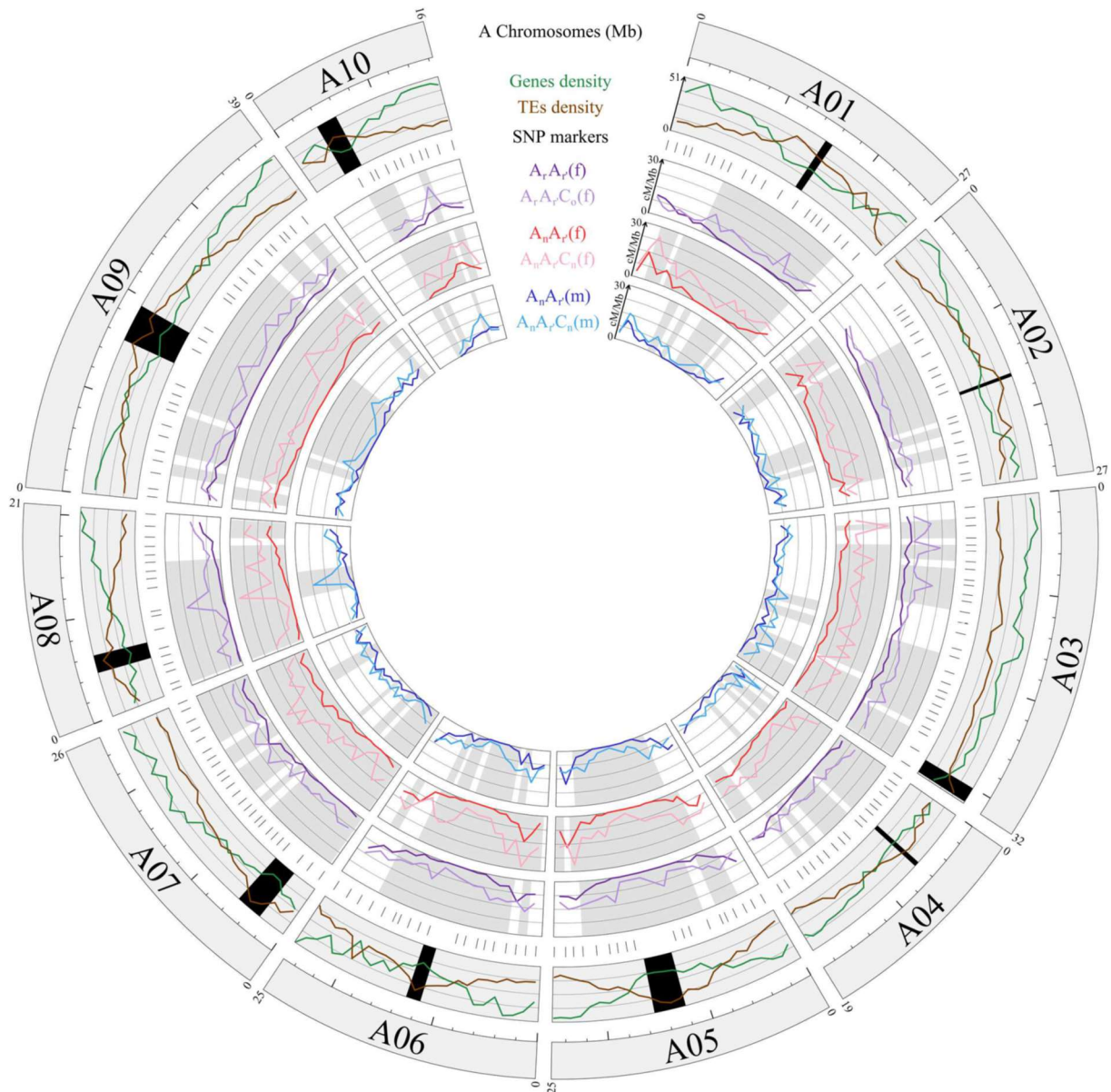


Figure 29 : Distribution de la recombinaison homologue chez des hybrides AA et AAC le long du génome A. La première piste correspond aux dix chromosomes A, la seconde piste représente la densité en gènes (en vert) et en éléments transposables (marron) et la troisième piste correspond à la position physique des marqueurs SNP. Les trois pistes centrales correspondent au taux de recombinaison chez des hybrides diploïdes AA (couleur foncée) et allotriploïdes AAC (couleur claire). (D'après Pelé et al. 2017).

Par ailleurs, la nature des chromosomes C semble également avoir un impact sur la fréquence de recombinaison, avec une augmentation de la fréquence de recombinaison plus forte chez un hybride qui comporte que le chromosome C09 du chou en addition comparé à un hybride possédant le chromosome C06 en addition.

Le séquençage et l'assemblage du génome de *Brassica rapa* en 2011 (Wang et al.) et de *Brassica napus* en 2014 (Chalhoub et al.) a permis de réaliser des cartes génétiques avec un ancrage physique des marqueurs moléculaires le long des chromosomes, ce qui donna accès à la distribution de la recombinaison. Ainsi en 2017, Pelé et al. ont déterminé la fréquence et la distribution de la recombinaison tout le long du génome A chez un hybride diploïde AA et un hybride allotriploïde AAC, en utilisant un set de 204 marqueurs SNP espacés environ tous les 1 Mb le long du génome (Figure 29). Ils ont pu mettre en évidence qu'en plus d'une augmentation de la fréquence de recombinaison d'un facteur 3,4 chez les allotriploïdes AAC comparés aux diploïdes AA, il y avait une modification drastique de la distribution de la recombinaison chez les allotriploïdes AAC.

En effet, ils ont pu montrer que la recombinaison pouvait avoir lieu dans les régions génomiques normalement froides vis-à-vis de la recombinaison telles que les régions proches des centromères. De plus, cette augmentation de la fréquence de recombinaison est associée à une forte diminution de l'interférence chez les hybrides AAC.

Par ailleurs, l'étude comparative par cartographie génétique a permis de mettre en évidence que chez les hybrides allotriploïdes AAC, il y avait de l'hétérochiasmie, avec une plus forte fréquence de recombinaison au sein de la voie femelle comparée à la voie mâle même si la distribution de la recombinaison est similaire. Ce phénomène est absent chez le diploïde AA (Pelé et al. 2017) et l'allotétraploïde AACC (Kelly et al. 1997). Ces comparaisons de cartes génétiques ont également permis de confirmer l'augmentation d'un facteur 1,7 de la fréquence de recombinaison observé cytologiquement par immunomarquage MLH1 chez un hybride allotriploïde AAC comparé à un diploïde AA (Leflon et al. 2010). De plus ces auteurs ont également mis en évidence un faible effet du fond génétique sur la fréquence de recombinaison.



## Objectifs de la thèse

Les modifications des règles de la recombinaison, observées chez les allotriploïdes AAC, posent encore de nombreuses questions, tant sur l'application en sélection variétale chez le colza qu'en génétique fondamentale sur les mécanismes en jeu dans ces modifications. Ainsi nous avons cherché à déterminer quels sont les facteurs qui peuvent expliquer le phénotype en méiose des hybrides AAC.

Ainsi, dans la continuité des travaux réalisés par Leflon et al (2010), Suay et al. (2014) et Pelé et al. (2017), nous avons abordé ces questions via les interrogations suivantes structurées en trois points :

Quel est le profil de recombinaison sur l'ensemble du génome A chez un allotétraploïde AACC comparé à un hybride allotriploïde AAC et diploïde AA ? Est-ce que la fréquence de recombinaison observée sur le groupe de liaison A07 par Leflon et al. (2010) est vraie sur l'ensemble du génome A à tous les niveaux de ploïdie ? Quel est l'avantage d'utiliser la voie allotriploïde AAC dans un schéma de sélection variétal ?

Si la structure génomique allotriploïde AAC est responsable de la modification du profil de recombinaison observé chez les hybrides F1 AAC, est-il possible de maintenir cette modification dans la structure AAC ou d'observer sa réversion en retrouvant une structure AACC en seconde génération ? Est-ce que la voie allotriploïde AAC permet de former des colzas AACC stables ? Quel est l'impact des structures hétérozygotes partielles sur le profil de recombinaison ?

Quels peuvent être les facteurs qui régulent la fréquence et la distribution de la recombinaison chez le colza ? Plus précisément, est-ce que la méthylation de l'ADN et les variations structurales sont impliquées dans le profil de recombinaison du colza *Brassica napus* ? Est-ce que ces facteurs peuvent limiter la recombinaison chez les hybrides allotriploïdes AAC ?





**Chapitre II : Impact du niveau de ploïdie sur  
le profil de recombinaison chez les *Brassica***



## Chapitre II : Impact du niveau de ploïdie sur le profil de recombinaison chez les *Brassica*

### **I. Introduction**

La recombinaison méiotique est très régulée en termes de fréquence et de distribution. Lors de la méiose, un crossover (CO) est obligatoire pour chaque paire de chromosomes homologues afin de permettre la ségrégation correcte des chromosomes homologues dans les gamètes. Chez la majorité des espèces, rarement plus de trois COs ont lieu par paire de chromosomes homologues, indépendamment de la taille des chromosomes (Mercier et al. 2015, Fernandes et al. 2018). Chez de nombreuses espèces, telles que le blé (Raz et al. 2021), le cotonnier (Shen et al. 2017) ou l'orge (Dreissig et al. 2019), la majorité des COs ont lieu au sein des régions distales des chromosomes, alors que les régions (péri)centromériques en sont dépourvus.

Chez plusieurs espèces végétales, il a été observé que l'augmentation du niveau de ploïdie était associée à une augmentation de la fréquence de recombinaison homologue. Ce phénomène a notamment été démontré chez le blé avec un facteur 2,3 entre un diploïde et un hexaploïde (Wan et al. 2021), ainsi que chez *Arabidopsis* (Pecinka et al. 2011) et le cotonnier (Desai et al. 2006) avec un facteur 2 entre un diploïde et un tétraploïde.

Chez les *Brassica*, une comparaison du profil de recombinaison sur l'ensemble du génome a permis de montrer qu'il y a une forte augmentation de la fréquence de recombinaison homologue chez un hybride allotriploïde AAC (facteur 3.6) comparé à un hybride diploïde AA (Pelé et al. 2017). Cette augmentation de la fréquence de la recombinaison est associée à une modification de la distribution des COs, avec la présence de COs dans des régions habituellement dépourvues de COs, telles que les régions proches des centromères.

Dans l'étude présentée dans ce chapitre, nous avons voulu déterminer si cette modification du profil de recombinaison est liée, au moins en partie, à une augmentation du niveau de ploïdie (2x vs 3x vs 4x) ou à une particularité inhérente à la structure allotriploïde AAC. Nous avons complété l'étude du profil de recombinaison établi sur des hybrides AA et AAC (Pelé et al. 2017), avec un hybride AACC. A cette fin, nous avons utilisé exactement les mêmes marqueurs génétiques pour les trois populations. Plus précisément, nous avons cartographié génétiquement une population de backcross issue d'un hybride F1 allotétraploïde AACC possédant le même fond génétique que les hybrides AA et AAC utilisés par Pelé et al. (2017).



L'ensemble des résultats de cette étude a été publié dans la revue *Biology*. Dans un premier temps, nous avons présenté les comparaisons des profils de recombinaison entre les trois niveaux de ploïdie (AA, AAC, AACC). Dans un second temps, nous avons étudié l'efficacité d'introgessions du génome de *B. rapa* dans le fond génétique *B. napus*.




Enfin, nous avons réalisé une preuve de concept montrant l'intérêt d'utiliser la voie AAC afin de réduire la taille des intervalles de confiance de QTLs associés à des caractères d'intérêt agronomique chez le colza.

## **II. A modified meiotic recombination landscape in *Brassica napus* largely improves its breeding efficiency**



## Article

# A Modified Meiotic Recombination in *Brassica napus* Largely Improves Its Breeding Efficiency

Franz Boideau <sup>1,†</sup>, Alexandre Pelé <sup>1,2,†</sup>, Coleen Tanguy <sup>1</sup>, Gwenn Trotoux <sup>1</sup>, Frédérique Eber <sup>1</sup>, Loeiz Maillet <sup>1</sup>, Marie Gilet <sup>1</sup>, Maryse Lodé-Taburel <sup>1</sup>, Virginie Huteau <sup>1</sup>, Jérôme Morice <sup>1</sup>, Olivier Coriton <sup>1</sup>, Cyril Falentin <sup>1</sup>, Régine Delourme <sup>1</sup>, Mathieu Rousseau-Gueutin <sup>1</sup> and Anne-Marie Chèvre <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> IGEPP, INRAE, Institut Agro, Université de Rennes, 35650 Le Rheu, France; franz.boideau@inrae.fr (F.B.); alexandre.pele@outlook.fr (A.P.); coleen.tng@gmail.com (C.T.); gwenn.trotoux@inrae.fr (G.T.); freebe1952@gmail.com (F.E.); loeiz.maillet@inrae.fr (L.M.); marie-madeleine.gilet@inrae.fr (M.G.); maryse.taburel@inrae.fr (M.L.-T.); virginie.huteau@inrae.fr (V.H.); jerome.morice@inrae.fr (J.M.); olivier.coriton@inrae.fr (O.C.); cyril.falentin@inrae.fr (C.F.); regine.delourme@inrae.fr (R.D.); mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr (M.R.-G.)

<sup>2</sup> Laboratory of Genome Biology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University in Poznan, 61-614 Poznan, Poland

\* Correspondence: anne-marie.chevre@inrae.fr; Tel.: +33-2-23-48-51-31

† These authors contributed equally to the work.



**Citation:** Boideau, F.; Pelé, A.; Tanguy, C.; Trotoux, G.; Eber, F.; Maillet, L.; Gilet, M.; Lodé-Taburel, M.; Huteau, V.; Morice, J.; et al. A Modified Meiotic Recombination in *Brassica napus* Largely Improves Its Breeding Efficiency. *Biology* **2021**, *10*, 771. <https://doi.org/10.3390/biology10080771>

Academic Editors: Pierre Devaux and Pierre Sourdille

Received: 12 July 2021

Accepted: 10 August 2021

Published: 13 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** The selection of varieties more resilient to disease and climate change requires generating new genetic diversity for breeding. The main mechanism for reshuffling genetic information is through the recombination of chromosomes during meiosis. We showed in oilseed rape (*Brassica napus*, AACCC,  $2n = 4x = 38$ ), which is a natural hybrid formed from a cross between turnip (*B. rapa*, AA,  $2n = 2x = 20$ ) and cabbage (*B. oleracea*, CC,  $2n = 2x = 18$ ), that there is significantly more crossovers occurring along the entire A chromosomes in allotriploid AAC (crossbetween *B. napus* and *B. rapa*) than in diploid AA or allotetraploid AACCC hybrids. We demonstrated that these allotriploid AAC hybrids are highly efficient to introduce new variability within oilseed rape varieties, notably by enabling the introduction of small genomic regions carrying genes controlling agronomically interesting traits.

**Abstract:** Meiotic recombination is the main tool used by breeders to generate biodiversity, allowing genetic reshuffling at each generation. It enables the accumulation of favorable alleles while purging deleterious mutations. However, this mechanism is highly regulated with the formation of one to rarely more than three crossovers, which are not randomly distributed. In this study, we showed that it is possible to modify these controls in oilseed rape (*Brassica napus*, AACCC,  $2n = 4x = 38$ ) and that it is linked to AAC allotriploidy and not to polyploidy *per se*. To that purpose, we compared the frequency and the distribution of crossovers along A chromosomes from hybrids carrying exactly the same A nucleotide sequence, but presenting three different ploidy levels: AA, AAC and AACCC. Genetic maps established with 202 SNPs anchored on reference genomes revealed that the crossover rate is 3.6-fold higher in the AAC allotriploid hybrids compared to AA and AACCC hybrids. Using a higher SNP density, we demonstrated that smaller and numerous introgressions of *B. rapa* were present in AAC hybrids compared to AACCC allotetraploid hybrids, with 7.6 Mb vs. 16.9 Mb on average and 21 *B. rapa* regions per plant vs. nine regions, respectively. Therefore, this boost of recombination is highly efficient to reduce the size of QTL carried in cold regions of the oilseed rape genome, as exemplified here for a QTL conferring blackleg resistance.

**Keywords:** recombination rate and distribution; polyploidy; allotriploidy; *Brassica napus*; genetic mapping; plant breeding



## 1. Introduction

Meiotic recombination shuffles parental alleles to produce new allelic combinations in the progenies, hence producing new genetic diversity at each generation. This biological mechanism is a key evolutionary process that is commonly used in plant breeding to accumulate favorable alleles and purge deleterious mutations [1–3]. This phenomenon occurs during meiosis, a specialized eukaryotic cell division that gives rise to haploid gametes via a single round of DNA replication followed by two rounds of chromosome segregation [4]. The balanced segregation of homologs during the first meiotic division is ensured by meiotic recombination through crossovers that temporarily connect homologous chromosomes until metaphase I. For successful chromosome segregation and hence the production of viable gametes, such joined homolog pairs require at least one crossover. Besides this crucial role, crossovers result in reciprocal exchanges between homologous non-sister chromatids, generating new allelic combinations in gametes.

However, crossover formation is under tight genetic control [4]. Typically, eukaryotes experience one obligatory crossover per chromosome pair and per meiosis, but rarely more than three, despite a large number of generated DNA double strand breaks (DSBs). For instance, out of the 150 to 250 DSBs generated per meiosis, only ~10 result in crossovers in *Arabidopsis*, the others giving rise to non-crossovers (NCOs) [5,6]. In the last decade, several proteins were highlighted to promote the repair of DSBs into NCOs in *A. thaliana* (e.g., FANCM, RECQ4, FIGL1, HCR1), thereby limiting the overall number of crossovers generated per meiosis [7–10]. Furthermore, crossovers are unevenly distributed along chromosomes [4], with a gradient from the telomere to the centromere, as exemplified in bread wheat [11], maize [12] or potato [13]. Fine characterization of crossover distributions has pointed out links with genomic and epigenetic features, revealing that crossovers preferentially occur close to gene promoters and terminators in euchromatic regions that are hypomethylated and enriched in H3K4me3 histone marks [14–17]. On the contrary, they are greatly reduced or even prevented in regions that are heavily methylated and enriched in H3K9me2, such as pericentromeres [18–20], or regions exhibiting sequence variations (e.g., insertions, deletions, inversions, translocation, etc.) [21]. Consequently, most crossovers occur in a minor proportion of the chromosome, as exemplified in *A. thaliana*, for which 80% of crossovers formed are observed within less than 26% of the genome [14].

Despite the strong regulation of meiotic recombination, extensive variations are observed for crossover number and distribution both between and within species [22,23]. Factors responsible for these modifications have the potential to profoundly influence selective responses and adaptation while accelerating plant breeding programs [24–27]. In a non-exhaustive list of examples, environmental conditions (e.g., abiotic stress, temperature) (for a review, see [28]), sex of meiosis [29,30], genetic background [31–33] and ploidy level (for a review, see [34]) have been linked to variations in crossover level and/or pattern. The most striking in terms of crossover reshuffling and promising in terms of breeding applications is the last factor listed, with the particular case of *Brassica* AAC allotriploids ( $2n = 3x = 29$ ). Indeed, in these viable and fertile hybrids, resulting from the cross between the rapeseed *B. napus* (AACC,  $2n = 4x = 38$ ) and its *B. rapa* diploid progenitor (AA,  $2n = 2x = 20$ ), crossover frequency obtains an unprecedented boost on the A07 chromosome when compared to the results obtained from diploid or allotetraploid hybrids [35]. The A chromosomes show an average recombination frequency that is 3.4-fold higher compared to diploid AA hybrids, carrying identical A genomes, when AAC plants are used as female parents [36]. Moreover, the authors pointed out that this crossover boost is strikingly associated with dramatic changes in the shape of recombination landscapes. Indeed, AAC allotriploids frequently exhibit crossovers in genomic regions that are normally totally deprived of any recombination event in AA diploids, such as the pericentromeres. The molecular mechanisms responsible for this unique recombination landscape observed in *Brassica* AAC allotriploids are currently being investigated but are yet to be deciphered. Nevertheless, it is feasible to recover an AACC genomic structure from AAC plants [37], enabling us to broaden the oilseed rape genetic diversity that has

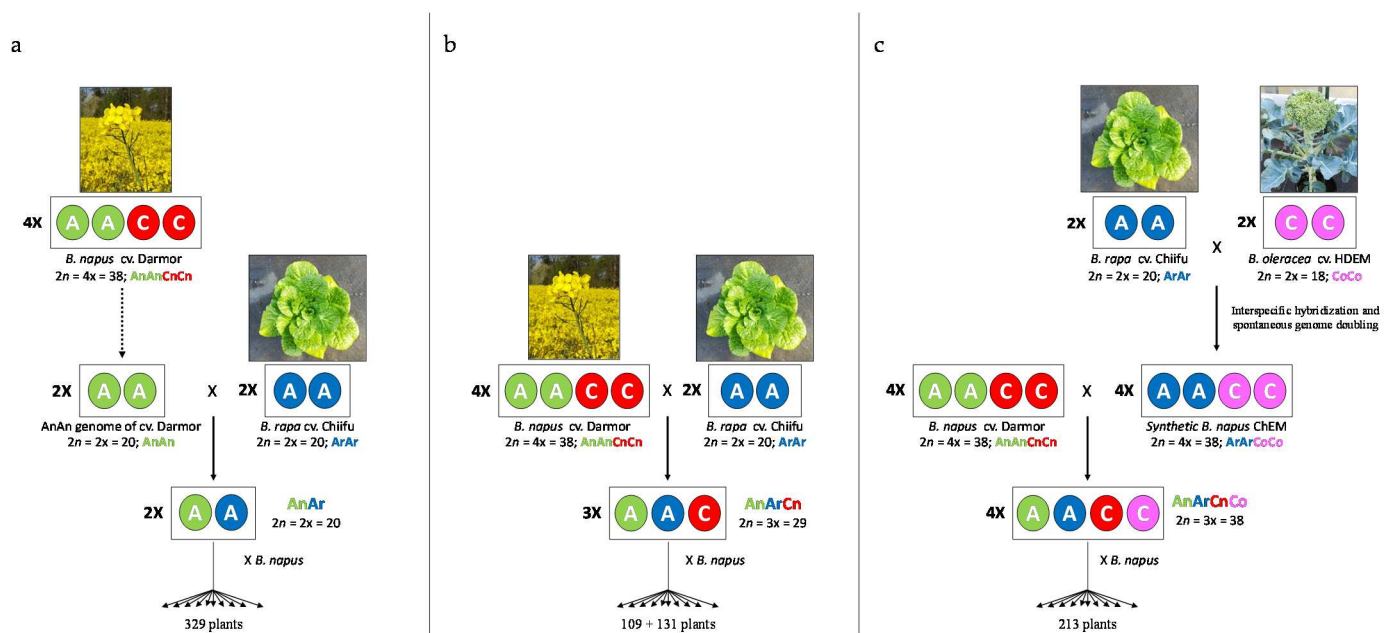
been severely eroded in recent decades due to a high selective pressure applied for yield and seed quality traits [38]. Interspecific crosses between *B. napus* and its *B. rapa* diploid progenitor, combined with reshaped homologous recombination, would facilitate small introgressions of targeted valuable loci deriving from *B. rapa* while preserving the agronomic value of *B. napus* cultivars. Recently, simulations conducted with AA and AAC *Brassica* genetic maps tend to confirm this putative benefit [39,40]. The authors demonstrated the genetic gain resulting from the use of allotriploids in long-term selection programs, at least in non/low-recombining pericentromeric regions. So far, these analyses have been limited to the comparison between AA and AAC hybrids as no comparable genetic maps have been generated to date for allotetraploid AACC hybrids with the same A genetic background as in AAC hybrids. This prevents addressing the role played by polyploidy *per se* in this recombination pattern, as well as the true potential of using allotriploids compared to allotetraploids in oilseed rape breeding programs. Moreover, the potential of using AAC allotriploids (compared to allotetraploids) in reducing the size of a quantitative trait loci (QTL) identified in *B. napus* remains to be assessed.

In the present study, we analyzed how this unique recombination pattern observed in *Brassica* AAC allotriploid hybrids can be used for oilseed rape breeding. Firstly, we tested the impact of polyploidy *per se* vs. AAC allotriploidy by comparing the recombination profile in AA, AAC and AACC hybrids carrying an identical A genotype. We confirmed that the modification of meiosis control only occurs in AAC allotriploid hybrids. Secondly, compared to a previous study [36], we densified the genetic maps from the AAC or AACC hybrids (10 times more SNPs) and finely compared the size and distribution of *B. rapa* introgressions observed along each A chromosome, depending on the hybrid ploidy level. Finally, we highlighted the interest of using allotriploids in breeding programs, by taking the example of a large resistance QTL against *Leptosphaeria maculans* [41] present in a cold recombining pericentromeric region.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material

We compared crossover rate between homologous A chromosomes of *Brassica* hybrids presenting three different ploidy levels but sharing a genetically identical A genome sequence (Figure 1). To that purpose, we used the plant material already described by Pelé et al. [36]: (1) the diploid AnAr ( $2n = 2x = 20$ ) F1 hybrid, which was obtained by crossing the diploid AnAn ( $2n = 2x = 20$ ) genotype extracted from the French variety *B. napus* cv. Darmor AnAnCnCn ( $2n = 4x = 38$ ) [42] with the pure inbred line *B. rapa* ssp. *pekinensis* cv. Chiifu-401-42 (male, ArAr,  $2n = 2x = 20$ ), was backcrossed with the Korean variety *B. napus* cv. Yudal and gave rise to 329 plants; (2) the allotriploid hybrid AnArCn ( $2n = 3x = 29$ ), which was obtained by crossing the allotetraploid *B. napus* cv. Darmor AnAnCnCn ( $2n = 4x = 38$ ) and the pure inbred line *B. rapa* ssp. *pekinensis* cv. Chiifu (male, ArAr,  $2n = 2x = 20$ ), was then backcrossed with the Korean variety *B. napus* cv. Yudal and gave rise to 109 plants. This plant material was complemented by backcrossing the AnArCn hybrid ( $2n = 3x = 29$ ) to *B. napus* cv. Darmor (131 plants selected among 234). To produce the allotetraploid hybrid AnArCnCo ( $2n = 4x = 38$ ), we first crossed the pure inbred line *B. rapa* cv. Chiifu (ArAr,  $2n = 2x = 20$ ) with the doubled haploid *B. oleracea* cv. HDEM (CoCo,  $2n = 2x = 18$ ) and then performed embryo rescue on the obtained amphihaploid (ArCo,  $2n = 19$ ) as described in [43]. This hybrid spontaneously doubled its genomes and gave rise to the resynthesized allotetraploid ArArCoCo ( $2n = 4x = 38$ ), hereafter referred as ChEM. This latter plant was crossed with *B. napus* cv. Darmor as female, and the AnArCnCo F1 hybrid gave rise to 213 plants after backcrossing with *B. napus* cv. Darmor as male. All parental accessions were provided by the Biological Resource Center BrACySol (Ploudaniel, France).



**Figure 1.** Production of (a) AnAr diploid, (b) AnArCn allotriploid and (c) AnArCnCo allotetraploid hybrids sharing the same A genotype and their derived progenies.

## 2.2. Flow Cytometry and Cytogenetic Studies

Chromosome numbers were assessed in leaves by flow cytometry as described by [37]. For the establishment of meiotic behavior, samples of young floral buds were fixed in Carnoy's solution (alcohol:chloroform:acetic acid, 6:3:1) for 24 h at room temperature and stored until use in 50% ethanol at 4 °C. Anthers were then squashed and stained with 1% aceto-carmin. Chromosome pairing was assessed per plant from 20 pollen mother cells (PMCs) at metaphase I. For analyzing pairing between A and C chromosomes at metaphase I, BAC FISH was performed as described in [37] using the *B. oleracea* BoB014O06 BAC [44] as “genomic in situ hybridization-like” (GISH-like) to specifically distinguish all C chromosomes.

## 2.3. DNA Extraction and SNP Genotyping

Genomic DNA was extracted from lyophilized young leaves with the beadex maxi plant kit (LGC Genomics, Teddington Middlesex, UK) on the oKtopure robot at the GENTYANE platform (INRAE, Clermont-Ferrand, France). Genotyping data were obtained using the 202 SNP markers already defined [36], and revealed by Biomark™ HD system (Fluidigm technology) and KASPar™ chemistry (GENTYANE platform INRAE, Clermont-Ferrand, France), as well as from the *Brassica* 15K Illumina Infinium SNP array (SGS-TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Germany). The context sequences of each SNP marker were physically localized on the reference genome *B. rapa* Chiifu v1.5 [45] and *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 [46] using BLASTn (ver. 2.9.0, min. e-value  $1 \times 10^{-20}$ ) [47] and by keeping the best blast hit obtained for a given subgenome (minimum percentage of alignment and identity: 80%). SNPs that were polymorphic between the parental genotypes (i.e., AA in *B. rapa* and BB in *B. napus*, or vice versa) were selected for either the establishment of genetic maps or assessment of introgressed regions from the diploid parent into the *B. napus* genome.

## 2.4. Genetic Maps

The first genetic maps were established separately for the AnAr, the AnArCn and the AnArCnCo populations using the CarthaGene software (v. 1.2.3, [48]). Establishment of linkage groups and SNP ordering were examined using a logarithm of odds score (LOD) threshold of 4.0 and a maximum recombination frequency of 0.4, as described

in [36]. Potential double crossover supported by only one genetic marker and with a physical distance between these two events below 500 kb was corrected as missing data, as described in [21]. After these few corrections, the final genetic maps were created using the Kosambi function to evaluate the genetic distances in centimorgans (cM) between linked SNP markers [49].

### 2.5. Characterization of the *B. rapa* Introgressions

Introgressions were determined by two methods, if either one SNP or at least two consecutive SNP markers were detected as heterozygous in each plant from the backcross progeny. To estimate the length of the introgressed regions detected by only one SNP and to prevent the underestimation of the smallest introgressions, we considered the position of the consecutive previous and following SNPs. The positions of the first and last heterozygous SNPs were used to infer the size of introgressed regions defined by at least two consecutive SNPs, preventing the overestimation of introgressions. Each SNP can be present in introgressions of different sizes in different plants of a progeny and we calculated per population for each SNP position the average size of the introgressions carrying this marker.

### 2.6. Localization of a QTL of Interest

A quantitative trait locus (QTL) involved in blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance [41] and present on the *B. napus* cv. Darmor A01 chromosome was selected for its pericentromeric localization. The context sequences of the SNP markers (derived from *Brassica* 60 K Illumina Infinium array) flanking this QTL were retrieved and physically localized on the *B. napus* reference genome Darmor-bzh v10 [46] using BLASTn [47].

### 2.7. Inferring the Position of Centromeric and Pericentromeric Regions

The centromeric regions were defined by blasting several centromeric-specific repeats (CentBr1, CentBr2, TR238, TR805, PCRBr and CRB; [50,51]) against *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 [46] and by examining the plot density of the BLASTn results (e-value less than  $1 \times 10^{-20}$ ). The pericentromeric borders for each chromosome were inferred by using the mean gene density along the chromosomes (as presented in [52]) and defined as the regions surrounding the centromere with a gene density below the chromosome average.

### 2.8. Statistical Analyses

The heterogeneity of crossover rates among progenies was assessed for every interval between consecutive SNP markers using a 2-by-2 chi-squared analysis considering a significance threshold of 5%. Additionally, the heterogeneity of crossover rates among progenies was evaluated at chromosome and genome scales using 2-by-2 chi-squared tests. For these tests, a conservative Bonferroni-corrected threshold of 5% was applied, using the number of intervals between adjacent SNP markers per A chromosome or for the A genome (as described in [36]).

The relationships between the relative size of introgressions normalized per A chromosome (%) vs. their relative distance from the centromeres (%) were studied by regression analyses, using the Spearman rank correlation, for linear ( $y = ax + b$ ) and order 2 polynomial ( $y = ax^2 + bx + c$ ) regressions (as described in [36]).

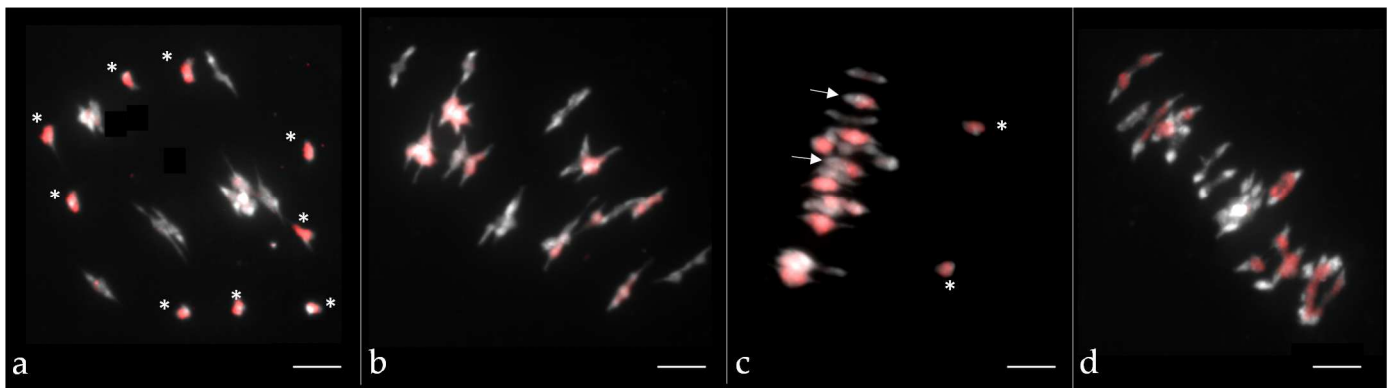
## 3. Results

### 3.1. Impact of Brassica Hybrid Genomic Structure (Diploid, Allotriploid or Allotetraploid) on Homologous Recombination Frequency and Distribution

To accurately compare the homologous recombination profile between hybrids of different ploidy levels in *Brassica*, we generated AnAr, AnArCn and AnArCnCo F1 hybrids that present the same A genome nucleotidic sequence originating from *B. napus* cv. Darmor (AnAnCnCn) and *B. rapa* cv. Chiifu (ArAr) (Figure 1). The diploid AnAr and the allotriploid AnArCn F1 hybrids have been described by [36]. Here, we also studied the meiotic behavior



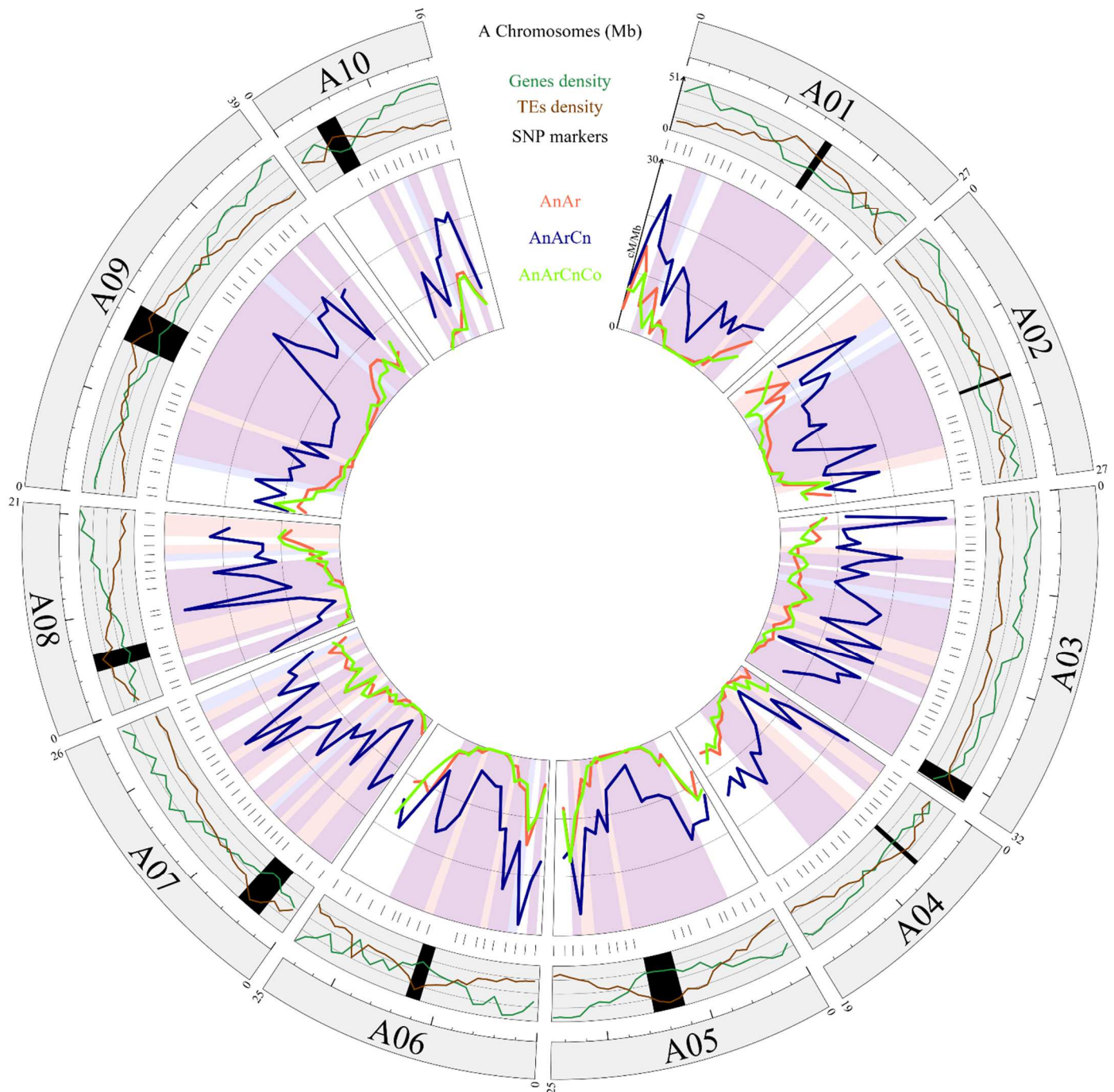
of different allotriploid AnArCn hybrids (Table S1) and observed that they generally showed the expected meiotic configuration with 9 C univalents and 10 A bivalents as revealed by GISH-like analyses (Figure 2a). To produce the backcrossed progeny, we selected an AAC hybrid showing more than 80% of pollen mother cells with the expected configurations. In the backcross progeny of this hybrid, we were able to retrieve two plants with an AACC genomic structure over the 234 plants generated. Moreover, to create the allotetraploid AnArCnCo hybrid, we first produced the resynthesized *B. napus* ChEM by crossing *B. rapa* cv. Chiifu with *B. oleracea* cv. HDEM, followed by genome doubling of the resulting AC amphihaploid hybrid. Meiotic stability of the resynthesized allotetraploid was thereafter studied, revealing a relatively regular meiotic behavior with 70% of pollen mother cells in metaphase I exhibiting 19 bivalents (Table S1). These results were in agreement with GISH-like analyses, which revealed a regular pairing (Figure 2b) with rare A and C chromosome pairing (Figure 2c). After crossing the resynthesized *B. napus* ChEM to *B. napus* cv. Darmor, we selected the most stable F1 hybrid (Table S1, Figure 2d) and produced 213 progeny plants via a backcross to *B. napus* cv. Darmor. This progeny was genotyped with the same 202 SNPs used in [36], allowing a reliable comparison of the genetic maps derived from AnAr, AnArCn and AnArCnCo hybrids.



**Figure 2.** Chromosome pairing at metaphase I in pollen mother cells of (a) the allotriploid AnArCn, (b,c) the synthetic *B. napus* ChEM ArArCoCo-S0 and (d) the allotetraploid AnArCnCo hybrid. C chromosomes are labeled in red via the use of the Bob014O06 BAC clone (GISH-like). Univalents are indicated by a \* and A–C bivalents by an arrow. Chromosomes were counterstained with DAPI. Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

In total, cumulated genetic maps of the 10 A chromosomes of AnAr, AnArCn and AnArCnCo hybrids showed 830.2, 2902.3 and 790.8 cM, respectively. Pairwise comparison indicated a similar level of recombination at the whole A genome scale between the AnAr and AnArCnCo hybrids (Bonferroni-corrected chi-square test,  $p = 0.18$ ). However, significant variations were detected for 3x vs. 2x and 3x vs. 4x. In both cases, A genome-wide crossover rate was on average 3.6-fold higher in the allotriploid hybrids (Bonferroni-corrected chi-square test,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). After anchoring the polymorphic SNPs on the *B. rapa* cv. Chiifu v1.5 Ar genome, crossover distribution was analyzed by assessing heterogeneity of crossover rates among progenies for every interval between adjacent SNP markers. Similar recombination landscapes were thus identified between the AnAr and AnArCnCo hybrids as they evidenced significant differences in crossover rate in only two intervals out of 192 (1%), spanning 3.19 and 1.53 Mb on chromosomes A02 and A06, respectively (Bonferroni-corrected chi-square test,  $p < 0.05$ ). However, comparison of AnArCn with AnAr and AnArCnCo hybrids revealed significant differences in crossover rate in more than 60% (133 and 118 over 192, respectively) of the intervals ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). Importantly, from the 20 intervals surrounding the centromeric regions (1 Mb from each centromeric border) of the 10 A chromosomes, we noticed that the recombination frequencies were always higher in the allotriploids compared to the diploid and allotetraploid hybrids. Significant differences were detected for 18 and 10 intervals in

the AnArCn vs. AnAr and AnArCn vs. AnArCnCo comparisons, respectively ( $p < 0.05$ ). Therefore, we concluded that recombination landscapes along A chromosomes of the allotriploid hybrid differed in a similar way, in regard to pericentromeric regions, to those of the diploid and allotetraploid hybrids.

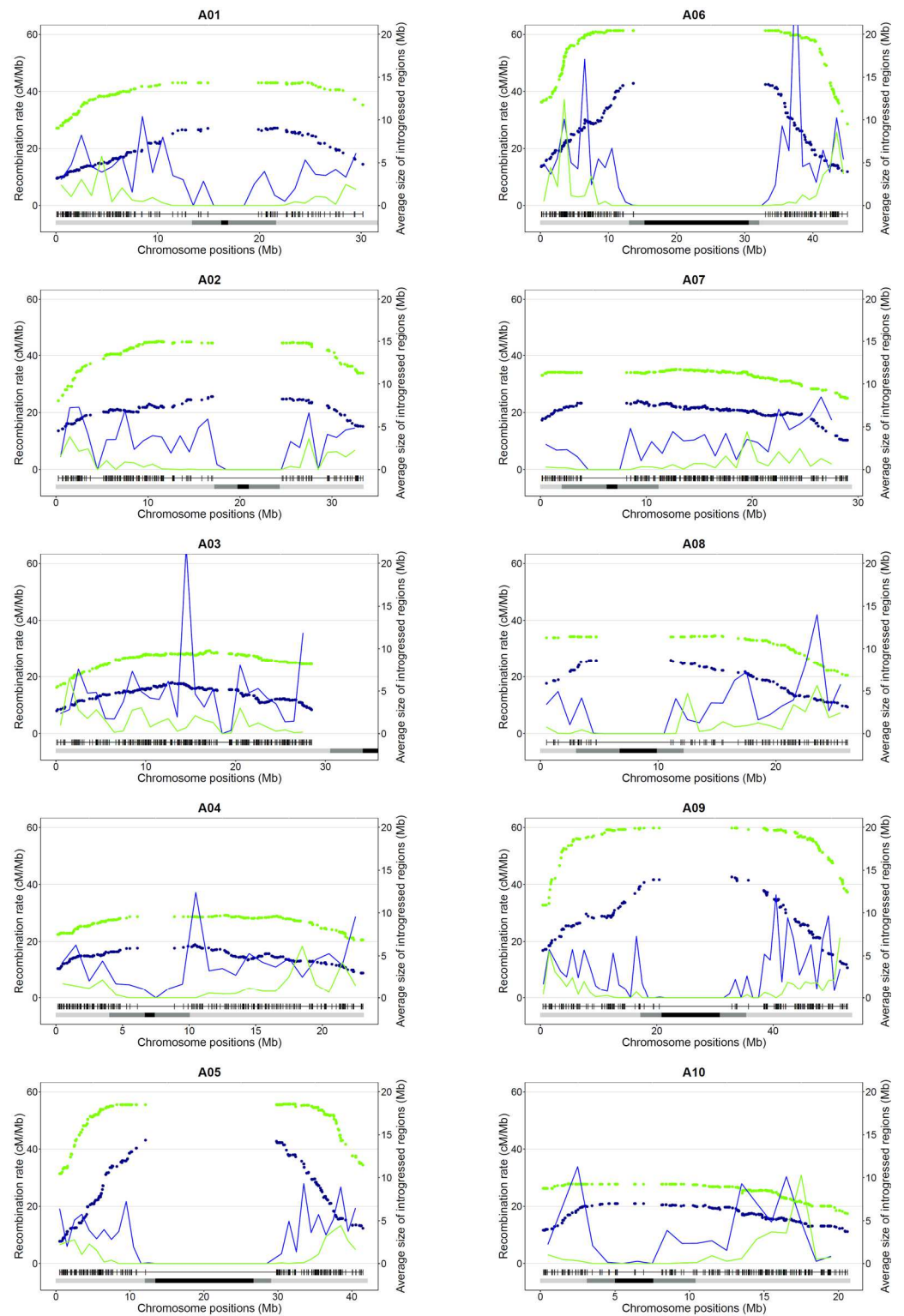


**Figure 3.** Homologous recombination landscape in diploid, allotriploid and allotetraploid hybrids. The first circle represents the 10 chromosomes of *B. rapa* cv. Chiifu v1.5. Within the second circle, the gene and transposable element (TE) densities along each A chromosome are mentioned, with black rectangles indicating the putative centromere positions [53]. In the inner circle, the recombination rates (cM/Mb) of AnAr (2x), AnArCn (3x) and AnArCnCo (4x) are shown as red, blue and green lines, respectively. Significant differences within an interval are highlighted in peach, light blue and purple for 2x vs. 3x, 4x vs. 3x, or 4x and 2x vs. 3x, respectively. Above the recombination landscape, the physical position of each polymorph SNP used for these comparisons is indicated.

### 3.2. Impact of Recombination on the Size and Distribution of Introgression within Oilseed Rape

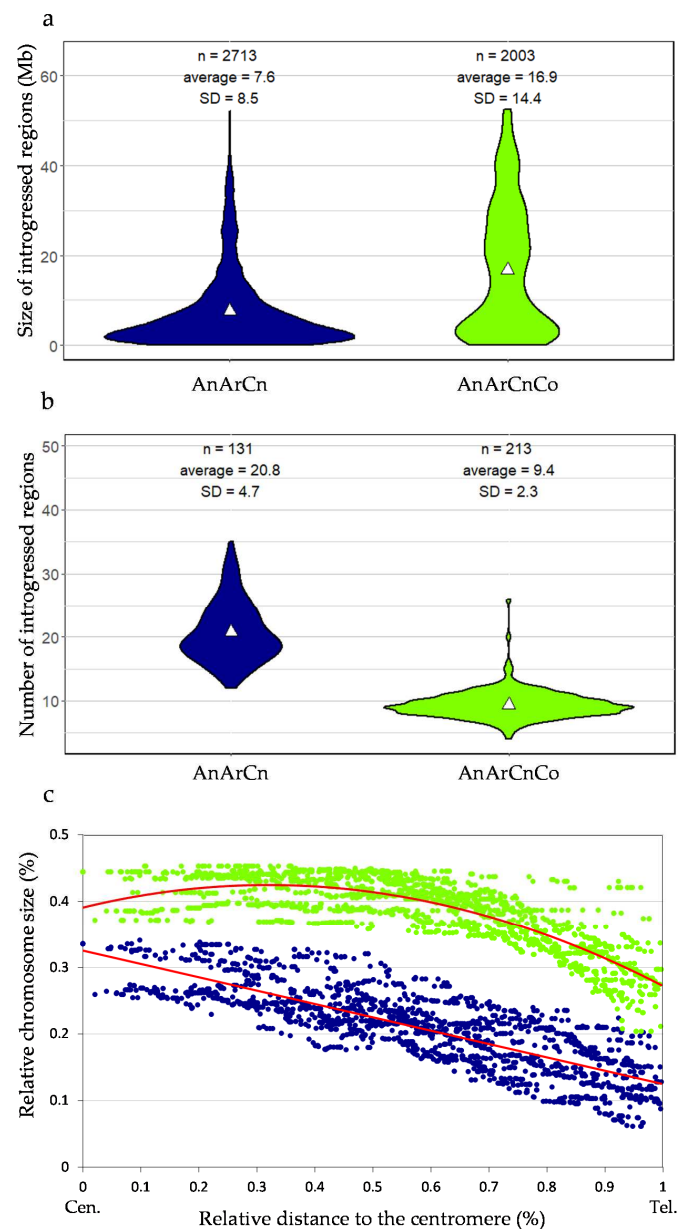
To obtain a finer analysis of the crossover distribution in the allotriploid and allotetraploid hybrids, we then analyzed their progenies using the 15K SNP Illumina Infinium array. A total of 2340 polymorphic SNP markers were physically anchored on the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 A genome, increasing the number of SNPs used for the comparison by more than ten times. On average, a polymorphic marker was observed every 150 kb along each A chromosome. Using this larger number of markers, we obtained genetic maps of 3045.4 and 827.7 cM for AnArCn and AnArCnCo hybrids, respectively. We thus improved the accuracy of our comparison and confirmed a higher recombination frequency in AnArCn (3.7-fold) compared to AnArCnCo hybrids ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ).

Given this extraordinary reshuffling of meiotic recombination occurring in allotriploids, we analyzed the size and distribution of Ar introgressions within the An oilseed rape genome according to the genomic structure of the F1 hybrids. The overall introgressed *B. rapa* genetic diversity introduced per generation is similar in allotriploid and allotetraploid hybrids (50% and 48%). However, as expected, with a larger number of crossovers occurring per chromosome pair and per meiosis, we observed that the mean introgression sizes were significantly smaller when arising from the meiosis of allotriploid compared to allotetraploid hybrids, with an average of 7.6 Mb vs. 16.9 Mb, respectively (Mann–Whitney–Wilcoxon test,  $p = 6.4 \times 10^{-104}$ ) (Figures 4 and 5a). As a second effect of crossover boost, significantly more introgressions from *B. rapa* were detected in backcross progeny of allotriploid hybrids with on average 21 heterozygous regions (on the 10 A chromosomes) per plant vs. nine regions in the backcross progeny of the allotetraploid hybrid (Mann–Whitney–Wilcoxon test,  $p = 2.3 \times 10^{-53}$ ) (Figure 5b). Interestingly, the size of introgressions varied along the chromosome arms. The largest introgressions tended to colocalize around pericentromeric regions while the smallest were more frequently observed on chromosome extremities (Figure 4). In an A genome-wide approach, using the relative size of introgressions normalized per A chromosome (%) and their relative distance from the centromeres (%), the regression analyses revealed a positive linear relationship within AnArCo ( $R^2 = 0.66$ ) and a positive binomial relationship within AnArCnCo ( $R^2 = 0.68$ ) hybrids (Figure 5c; Spearman rank correlation,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). For both AnArCn and AnArCnCo hybrids, these results demonstrate that the size of introgressions increases toward the centromeres, which is in agreement with the crossover distribution along the chromosome arms: the higher rates of recombination result in smaller sizes of introgressions. However, the significant binomial regression unraveled in the AnArCnCo hybrid translates to a less continuous gradient of introgression size from the telomere to the centromere. Strikingly, 70% of the chromosome arms carried introgressions, representing about 40% of the chromosome size in this hybrid. Analyses conducted at the scale of individual A chromosomes revealed similar results (Figure S1, Table S2). The only exception is the A03 chromosome for which no significant gradient for the size of introgressions was observed in both AnArCn and AnArCnCo hybrids. This might be due to the presence of the nucleolus organizer region on the short arm of A03 [54]. For this reason, this chromosome was not considered when performing the A genome-wide approach.



**Figure 4.** Recombination and introgression patterns along the ten A chromosomes of the allotriploid ( $AnArCn$ ) and allotetraploid ( $AnArCnCo$ ) hybrids. For each A chromosome (A01 to A10), the distribution of the recombination (in cM/Mb, indicated by lines) and average size of introgressions (in Mb, represented by dots) at each marker position in the progeny of allotriploid (blue) and allotetraploid hybrid (green) are presented for all A chromosomes. Below each graph, the physical positions of polymorph SNPs along each *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 chromosome are indicated. The position of pericentromeres and centromeres (inferred in this study) are illustrated as light gray and black boxes, respectively.



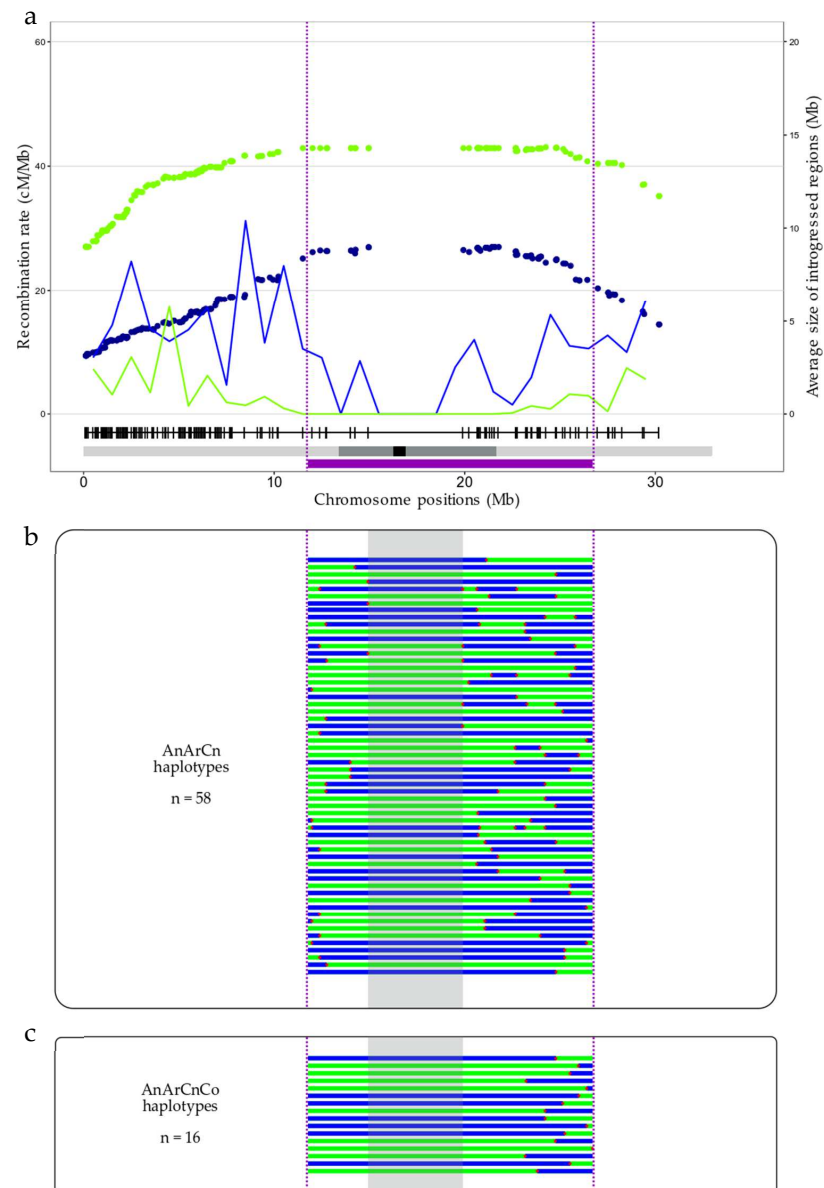


**Figure 5.** Characterization of introgressions in the AnArCn and AnArCnCo populations. (a) Size of introgressions, (b) number of introgressions. White triangle indicates mean. (c) Correlation between the relative introgression size and their relative position from the centromere (Cen.) to the telomere (Tel.) analyzed in the progeny of the AnArCn hybrid (blue) and AnArCnCo hybrid (green). Regression lines are indicated in red.

### 3.3. Interest in Using the Modified Recombination Pattern Observed in AAC Allotriploid Hybrid to Reduce the Size of a QTL Present in a *B. napus* Pericentromeric Region

To highlight the potential of using the modified recombination landscape observed in *Brassica* AAC allotriploids for breeding purposes, we chose as an example a QTL responsible for blackleg resistance that is present in the A01 pericentromeric region [41], at 11.8–26.7 Mb on the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 reference genome. The comparison of the recombination profiles from backcrossed progenies of allotriploid and allotetraploid hybrids revealed that significantly more crossovers were formed during the meiosis of the AnArCn hybrid compared to the AnArCnCo hybrid in this particular region, with 131 vs. 24 crossovers (corresponding to 58 and 16 different haplotypes), respectively (chi-square test,  $p = 1.75 \times 10^{-32}$ ). At least one recombination event was detected in 70.23% vs. 11.27%

of the AnArCn and AnArCnCo progenies, respectively, highlighting the highest diversity of gametes produced by the AnArCn hybrid compared to the AnArCnCo hybrid. It allowed us to break down the QTL into five regions of 0.02 to 10.7 Mb in the AnArCnCo population, and into 13 regions of 0.004 to only 4.96 Mb in the AnArCn population (Figure 6). It is important to note that the 4.96 Mb region that appeared to be deprived of crossovers in the AnArCn hybrid corresponds to a region lacking polymorphic markers, preventing the detection of the putative presence of crossovers in this region. Altogether, these results support the high potential of AAC allotriploids to reduce QTL confidence intervals.



**Figure 6.** Crossover localization in a pericentromeric region carrying a QTL conferring resistance to *Leptosphaeria maculans*. (a) Recombination rate (in cM/Mb, as lines) and the average size of introgression (in Mb, as dots) along the A01 chromosome, for the AnArCn (green) and AnArCnCo (blue) hybrids. The resistance QTL is represented by a purple box with its borders delimited by purple dashed lines. The different possible haplotypes found in the backcross progeny of (b) the AnArCn (131 plants) or (c) the AnArCnCo hybrids (213 plants) are displayed, with the homozygous *B. napus* cv. Darmor regions in green and the introgressed regions of *B. rapa* cv. Chiifu in blue. A 4.96 Mb region surrounding the centromere and deprived of markers is highlighted in gray. Red stars symbolize the crossover positions.

#### 4. Discussion

The production of *Brassica* AAC allotriploid hybrids, derived from the direct cross between *B. napus* and its diploid *B. rapa* progenitor, offers a unique opportunity to introgress into *B. napus* small regions of interest derived from *B. rapa* but also to highly shuffle *B. napus* diversity and decrease the size of interesting *B. napus* QTL. Indeed, this allotriploid structure allows the modification of recombination control, with an increased crossover frequency ( $\times 3.7$ ) compared to allotetraploids, and, more interestingly, with the formation of crossovers all along the A chromosomes even in usually cold regions such as pericentromeres. These results are in agreement with previous data [36] comparing diploid and allotriploid hybrids. However, our results differ from those obtained by Leflon et al. [35], who predicted a two-fold increase in the recombination frequency in allotetraploid compared to diploid hybrids, using 18 markers of the A07 chromosome without physical anchoring on the A07 chromosome. These different results may be partly explained by the difference in marker density between the two studies, as well as by the use of different genetic backgrounds. Indeed, Pelé et al. [36] observed a slight difference ( $\times 1.4$ ) in the recombination rates depending on the origin of the AAC allotriploid hybrid. Nevertheless, both studies agreed with the fact that AAC allotriploidy and not allopolyploidy *per se* can deeply modify the homologous recombination frequency and distribution.

##### 4.1. Comparison of Breeding Strategies

Two breeding strategies can be used to introduce into oilseed rape genetic diversity or interesting traits derived from one of its diploid progenitors, *B. rapa*: either direct crosses between *B. napus* and *B. rapa* or a bridge with a resynthesized oilseed rape. For the latter, it has been clearly demonstrated that homoeologous pairing occurs during the first meiosis of synthetics [43,55,56]. Such homoeologous rearrangements between A and C chromosomes are at the origin of genomic instability with univalent and multivalent formation, resulting in reduced fertility [57–60]. Despite this genomic instability, it has been shown in several instances that homoeologous exchanges were used (sometimes inadvertently) and useful for *B. napus* breeding (for a review, see [61]). Indeed, recent sequencing data revealed that the absence of glucosinolate in seeds, a highly selected trait in oilseed rape, is partially due to a non-reciprocal translocation between A and C genomes [62]. Similarly, other translocations between A and C genomes were shown to impact several important agronomic traits, such as flowering precocity [63], disease resistance [64] or even seed quality [65]. The major difficulty in the case of exchanges between A and C genomes is to then restore the meiotic stability by decreasing the size of the introgressed region inserted in one genome to the other one. Major traits present in *B. napus* progenitors were not only introduced from resynthesized tetraploids via homoeologous recombination but also via homologous recombination. This was notably the case when introducing a clubroot resistance locus present in a *B. rapa* accession into *B. napus*, leading to the *B. napus* variety Mendel, which is resistant to this disease [66,67]. However, results from the present study demonstrate that homologous recombination remains limited using resynthesized *B. napus*, making it difficult to restrict the introgression to the locus of interest. Large introgression sizes arising from this strategy, as we evidenced here, might bring undesirable loci that could reduce the agronomical value of *B. napus* elite varieties.

On the contrary, we showed that direct crosses between *B. napus* and *B. rapa* significantly improve the genetic shuffling of diversity all along the A genome. This strategy has also been largely used to generate new oilseed rape lines by backcrossing and/or selfing AAC hybrids [68,69], producing new lines with interesting heterosis. For example, the Chinese elite variety and reference genome Zs11 was obtained through this strategy [70]. The frequent use of *B. rapa* in Asian *B. napus* breeding programs may partially explain why Asian oilseed rape varieties appear as a specific group of oilseed rape varieties and why it is still possible to detect *B. rapa* introgression in this material [71]. Similarly, direct crosses between *B. napus* and *B. rapa* have been performed to introduce in *B. napus* major resistance genes to clubroot [72] or blackleg [73].

#### 4.2. Optimization of Breeding Strategies

We showed that the occurrence of crossovers all along the A chromosomes, and especially in the normally cold pericentromeric regions, offers opportunities to introduce a small region of interest from *B. rapa* but also to reduce the *B. napus* QTL size. Tourrette et al. [40] found, using the data we previously obtained in *Brassica* allotriploids [36], that it is possible to decrease by a factor 10 the linkage drag in the cold region in BC3S1 after foreground selection for three backcrosses and background selection at the last selfing generation. This strategy seems, however, less efficient if the region of interest is located in a hot recombining region. Using an example of a large QTL for blackleg resistance [41] present in pericentromeric region of the A01 chromosome, we showed that the recombination rate in AAC hybrids may significantly reduce the QTL size. This result suggests that the simulation [40] can be transposed to oilseed rape breeding and can be highly efficient. The AAC hybrids offer the possibility to limit the introduction from *B. rapa* to the region of interest as well as to favor the cloning of QTL carried by *B. napus* in a cold recombinant region by breaking down the linkage disequilibrium. Thus, it will be of particular interest to more frequently apply this strategy in order to rapidly and more efficiently identify the genes underlying the different QTL identified for disease resistance or other important traits for *B. napus* (for a review, see [74]). Taking advantage of the high quality of recent *B. napus* genome assemblies [46,75], it becomes possible to define new markers, especially in pericentromeric regions, allowing a better assessment of recombination in these cold regions.

#### 4.3. Development of the Strategy on Other Models

Whether the reshaping of homologous recombination observed in AAC allotriploids similarly occurs in CCA allotriploids, resulting from the cross between *B. napus* and its other diploid progenitor *B. oleracea*, remains to be deciphered (currently in progress). Even if these later CCA hybrids are more difficult to generate [76], improved recombination between homologous C chromosomes would also strongly benefit *B. napus* breeding programs. In fact, different studies revealed that it could be useful to introduce into *B. napus* new diversity from *B. oleracea* [77], such as clubroot resistance traits [78], and conversely from *B. napus* to *B. oleracea* [79]. It will also be interesting to determine if this modified homologous recombination landscape is also present in the other possible allotriploids from the U triangle [80], e.g., either AAB (deriving from *B. juncea* × *B. rapa*) or CCB (*B. carinata* × *B. oleracea*) hybrids, and thus possibly be useful for *Brassica* breeding.

### 5. Conclusions

Meiotic recombination is a key process that generates new genetic diversity and enables the combination of favorable alleles. However, it is strictly regulated, both in frequency and distribution. In this study, we were able to demonstrate that an AAC allotriploid hybrid presents a higher recombination rate and modified distribution compared to AA or AACC hybrids (with the latter hybrids presenting a similar recombination landscape). The boost of recombination observed in AAC hybrids allows the introduction of more and smaller genomic regions from *B. rapa* to *B. napus* compared to AACC hybrids, with a decreasing gradient of the introgression size from the centromere to the telomere in both hybrids. For breeders, the introgression of smaller genomic regions highlights the interest in using AAC allotriploid hybrids to further break the linkage disequilibrium. Additionally, the unique recombination landscape observed in AAC allotriploid hybrids will facilitate the identification of candidate genes underlying QTL of agronomical interests, most particularly in the normally cold pericentromeric regions.

**Supplementary Materials:** The following supplementary materials are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biology10080771/s1>, Figure S1: Correlations between the relative size of introgressions (%) and their relative position to the centromere (%) for the ten A chromosomes, Table S1: Meiotic behavior of ArArCoCo-S0 synthetic and AnArCnCo, AnArCn F1 hybrids, Table S2:

Correlation metrics between the relative size of introgressions (%) and their relative position to the centromere (%).

**Author Contributions:** Conceptualization: F.B., A.P., M.R.-G. and A.-M.C.; plant creation and care: G.T. and M.G.; genotyping data analyses: C.T., F.B., A.P., M.L.-T., R.D. and C.F.; bioinformatic analyses: L.M. and J.M.; molecular cytogenetic analyses: G.T., V.H., O.C., F.B., F.E. and A.-M.C.; writing: F.B., A.P., M.R.-G. and A.-M.C.; funding acquisition: M.R.-G. and A.-M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the ANR-JCJC project Stirrer (ANR-19-CE20-0013, awarded to M.R.-G.). This research was also partly funded by grants from the INRAE “Biology and Plant Breeding” department (“Recipe” and “Recoptic” projects) awarded to A.-M.C. and M.R.-G. F.B.’s Ph.D. scholarship is funded by the Brittany State and the INRAE “Biology and Plant Breeding” department.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Genotyping data of the 202 SNP used for the AA and AAC hybrids were retrieved from Pelé et al. (2017) (available online: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006794#sec024>, accessed on February 2021).

**Acknowledgments:** We thank the Molecular Cytogenetic platform (Rennes, France, <https://www6.rennes.inrae.fr/igepp/L-IGEPP/Plateformes/Cytogenetique-moleculaire> (accessed on 11 July 2021)) for cytogenetic analyses, UMR INRA 1095 “GENTYANE platform” (Clermont-Ferrand, France, <http://gentyane.clermont.inra.fr/> (accessed on 11 July 2021)) for the DNA extraction of segregated populations and KASPar genotyping, and the platform TraitGenetics (Gatersleben, Germany, <http://www.traitgenetics.com/> (accessed on 11 July 2021)) for genotyping using the *Brassica* 15K Illumina Infinium SNP array. We acknowledge the BrACySol BRC (INRA Ploudaniel, France, <https://www6.rennes.inrae.fr/igepp/L-IGEPP/Plateformes/BrACySol> (accessed on 11 July 2021)) that provided the seeds of the parental lines. We would also like to thank all the technical staff of the greenhouse for management of the plant material (especially L. Charlon, P. Rolland, J.-P. Constantin, J.-M. Lucas and F. Letertre).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Felsenstein, J. The Evolutionary Advantage of Recombination. *Genetics* **1974**, *78*, 737–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Barton, N.H.; Charlesworth, B. Why Sex and Recombination? *Science* **1998**, *281*, 1986–1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wijnker, E.; de Jong, H. Managing Meiotic Recombination in Plant Breeding. *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 640–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mercier, R.; Mézard, C.; Jenczewski, E.; Macaisne, N.; Grelon, M. The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2015**, *66*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sanchez-Moran, E.; Santos, J.-L.; Jones, G.H.; Franklin, F.C.H. ASY1 Mediates AtDMC1-Dependent Interhomolog Recombination during Meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev.* **2007**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ferdous, M.; Higgins, J.D.; Osman, K.; Lambing, C.; Roitinger, E.; Mechtler, K.; Armstrong, S.J.; Perry, R.; Pradillo, M.; Cuñado, N.; et al. Inter-Homolog Crossing-Over and Synapsis in Arabidopsis Meiosis Are Dependent on the Chromosome Axis Protein AtASY3. *PLoS Genet.* **2012**, *8*. [[CrossRef](#)]
7. Crismani, W.; Girard, C.; Froger, N.; Pradillo, M.; Santos, J.L.; Chelysheva, L.; Copenhaver, G.P.; Horlow, C.; Mercier, R. FANCM Limits Meiotic Crossovers. *Science* **2012**, *336*, 1588–1590. [[CrossRef](#)]
8. Girard, C.; Chelysheva, L.; Choinard, S.; Froger, N.; Macaisne, N.; Lehmemdi, A.; Mazel, J.; Crismani, W.; Mercier, R. AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005369. [[CrossRef](#)]
9. Séguéla-Arnaud, M.; Crismani, W.; Larchevêque, C.; Mazel, J.; Froger, N.; Choinard, S.; Lemhemdi, A.; Macaisne, N.; Van Leene, J.; Gevaert, K.; et al. Multiple Mechanisms Limit Meiotic Crossovers: TOP3 $\alpha$  and Two BLM Homologs Antagonize Crossovers in Parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 4713–4718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Nageswaran, D.C.; Kim, J.; Lambing, C.; Kim, J.; Park, J.; Kim, E.-J.; Cho, H.S.; Kim, H.; Byun, D.; Park, Y.M.; et al. High Crossover Rate1 Encodes Protein Phosphatase X1 and Restricts Meiotic Crossovers in Arabidopsis. *Nat. Plants* **2021**, *7*, 452–467. [[CrossRef](#)]



11. Saintenac, C.; Falque, M.; Martin, O.C.; Paux, E.; Feuillet, C.; Sourdille, P. Detailed Recombination Studies along Chromosome 3B Provide New Insights on Crossover Distribution in Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Genetics* **2009**, *181*. [[CrossRef](#)]
12. Anderson, L.K.; Doyle, G.G.; Brigham, B.; Carter, J.; Hooker, K.D.; Lai, A.; Rice, M.; Stack, S.M. High-Resolution Crossover Maps for Each Bivalent of Zea Mays Using Recombination Nodules. *Genetics* **2003**, *165*, 849–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Felcher, K.J.; Coombs, J.J.; Massa, A.N.; Hansey, C.N.; Hamilton, J.P.; Veilleux, R.E.; Buell, C.R.; Douches, D.S. Integration of Two Diploid Potato Linkage Maps with the Potato Genome Sequence. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36347. [[CrossRef](#)]
14. Choi, K.; Zhao, X.; Kelly, K.A.; Venn, O.; Higgins, J.D.; Yelina, N.E.; Hardcastle, T.J.; Ziolkowski, P.A.; Copenhaver, G.P.; Franklin, F.C.H.; et al. Arabidopsis Meiotic Crossover Hotspots Overlap with H2A.Z Nucleosomes at Gene Promoters. *Nat. Genet.* **2013**, *45*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Choi, K.; Henderson, I.R. Meiotic Recombination Hotspots—A Comparative View. *Plant J.* **2015**, *83*, 52–61. [[CrossRef](#)]
16. Choi, K.; Zhao, X.; Tock, A.J.; Lambing, C.; Underwood, C.J.; Hardcastle, T.J.; Serra, H.; Kim, J.; Cho, H.S.; Kim, J.; et al. Nucleosomes and DNA Methylation Shape Meiotic DSB Frequency in Arabidopsis Thaliana Transposons and Gene Regulatory Regions. *Genome Res.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Marand, A.P.; Jansky, S.H.; Zhao, H.; Leisner, C.P.; Zhu, X.; Zeng, Z.; Crisovan, E.; Newton, L.; Hamernik, A.J.; Veilleux, R.E.; et al. Meiotic Crossovers Are Associated with Open Chromatin and Enriched with Stowaway Transposons in Potato. *Genome Biol.* **2017**, *18*, 203. [[CrossRef](#)]
18. Colome-Tatche, M.; Cortijo, S.; Wardenaar, R.; Morgado, L.; Lahouze, B.; Sarazin, A.; Etcheverry, M.; Martin, A.; Feng, S.; Duvernois-Berthet, E.; et al. Features of the Arabidopsis Recombination Landscape Resulting from the Combined Loss of Sequence Variation and DNA Methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16240–16245. [[CrossRef](#)]
19. Yelina, N.E.; Lambing, C.; Hardcastle, T.J.; Zhao, X.; Santos, B.; Henderson, I.R. DNA Methylation Epigenetically Silences Crossover Hot Spots and Controls Chromosomal Domains of Meiotic Recombination in Arabidopsis. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 2183–2202. [[CrossRef](#)]
20. Underwood, C.J.; Choi, K.; Lambing, C.; Zhao, X.; Serra, H.; Borges, F.; Simorowski, J.; Ernst, E.; Jacob, Y.; Henderson, I.R.; et al. Epigenetic Activation of Meiotic Recombination near *Arabidopsis Thaliana* Centromeres via Loss of H3K9me2 and Non-CG DNA Methylation. *Genome Res.* **2018**, *28*, 519–531. [[CrossRef](#)]
21. Rowan, B.A.; Heavens, D.; Feuerborn, T.R.; Tock, A.J.; Henderson, I.R.; Weigel, D. An Ultra High-Density Arabidopsis Thaliana Crossover Map That Refines the Influences of Structural Variation and Epigenetic Features. *Genetics* **2019**, *213*, 771–787. [[CrossRef](#)]
22. Smukowski, C.S.; Noor, M.A.F. Recombination Rate Variation in Closely Related Species. *Heredity* **2011**, *107*. [[CrossRef](#)]
23. Haenel, Q.; Laurentino, T.G.; Roesti, M.; Berner, D. Meta-Analysis of Chromosome-Scale Crossover Rate Variation in Eukaryotes and Its Significance to Evolutionary Genomics. *Mol. Ecol.* **2018**, *27*, 2477–2497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nei, M. Modification of Linkage Intensity by Natural Selection. *Genetics* **1967**, *57*, 625–641. [[CrossRef](#)]
25. Feldman, M.; Liu, B.; Segal, G.; Abbo, S.; Levy, A.A.; Vega, J.M. Rapid Elimination of Low-Copy DNA Sequences in Polyploid Wheat: A Possible Mechanism for Differentiation of Homoeologous Chromosomes. *Genetics* **1997**, *147*, 1381–1387. [[CrossRef](#)]
26. Coop, G.; Przeworski, M. An Evolutionary View of Human Recombination. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Blary, A.; Jenczewski, E. Manipulation of Crossover Frequency and Distribution for Plant Breeding. *Theor. Appl. Genet.* **2019**, *132*, 575–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bomblies, K.; Higgins, J.D.; Yant, L. Meiosis Evolves: Adaptation to External and Internal Environments. *New Phytol.* **2015**, *208*, 306–323. [[CrossRef](#)]
29. Drouaud, J.; Camilleri, C.; Bourguignon, P.-Y.; Canaguier, A.; Bérard, A.; Vezon, D.; Giancola, S.; Brunel, D.; Colot, V.; Prum, B.; et al. Variation in Crossing-over Rates across Chromosome 4 of Arabidopsis Thaliana Reveals the Presence of Meiotic Recombination “Hot Spots”. *Genome Res.* **2006**, *16*, 106–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Giraut, L.; Falque, M.; Drouaud, J.; Pereira, L.; Martin, O.C.; Mézard, C. Genome-Wide Crossover Distribution in Arabidopsis Thaliana Meiosis Reveals Sex-Specific Patterns along Chromosomes. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002354. [[CrossRef](#)]
31. Bauer, E.; Falque, M.; Walter, H.; Bauland, C.; Camisan, C.; Campo, L.; Meyer, N.; Ranc, N.; Rincant, R.; Schipprack, W.; et al. Intraspecific Variation of Recombination Rate in Maize. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ziolkowski, P.A.; Underwood, C.J.; Lambing, C.; Martinez-Garcia, M.; Lawrence, E.J.; Ziolkowska, L.; Griffin, C.; Choi, K.; Franklin, F.C.H.; Martienssen, R.A.; et al. Natural Variation and Dosage of the HEI10 Meiotic E3 Ligase Control Arabidopsis Crossover Recombination. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 306–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lawrence, E.J.; Gao, H.; Tock, A.J.; Lambing, C.; Blackwell, A.R.; Feng, X.; Henderson, I.R. Natural Variation in TBP-Associated Factor 4b Controls Meiotic Crossover and Germline Transcription in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **2019**, *29*, 2676–2686.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pelé, A.; Rousseau-Gueutin, M.; Chèvre, A.-M. Speciation Success of Polyploid Plants Closely Relates to the Regulation of Meiotic Recombination. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Leflon, M.; Grandont, L.; Eber, F.; Huteau, V.; Coriton, O.; Chelysheva, L.; Jenczewski, E.; Chèvre, A.-M. Crossovers Get a Boost in Brassica Allotriploid and Allotetraploid Hybrids. *Plant Cell* **2010**, *22*, 2253–2264. [[CrossRef](#)]
36. Pelé, A.; Falque, M.; Trotoux, G.; Eber, F.; Nègre, S.; Gilet, M.; Huteau, V.; Lodé, M.; Jousseau, T.; Dechaumet, S.; et al. Amplifying Recombination Genome-Wide and Reshaping Crossover Landscapes in Brassicas. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Leflon, M.; Eber, F.; Letanneur, J.C.; Chelysheva, L.; Coriton, O.; Huteau, V.; Ryder, C.D.; Barker, G.; Jenczewski, E.; Chèvre, A.M. Pairing and Recombination at Meiosis of *Brassica Rapa* (AA) × *Brassica Napus* (AACC) Hybrids. *Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **2006**, *113*, 1467–1480. [[CrossRef](#)]
38. Snowdon, R.J.; Abbadì, A.; Kox, T.; Schmutzer, T.; Leckband, G. Heterotic Haplotype Capture: Precision Breeding for Hybrid Performance. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20*, 410–413. [[CrossRef](#)]
39. Tourrette, E.; Bernardo, R.; Falque, M.; Martin, O.C. Assessing by Modeling the Consequences of Increased Recombination in Recurrent Selection of *Oryza Sativa* and *Brassica Rapa*. *G3 Genes Genomes Genet.* **2019**, *9*, 4169–4181. [[CrossRef](#)]
40. Tourrette, E.; Falque, M.; Martin, O.C. Enhancing Backcross Programs through Increased Recombination. *Genet. Sel. Evol.* **2021**, *53*, 25. [[CrossRef](#)]
41. Kumar, V.; Paillard, S.; Fopa-Fomeju, B.; Falentin, C.; Deniot, G.; Baron, C.; Vallée, P.; Manzaneres-Dauleux, M.J.; Delourme, R. Multi-Year Linkage and Association Mapping Confirm the High Number of Genomic Regions Involved in Oilseed Rape Quantitative Resistance to Blackleg. *Theor. Appl. Genet.* **2018**, *131*, 1627–1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pelé, A.; Trotoux, G.; Eber, F.; Lodé, M.; Gilet, M.; Deniot, G.; Falentin, C.; Nègre, S.; Morice, J.; Rousseau-Gueutin, M.; et al. The Poor Lonesome A Subgenome of *Brassica Napus* Var. Darmor (AACC) May Not Survive without Its Mate. *New Phytol.* **2017**, *213*, 1886–1897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Szadkowski, E.; Eber, F.; Huteau, V.; Lodé, M.; Huneau, C.; Belcram, H.; Coriton, O.; Manzaneres-Dauleux, M.J.; Delourme, R.; King, G.J.; et al. The First Meiosis of Resynthesized *Brassica Napus*, a Genome Blender. *New Phytol.* **2010**, *186*, 102–112. [[CrossRef](#)]
44. Howell, E.C.; Barker, G.C.; Jones, G.H.; Kearsey, M.J.; King, G.J.; Kop, E.P.; Ryder, C.D.; Teakle, G.R.; Vicente, J.G.; Armstrong, S.J. Integration of the Cytogenetic and Genetic Linkage Maps of *Brassica Oleracea*. *Genetics* **2002**, *161*, 1225–1234. [[CrossRef](#)]
45. Wang, J.; Wu, J.; Liu, S.; Bai, Y.; Mun, J.-H.; Bancroft, I.; Cheng, F.; Huang, S.; Li, X.; Hua, W.; et al. The Genome of the Mesopolyploid Crop Species *Brassica Rapa*. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 1035–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rousseau-Gueutin, M.; Belser, C.; Da Silva, C.; Richard, G.; Istace, B.; Cruaud, C.; Falentin, C.; Boideau, F.; Boutte, J.; Delourme, R.; et al. Long-Read Assembly of the *Brassica Napus* Reference Genome Darmor-Bzh. *GigaScience* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
48. De Givry, S.; Bouchez, M.; Chabrier, P.; Milan, D.; Schiex, T. Carhta Gene: Multipopulation Integrated Genetic and Radiation Hybrid Mapping. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1703–1704. [[CrossRef](#)]
49. Kosambi, D.D. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Ann. Eugen.* **1943**, *12*, 172–175. [[CrossRef](#)]
50. Lim, K.-B.; de Jong, H.; Yang, T.-J.; Park, J.-Y.; Kwon, S.-J.; Kim, J.S.; Lim, M.-H.; Kim, J.A.; Jin, M.; Jin, Y.-M.; et al. Characterization of RDNAs and Tandem Repeats in the Heterochromatin of *Brassica Rapa*. *Mol. Cells* **2005**, *19*, 436–444.
51. Lim, K.-B.; Yang, T.-J.; Hwang, Y.-J.; Kim, J.S.; Park, J.-Y.; Kwon, S.-J.; Kim, J.; Choi, B.-S.; Lim, M.-H.; Jin, M.; et al. Characterization of the Centromere and Peri-Centromere Retrotransposons in *Brassica Rapa* and Their Distribution in Related *Brassica* Species. *Plant J.* **2007**, *49*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yelina, N.E.; Choi, K.; Chelysheva, L.; Macaulay, M.; de Snoo, B.; Wijnker, E.; Miller, N.; Drouaud, J.; Grelon, M.; Copenhaver, G.P.; et al. Epigenetic Remodeling of Meiotic Crossover Frequency in *Arabidopsis Thaliana* DNA Methyltransferase Mutants. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002844. [[CrossRef](#)]
53. Mason, A.S.; Rousseau-Gueutin, M.; Morice, J.; Bayer, P.E.; Besharat, N.; Cousin, A.; Pradhan, A.; Parkin, I.A.P.; Chevre, A.-M.; Batley, J.; et al. Centromere Locations in *Brassica A* and *C* Genomes Revealed Through Half-Tetrad Analysis. *Genetics* **2016**, *202*, 513–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Xiong, Z.; Pires, J.C. Karyotype and Identification of All Homoeologous Chromosomes of Allopolyploid *Brassica Napus* and Its Diploid Progenitors. *Genetics* **2011**, *187*. [[CrossRef](#)]
55. Song, K.; Lu, P.; Tang, K.; Osborn, T.C. Rapid Genome Change in Synthetic Polyploids of *Brassica* and Its Implications for Polyploid Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7719–7723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Gaeta, R.T.; Pires, J.C.; Iniguez-Luy, F.; Leon, E.; Osborn, T.C. Genomic Changes in Resynthesized *Brassica Napus* and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *Plant Cell* **2007**, *19*. [[CrossRef](#)]
57. Xiong, Z.; Gaeta, R.T.; Pires, J.C. Homoeologous Shuffling and Chromosome Compensation Maintain Genome Balance in Resynthesized Allopolyploid *Brassica Napus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7908–7913. [[CrossRef](#)]
58. Xiong, Z.; Gaeta, R.T.; Edger, P.P.; Cao, Y.; Zhao, K.; Zhang, S.; Pires, J.C. Chromosome Inheritance and Meiotic Stability in Allopolyploid *Brassica Napus*. *G3 Genes Genomes Genet.* **2021**, *11*. [[CrossRef](#)]
59. Rousseau-Gueutin, M.; Morice, J.; Coriton, O.; Huteau, V.; Trotoux, G.; Nègre, S.; Falentin, C.; Deniot, G.; Gilet, M.; Eber, F.; et al. The Impact of Open Pollination on the Structural Evolutionary Dynamics, Meiotic Behavior, and Fertility of Resynthesized Allotetraploid *Brassica Napus* L. *G3 Genes Genomes Genet.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
60. Ferreira De Carvalho, J.; Stoeckel, S.; Eber, F.; Lodé-Taburel, M.; Gilet, M.-M.; Trotoux, G.; Morice, J.; Falentin, C.; Chèvre, A.-M.; Rousseau-Gueutin, M. Untangling Structural Factors Driving Genome Stabilization in Nascent *Brassica Napus* Allopolyploids. *New Phytol.* **2021**, *230*, 2072–2084. [[CrossRef](#)]
61. Mason, A.S.; Snowdon, R.J. Oilseed Rape: Learning about Ancient and Recent Polyploid Evolution from a Recent Crop Species. *Plant Biol.* **2016**, *18*, 883–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kittipol, V.; He, Z.; Wang, L.; Doheny-Adams, T.; Langer, S.; Bancroft, I. Genetic Architecture of Glucosinolate Variation in *Brassica Napus*. *J. Plant Physiol.* **2019**, *240*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Pires, J.C.; Zhao, J.; Schranz, M.E.; Leon, E.J.; Quijada, P.A.; Lukens, L.N.; Osborn, T.C. Flowering Time Divergence and Genomic Rearrangements in Resynthesized *Brassica* Polyploids (*Brassicaceae*). *Biol. J. Linn. Soc.* **2004**, *82*, 675–688. [[CrossRef](#)]
64. Zhao, J.; Udall, J.A.; Quijada, P.A.; Grau, C.R.; Meng, J.; Osborn, T.C. Quantitative Trait Loci for Resistance to *Sclerotinia Sclerotiorum* and Its Association with a Homeologous Non-Reciprocal Transposition in *Brassica Napus* L. *Theor. Appl. Genet.* **2006**, *112*, 509–516. [[CrossRef](#)]
65. Stein, A.; Coriton, O.; Rousseau-Gueutin, M.; Samans, B.; Schiessl, S.V.; Obermeier, C.; Parkin, I.A.P.; Chèvre, A.-M.; Snowdon, R.J. Mapping of Homoeologous Chromosome Exchanges Influencing Quantitative Trait Variation in *Brassica Napus*. *Plant Biotechnol. J.* **2017**, *15*, 1478–1489. [[CrossRef](#)]
66. Diederichsen, E.; Sacristan, M.D. Disease Response of Resynthesized *Brassica Napus* L. Lines Carrying Different Combinations of Resistance to *Plasmodiophora Brassicae* Wor. *Plant Breed.* **1996**, *115*, 5–10. [[CrossRef](#)]
67. Diederichsen, E.; Beckmann, J.; Schondelmeier, J.; Dreyer, F. Genetics of Clubroot Resistance in *Brassica Napus* “Mendel”. *Acta Hort.* **2006**, *706*, 307–311. [[CrossRef](#)]
68. Qian, W.; Chen, X.; Fu, D.; Zou, J.; Meng, J. Intersubgenomic Heterosis in Seed Yield Potential Observed in a New Type of *Brassica Napus* Introgressed with Partial *Brassica Rapa* Genome. *Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **2005**, *110*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Attri, R.; Rahman, H. Introgression of Allelic Diversity from Genetically Distinct Variants of *Brassica Rapa* into *Brassica Napus* Canola and Inheritance of the *B. Rapa* Alleles. *Crop Pasture Sci.* **2017**, *69*, 94–106. [[CrossRef](#)]
70. Pan, Q.; Zhu, B.; Zhang, D.; Tong, C.; Ge, X.; Liu, S.; Li, Z. Gene Expression Changes During the Allo-/Deallopolyploidization Process of *Brassica Napus*. *Front. Genet.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Zou, J.; Mao, L.; Qiu, J.; Wang, M.; Jia, L.; Wu, D.; He, Z.; Chen, M.; Shen, Y.; Shen, E.; et al. Genome-Wide Selection Footprints and Deleterious Variations in Young Asian Allotetraploid Rapeseed. *Plant Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1998–2010. [[CrossRef](#)]
72. Liu, Y.; Xu, A.; Liang, F.; Yao, X.; Wang, Y.; Liu, X.; Zhang, Y.; Dalelhan, J.; Zhang, B.; Qin, M.; et al. Screening of Clubroot-Resistant Varieties and Transfer of Clubroot Resistance Genes to *Brassica Napus* Using Distant Hybridization. *Breed. Sci.* **2018**, *68*, 258–267. [[CrossRef](#)]
73. Balesdent, M.; Fudal, I.; Ollivier, B.; Bally, P.; Grandaubert, J.; Eber, F.; Chèvre, A.; Leflon, M.; Rouxel, T. The Dispensable Chromosome of *Leptosphaeria Maculans* Shelters an Effector Gene Conferring Avirulence towards *Brassica Rapa*. *New Phytol.* **2013**, *198*, 887–898. [[CrossRef](#)]
74. Delourme, R.; Laperche, A.; Bouchet, A.-S.; Jubault, M.; Paillard, S.; Manzaneres-Dauleux, M.-J.; Nesi, N. Genes and quantitative trait loci mapping for major agronomic traits in *Brassica napus* L. In *The Brassica napus Genome*; Liu, S., Snowdon, R., Chalhou, B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 41–85, ISBN 978-3-319-43692-0.
75. Song, J.-M.; Guan, Z.; Hu, J.; Guo, C.; Yang, Z.; Wang, S.; Liu, D.; Wang, B.; Lu, S.; Zhou, R.; et al. Eight High-Quality Genomes Reveal Pan-Genome Architecture and Ecotype Differentiation of *Brassica Napus*. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 34–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Downey, R.K.; Klassen, A.J.; Stringam, G.R. Rapeseed and mustard. In *Hybridization of Crop Plants*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 1980; pp. 495–509, ISBN 978-0-89118-566-6.
77. Nikzad, A.; Kebede, B.; Pinzon, J.; Bhavikkumar, J.; Wang, X.; Yang, R.-C.; Rahman, H. Potential of the C Genome of the Different Variants of *Brassica Oleracea* for Heterosis in Spring B. *Napus* Canola. *Front. Plant Sci.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Chiang, M.S.; Chiang, B.Y.; Grant, W.F. Transfer of Resistance to Race 2 of *Plasmodiophora Brassicae* from *Brassica Napus* to Cabbage (*B. Oleracea* Var. *Capitata*). I. Interspecific Hybridization between *B. Napus* and *B. Oleracea* Var. *Capitata*. *Euphytica* **1977**, *26*, 319–336. [[CrossRef](#)]
79. Yu, H.; Li, Z.; Ren, W.; Han, F.; Yang, L.; Zhuang, M.; Lv, H.; Liu, Y.; Fang, Z.; Zhang, Y. Creation of Fertility-Restored Materials for Ogura CMS in *Brassica Oleracea* by Introducing Rfo Gene from *Brassica Napus* via an Allotriploid Strategy. *Theor. Appl. Genet.* **2020**, *133*, 2825–2837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Nagaharu, U. Genome Analysis in *Brassica* with Special Reference to the Experimental Formation of *B. Napus* and Peculiar Mode of Fertilization. *Jpn. J. Bot.* **1935**, *7*, 389–452.





### III. Conclusion

Ces résultats ont permis de montrer que la modification du profil de recombinaison observée chez un allotriploïde AAC est bien spécifique à son niveau de ploïdie intermédiaire et que des hybrides F1 euploïdes (diploïde AA ou allotétraploïde AACC) présentent un profil de recombinaison similaire et classique, avec l'absence de recombinaison dans les régions proches des centromères.

L'augmentation de la fréquence de recombinaison observée chez un hybride allotriploïde AAC permet de réduire la taille des introgressions issues de *B. rapa* dans le fond génétique *B. napus* de manière plus efficace que la voie allotétraploïde AACC. En effet, les régions introgressées sont plus nombreuses et plus petites, bien que la même proportion du génome (50%) soit transmise dans la descendance lors du premier backcross.

En utilisant comme exemple un QTL présent sur le chromosome A01 du colza présent dans une région centromérique et qui confère une résistance au pathogène fongique *Leptosphaeria maculans*, nous avons démontré que la voie allotriploïde AAC est intéressante aussi bien du point de vue agronomique que du point de vue de la recherche fondamentale.

Du point de vue agronomique, la voie allotriploïde permet ici de réduire efficacement la taille d'un QTL de résistance à une maladie, résultat qu'il est impossible d'obtenir en restant dans des structures tétraploïdes qui ne présentent pas de recombinaison dans la région concernée. En effet, l'augmentation de la fréquence de recombinaison des allotriploïdes AAC permet de réduire la taille des introgressions et de modifier le déséquilibre de liaison. Cela permettrait donc d'accélérer les programmes de sélection variétale, en facilitant l'introgression de caractères d'intérêt agronomique dans des variétés élites tout en minimisant les problèmes liés à l'introgression simultanée de caractères délétères qui peuvent être liés génétiquement aux caractères que l'on souhaite introgresser.

Du point de vue de la recherche fondamentale, la capacité de ségréger des portions de QTL dans une descendance permettrait d'avoir plus facilement accès aux gènes responsables d'un phénotype, ou du moins de réduire plus efficacement la liste de gènes candidats. Par ailleurs, le modèle allotriploïde AAC est très intéressant pour l'étude des mécanismes régulant le profil de recombinaison, ces hybrides possédant un profil de recombinaison unique.



L'étude fine des mécanismes et gènes impliqués dans ces modifications apportera de nouvelles connaissances sur la régulation de la recombinaison méiotique, un processus partagé par les eucaryotes sexués qui permet le brassage de la diversité génétique à chaque génération.

Comme la structure AAC est responsable de ce profil de recombinaison unique en son genre, il serait intéressant de déterminer si le maintien de cette structure est capable de maintenir ces modifications des règles de la recombinaison lors des générations successives.



**Chapitre III : Impact du niveau de ploïdie  
et de l'hétérozygotie partielle sur le profil  
de recombinaison chez les *Brassica*.**



### Chapitre III : Impact du niveau de ploïdie et de l'hétérozygotie partielle sur le profil de recombinaison chez les *Brassica*.

#### **I. Introduction**

Dans le chapitre précédent, nous avons pu déterminer que les modifications des règles de la recombinaison observée chez les hybrides allotriploïdes AAC était liée uniquement à leur structure génomique particulière, leur niveau de ploïdie intermédiaire AAC.

Chez les hybrides allotriploïdes AAC, les chromosomes C restent sous forme d'univalents en métaphase I et ségrégent de manière aléatoire dans la descendance. Ainsi, en réalisant un croisement entre un allotriploïde AAC et un colza (AACC), il est possible d'obtenir à faible fréquence (~5%), des hybrides ayant une structure AAC ou une structure AACC de type colza. Ainsi, si la structure AAC est bien responsable des modifications des règles de recombinaison, le maintien d'une structure AAC en seconde génération devrait permettre de conserver cette dérégulation, tandis que le retour à une structure allotétraploïde AACC devrait permettre un retour à des régulations de la recombinaison équivalentes à celles observées chez un colza.

Nous avons ainsi généré ce matériel original en rétro-croisant l'hybride AAC par son parent colza et étudié le profil de recombinaison dans les régions hétérozygotes par cartographie génétique. Afin de déterminer la fréquence de recombinaison à l'échelle globale du génome, nous avons complété ces résultats de cartographie génétique par l'immunomarquage de la protéine HEI10 sur des cellules mères du pollen. Enfin, nous avons testé si la présence d'une ou deux régions homozygotes encadrant une région hétérozygote étudiée avait un impact sur la fréquence de recombinaison.

#### **II. Modifying on demand the homologous recombination landscape in *Brassica* by switching between allotriploidy and allotetraploidy.**





Manuscript in preparation

Title: Modifying on demand the homologous recombination landscape in *Brassica* by switching between allotriploidy and allotetraploidy.

Authors: Franz Boideau, Loeiz Maillet, Anael Brunet, Virginie Huteau, Gwenn Trotoux, Maryse Lodé-Taburel, Gwenaëlle Deniot, Frédérique Eber, Marie Gilet, Julien Boutte, Jérôme Morice, Cyril Falentin, Olivier Coriton, Anne-Marie Chèvre\*, Mathieu Rousseau-Gueutin\*

\*: corresponding authors

### **Abstract**

Meiotic recombination is a key process allowing the correct segregation of chromosomes during meiosis, and the reshuffling of genetic diversity at each generation. It is highly regulated in frequency, with one obligate crossover (CO) and rarely more than three per chromosomes, and also in distribution as most COs are localized near the telomere. Interestingly, the allotriploid AAC *Brassica* hybrids do not follow these rules, as they present 3.7 times more COs than AACC hybrid, and they also have the peculiarity to present COs in the normally cold pericentromeric regions. To determine if this phenotype may be transient or permanent, we determined the recombination profile of several hybrids in three backcrossed progenies and studied AAC and AACC B1F1 hybrids. Using a combination of genetic maps and HEI10 immunostaining, we showed that, at the following backcross generation, these modified recombination rules can be maintained in AAC hybrids or reversed back to normal in AACC hybrids. These surprising results reveal that the boost of recombination is directly linked to the AAC allotriploid level and can be transient by recovering a AACC genomic structure. A slight increase of COs was also observed in all B1F1 hybrids and was associated to an increase of HEI10 foci. We could infer that this increased recombination in the B1F1 hybrids is linked to the juxtaposition of heterozygous and homozygous regions along the chromosomes. The ability to maintain or revert this unique recombination phenotype pave new ways to enhance the narrow genetic diversity of the major *B. napus* crop, and also provides new insights into the ability to deeply modifying the strict control of meiotic recombination in polyploid species.

### **Introduction**

Meiotic recombination is a key process ensuring the perfect segregation of chromosomes during the first part of meiosis. It generates a novel genetic diversity at each generation by reshuffling parental alleles, thus creating new allelic combinations in the progenies of sexually reproducing eukaryotes. This process is initiated by Double-Strand Breaks (DSBs), which are mostly repaired as noncrossovers (NCO) and a few as crossovers (COs). For example, among the ~250 DSBs occurring at each meiosis in *Arabidopsis*, only ~ 10 will form COs (Mercier et al. 2015). These COs belong to two classes depending on the meiotic proteins involved. The class I is highly conserved and controlled by the ZMM group proteins (Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Msh4, Msh5 and Mer3, MutLγ complex with MLH1/MLH3). Most of COs (70-85%) belong to this class I and are interference sensitive, preventing the formation of a nearby additional class I CO. The Class II depends on the MUS81 pathway and only forms 15 to 30% of total COs. The Class II COs are interference insensitive, being randomly distributed. In all cases, the formation



of COs is highly regulated, with one obligate crossover (CO) per pair of homologous chromosomes and rarely more than three whatever the length of the chromosome (Mercier et al. 2015). Additionally, the distribution of COs along the length of the chromosome is not random with a species-specific pattern, with a U distribution between centromere and telomere for example in *Arabidopsis thaliana* or a gradual increase of CO formation from the centromere to the telomere in several species such as wheat, maize, barley (Wang and Copenhagen 2018 for review). Similar results are reported in oilseed rape with centromeric and pericentromeric regions that are deprived of COs (Boideau et al. 2021).

It has been demonstrated that this strict meiotic control can be affected by different trans-acting factors. The CO frequency can be increased by knocking out (KO) anti-crossover genes, such as XRCC2 (Serra et al. 2013), FANCM (Crismani et al. 2012), FIGL1 (Girard et al. 2015) and its partner protein FLIP (Fernandes et al. 2018,) or RecQ4 (Séguéla-Arnaud et al. 2015). Another strategy is to modify allele or gene dosage of pro-COs genes, such as HEI10 (Ziolkowski et al. 2017, Serra et al. 2018), as demonstrated in *Arabidopsis*. In some cases, mutants with an increased dosage of a pro-COs gene (Hei10) and the concomitant KO of anti-COs genes (RECQ4A ad RECQ4B) were performed (Serra et al. 2018). In tomato, pea and rice, an increase of CO frequency was also observed by knocking out RecQ4 and FANCM (Mieulet et al. 2018, Maagd et al. 2020). The CO distribution can also be modified by the KO of ZYP1, which is the central element of the synaptonemal complex and that seems to be a key component of interference (Capilla-Pérez et al. 2021). As CO formation is dependent on chromatin structure and DNA methylation, the KO of genes impacting DNA methylation such as MET1, DDM1 or CMT3 (Yelina, 2012 & 2015, Melamed-Bessudo and Levy 2012, Underwood et al. 2018) can also modify the COs distribution.

In addition to the effect of trans-acting factors, a cis interaction caused by heterozygosity was shown to impact the recombination landscape in *Arabidopsis thaliana*. A CO increase was observed in heterozygous regions when juxtaposed with homozygous regions without affecting the total number of COs (Ziolkowski et al. 2015). This positive correlation between DNA polymorphism and class I COs, which is true until a threshold, was shown to be under the control of MSH2 (Blackwell et al. 2020). However, this relation was not detected at the megabase scale (Lian et al. 2022). Another cis effect is the presence of structural variations, which can prevent recombination at the heterozygous stage when parental lines differ (Rowan et al. 2019), as seen for inverted regions (Alonso-Blanco *et al.*, 2016; Fransz *et al.*, 2016; Jayakodi et al. 2020; Schmidt *et al.*, 2020; Boideau et al. 2022). Additionally, highly methylated genomic regions on chromosome arms were deprived of recombination (Dooner and He, 2008; Boideau et al. 2022).

A third factor affecting recombination corresponds to the genome structure or ploidy levels. In fact, in case of polyploid species formed by either several copies of the same genome (autopolyploids) or by the presence of different related genomes at the diploid stage (allopolyploidy), it has been shown that the ploidy level may affect the frequency of recombination. A genome at the tetraploid level was shown to present twice more homologous recombination compared to a diploid. Examples of this relation between ploidy level and recombination rate were reported in different models, such as cotton (Brubaker et al. 1999, Desai et al. 2006), *Arabidopsis* (Pecinka et al. 2011) or *Brassicoraphanus* (Park et al. 2020). Similarly, from diploid to allohexaploid level in wheat, Wan et al. (2021) observed a CO increase of 2.3-fold. Additionally, previous studies reported that the presence of univalents induce a compensatory increase of crossovers within bivalents of the same nucleus, as observed in *Hypochoeris radiata* (Parker 1975) or *Crepis capillaris* (Tease and Jones 1976).

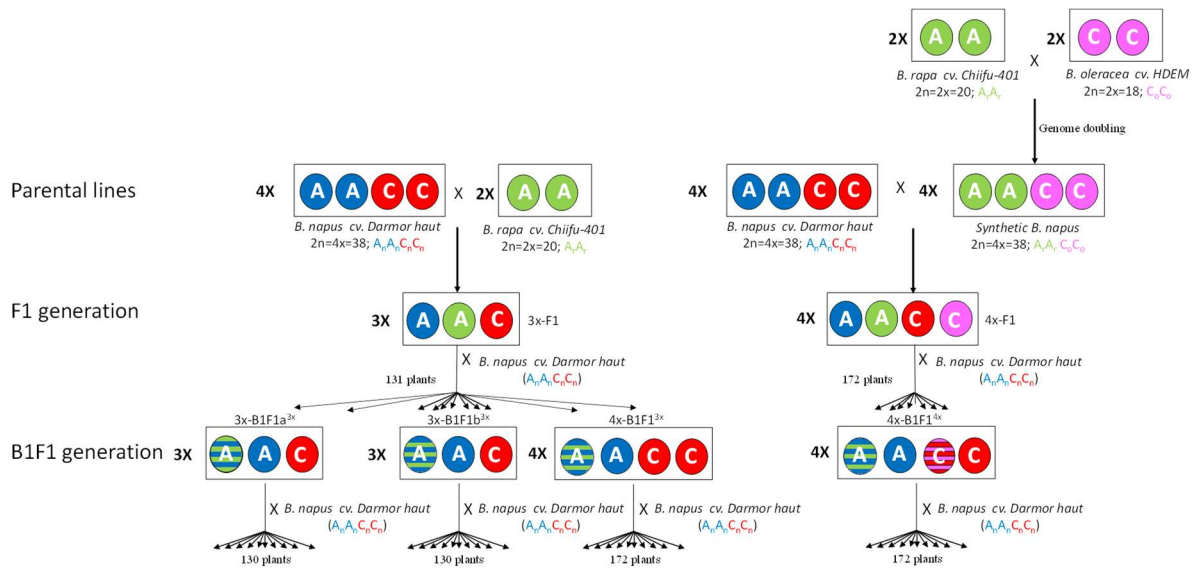


Figure 1: Schematic representation of the production of the F1 and B1F1 hybrids and their progenies.

The *Brassica* genus is composed of both diploid and recent allotetraploid species that can be crossed, enabling the study of the genome structure (ploidy level) on homologous recombination. It was notably observed in an AAC allotriploid hybrids produced by crosses between oilseed rape (*Brassica napus*, AACC,  $2n=4x=38$ ) and one of its progenitor, *B. rapa* (AA,  $2n=2x=20$ ). In this AAC hybrid ( $2n=3x=29$ ), ten bivalents are formed between A chromosomes whereas the nine C chromosomes remain unpaired as univalents during meiosis and segregate randomly within gametes (Leflon et al. 2006). The homologous recombination profile on A chromosomes in these AAC hybrids was compared to those obtained from AA and AACC hybrids presenting the exact same A genotypes. It revealed an increase rate of 3.5 for COs only in AAC hybrids (Leflon et al. 2010; Pelé et al. 2017, Boideau et al. 2021), whereas AA and AACC hybrids harbored the same recombination frequency (Boideau et al. 2021). More surprisingly, the distribution of COs along the chromosomes is affected only in AAC hybrids, with CO formation in pericentromeric regions totally deprived of recombination in AA and AACC hybrids (Pelé et al. 2017; Boideau et al. 2021). Heterochiasmy was also observed with more COs formed through female than male meiosis of AAC hybrids, but with a similar modification of CO distribution and decrease of interference (Pelé et al. 2017). MLH1 immunostaining performed on pollen mother cells of the hybrid revealed that the CO increase is due to class I COs (Leflon et al. 2010; Pelé et al. 2017), at least for the male meiosis.

In the present paper, we aimed at increasing our understanding of this modification of the recombination landscape observed in AAC hybrids by answering the following questions: may the meiotic deregulation observed in allotriploid remains for several generations by maintaining the allotriploid AAC structure? Reciprocally, can we restore a normal meiotic control by recovering an allotetraploid genome structure (AACC) in the progeny? How does heterozygosity impact the recombination landscape in the different hybrid genome structure? To answer these questions, we took advantage of the *de novo* genome assembly for *B. napus*, cv. Darmor (Rousseau-Gueutin et al. 2020), for *B. rapa* cv. Chiifu (Zhang et al. 2018) and for *B. oleracea* cv. HDEM (Belser et al. 2018), and used these varieties to produce hybrids with exactly the same A sequences but at different ploidy levels (AAC or AACC). Thereafter, we recovered either allotriploid or allotetraploid individuals within the progeny of the allotriploid hybrid to decipher if the modified recombination landscape may be maintained or reverted back to normal in the following generation. To that purpose, we produced several genetic maps using the same anchored SNPs for the different hybrids, allowing to compare their recombination landscape. These comparative analyses of CO frequency between hybrids were completed and validated by performing HEI10 immunostaining, which is specific to class I COs. We showed that (1) the modified recombination landscape may be maintained by successive generations of allotriploid individuals, (2) the recombination rate is even more increased in AAC hybrid at the second generation compared to the AAC mother plant, (3) a normal meiotic control is recovered in an allotetraploid progeny of the AAC mother plant, (4) the recombination rate is increased in heterozygous regions surrounded by homozygous regions in both AAC or AACC hybrids.

## **Material and Methods**

### **- Plant material**

The plant material analyzed in this study is described in Figure 1. To distinguish the different genomes, we used as nomenclature  $A_r$  and  $A_n$  for A genome of *B. rapa* and *B. napus*, respectively, whereas we used  $C_o$  and  $C_n$  for C genome of *B. oleracea* and *B. napus*, respectively. The R as index indicates that recombination occurred on the genome concerned. To produce an allotriploid AAC and allotetraploid AACC hybrids presenting a genetically identical A genome sequence, enabling an unbiased comparison of their recombination profile, the following strategy was used. More precisely, the allotetraploid hybrid (thereafter referred



as 4x-F1) was produced by firstly creating a resynthesized oilseed rape, obtained by crossing the pure inbred line *B. rapa* cv. Chiifu ( $A_rA_r$ ,  $2n = 2x = 20$ ) with the doubled haploid *B. oleracea* cv. HDEM ( $C_oC_o$ ,  $2n = 2x = 18$ ; used as male) and then by performing embryo rescue on the obtained amphihaploid ( $A_rC_o$ ,  $2n = 19$ ) as described in Jahier et al. 1992. This hybrid spontaneously doubled its genomes and gave rise to the resynthesized allotetraploid  $A_rA_rC_oC_o$  ( $2n = 4x = 38$ ), hereafter referred as ChEM. This latter plant was crossed with *B. napus* cv. Darmor as female, and the  $A_nA_rC_nC_o$  F1 hybrid gave rise to 172 B1F1 plants after backcrossing with recurrent parent *B. napus* cv. Darmor as male (Boideau et al. 2021). One of these B1F1 plants with ~50% of A and C genome at the heterozygous stage was kept ( $A_RA_nC_RC_n$ ,  $2n = 4x = 38$ , referred as 4x-B1F1<sup>4x</sup>) to produce a B2F1 segregating population (172 plants) by backcrossing it with *B. napus* cv. Darmor as male.

For the allotriploid pathway, an allotriploid F1 hybrid ( $A_nA_rC_n$ ,  $2n = 3x = 29$ , referred as 3x-F1) was obtained by crossing the allotetraploid *B. napus* cv. Darmor  $A_nA_nC_nC_n$  ( $2n = 4x = 38$ ) and *B. rapa* cv. Chiifu ( $A_rA_r$ ,  $2n = 2x = 20$ ) as male. For the production of its B1F1 progeny, the hybrid was crossed with *B. napus* cv. Darmor as male. We selected 131 plants (randomly selected among 234) to generate the mapping population of the 3x-F1 hybrid (Boideau et al. 2021). Within this latter B1F1 population, we selected two AAC allotriploid hybrid ( $A_RA_nC_n$ ,  $2n = 3x = 29$  and hereafter referred as 3x-B1F1a<sup>3x</sup> and 3x-B1F1b<sup>3x</sup>) and one allotetraploid hybrid progenies ( $A_RA_nC_nC_n$ ,  $2n = 4x = 38$ , referred as 4x-B1F1<sup>3x</sup>) based on their meiotic behavior and level of polymorphism. Then, these three hybrids were backcrossed using *B. napus* cv. Darmor as male, giving rise to three mapping populations of 130, 130 and 172 plants, respectively (Figure 1). All parental accessions were provided by the Biological Resource Center BrACySol (Ploudaniel, France).

#### - DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from lyophilized young leaves with the sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics, Teddington Middlesex, UK) on the oKtopure robot at the GENTYANE platform (INRAE, Clermont-Ferrand, France). Genotyping data were obtained using the *Brassica* 15K and 19K Illumina Infinium SNP array (SGS-TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Germany). To assess recombination within the pericentromeric region of A01 and A02 chromosome that contained a very low number of polymorph SNPs between our parental from these arrays, we developed an additional set of markers to specifically densifying these pericentromeric regions. To that purpose, we firstly took advantage of the presence of polymorphic markers between our parental lines using data from the Brassica 60K Illumina Infinium SNP array. This enabled to identify 48 polymorph markers that were absent from the 15K and 19K Brassica Illumina Infinium arrays (Clarke et al. 2016) and for which we developed KASPar markers using their context sequences. We also designed 39 additional KASPar markers closer to the A01 and A02 centromeres by taking advantage of the whole genome assembly of the parental lines (Rousseau-Gueutin et al. 2020, Zhang et al. 2018). To design these new SNP within our intervals of interest, we firstly retrieved the genes present in single copy in each *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 subgenome (Rousseau-Gueutin et al. 2020), in *B. rapa* cv. Chiifu v3 (Zhang et al. 2018), preventing the putative design of markers amplifying on different paralogous regions. The orthologous copy of these genes in *B. oleracea* cv. HDEM were also retrieved using BlastP. For each these genes, we performed an alignment of the different copies (*B. rapa*, *B. napus* copy A and copy C, *B. oleracea*) and used an in-house python script to specifically detect polymorphism between the A chromosomes of *B. napus* cv. Darmor and *B. rapa* cv. Chiifu. Overall, genotyping data were obtained for this novel set of 87 SNP markers (specific to the A01 and A02 pericentromeric regions), and revealed by Biomark™ HD system (Fluidigm technology) and KASPar™ chemistry at the GENTYANE





platform (INRAE, Clermont-Ferrand, France). The raw genotyping data deriving from the Brassica Illumina Infinium arrays or from the KASPar technology were analyzed using either the GenomeStudio v.2011.1 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) or the Fluidigm SNP Genotyping Analysis v4.1.2 softwares (Wang et al. 2009). In both cases, the raw genotyping data were processed with the auto-clustering option and validated manually. The polymorphic SNPs between the parental genotypes (i.e., AA in *B. rapa* and BB in *B. napus*, or *vice versa*) were selected for the establishment of genetic maps. SNP showing more than 20% of missing data and plants showing more than 25% of missing data were removed for the downstream analyses. To prevent the overestimation of recombination in the low recombining pericentromeric regions, plants showing more than one COs in the pericentromeric region of A01 and A02 were removed. Finally, to determine the physical position of the different markers, the context sequences of each SNP marker were physically localized on the reference genome *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin et al. 2020) by using BLASTn (ver. 2.9.0, min. e-value  $1 \times 10^{-20}$ ) (Altschul et al. 1990) and by keeping the best blast hit obtained for a given subgenome (minimum percentage of alignment and identity of 80%).

#### - Genetic maps

The first genetic maps were established separately for each population using the CarthaGene software (v. 1.2.3, De Givry et al. 2005). Establishment of linkage groups and SNP ordering were examined using a logarithm of odds score (LOD) threshold of 4.0 and a maximum recombination frequency of 0.3, as described in Pelé et al. 2017. Potential double crossover supported by only one genetic marker and with a physical distance between these two events below 500 kb was corrected as missing data, as described in Rowan et al. 2019. After these few corrections, the final genetic maps were created using the Kosambi function to evaluate the genetic distances in centimorgans (cM) between linked SNP markers (Kosambi, 1943). Genotyping data used are available in Table S1. The genetic landscapes were illustrated using Circos (Krzywinski et al. 2009). The pericentromeric and centromeric borders were retrieved from Boideau et al. (2022) and were based on gene density and centromeric-specific repeats, respectively. Precisely, pericentromeric regions were defined as regions surrounding the centromere and characterized by a gene density below the chromosome average. Hereafter, the pericentromeric intervals refer to the interval between the pericentromeric borders, corresponding to both the centromeric and pericentromeric regions.

#### - Flow cytometry and cytogenetic studies

Chromosome numbers of the allotriploid progenies were assessed in leaves by flow cytometry as described in Leflon et al. 2006. Pollen viability was assessed from three independent flowers, using acetocarmine staining, as described in Jahier et al. (1992). For the establishment of meiotic behavior, samples of young floral buds were fixed in Carnoy's II solution (alcohol:chloroform:acetic acid, 6:3:1) for 24 h at room temperature and stored until use in 50% ethanol at 4 °C. Anthers were then squashed and stained with a drop of 1% acetocarmine solution. Chromosome pairing was assessed per plant from 20 pollen mother cells (PMCs) at metaphase I.

#### a) Meiotic proteins immunolocalization

The immunolabelling of HEI10 was carried out on meiotic chromosome spread prepared as described in Chelysheva et al, (2013) with minor modifications. Briefly, the chromosome preparations were incubated in Rnase A (100ng/μL) and pepsin (0.05%) in 10 mmol HCL, dehydrated in an ethanol series (70%, 90% and 100%) and air-dried. The anti-HEI10 antibody was used at a dilution of 1/100 in 1X PBS-T-BSA. The slides were incubated overnight at 4°C.



After three rinses in 1X PBS-T, slides were incubated for 1h at room temperature with a labeled secondary antibody (labeled goat anti-rabbit IgG Alexa fluor 488-Invitrogen (ref. A-11008, Invitrogen) diluted 1/200 in 1X PBS-T-BSA. After three rinses in 1X PBS-T, the slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories) containing 2.5µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence images were captured using an ORCA-Flash4 (Hamamatsu, Japan) on an Axioplan 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed using Zen PRO software (version 2, Carl Zeiss, Germany).

b) GISH-like at meiosis using a genome specific BAC clone

The BAC clone BoB014O06 from *B. oleracea* (Howell et al. 2002) was used as a probe for the C genome. This GISH-like BAC hybridized specifically to regions on every C-genome chromosome in *B. napus* (Książczyk et al, 2011). The BoB014O06 probe was labelled by random priming with biotin-14-dUTP (Invitrogen, Life Technologies). The hybridization mixture consisted of 50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSC, 1% SDS and labelled probes (200ng per slide), was denatured at 92°C for 6 min, and transferred to ice. The denatured probe was placed on the chromosome preparation and *in situ* hybridization was carried out overnight in a moist chamber at 37°C. After hybridization, slides were washed for 5 min in 50% formamide in 2X SSC at 42°C, followed by two washes in 4X SSC-Tween. Biotinylated probe was immunodetected by Texas Red avidin DCS (Vector Laboratories) and the signal was amplified with biotinylated anti-avidin D (Vector Laboratories). The chromosomes were mounted and counterstained in Vectashield (Vector Laboratories) containing 2.5µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence images were captured using an ORCA-Flash4 (Hamamatsu, Japan) on an Axioplan 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed using Zen PRO software (version 2, Carl Zeiss, Germany).

c) Analysis of the HEI10 immunostaining cells images

The number of HEI10 foci per cell was analyzed using an automated macro developed on Fiji (Schindelin et al. 2012) and available upon request. Cells showing more than ten times the average of the genotype were considered as aberrant data and removed from the analyses. The number of HEI10 foci per A chromosomes on a subset of the automatically analyzed cells was also counted manually by three independent persons after the GISH-like experiment allowing to distinguish the C and A chromosomes.

- Statistical analyses

Comparison of the crossover rates between progenies was assessed for every interval between consecutive SNP markers using a 2-by-2 chi-squared analysis considering a significance threshold of 5%. Additionally, these comparisons were also performed for a given heterozygous region, at the chromosome and at the genome scales using 2-by-2 chi-squared tests. For these tests, a conservative Bonferroni-corrected threshold of 5% was applied, using either the number of regions, the number of chromosome or the number of intervals between adjacent SNP markers per A chromosome, or for the whole A subgenome (as described in Pelé et al. 2017 and Boideau et al. 2021). Statistical differences for the number of HEI10 foci between the different hybrids were assessed using the Mann Whitney Wilcoxon statistical test and considering a significance threshold of 5%, with a conservative Bonferroni-corrected threshold of 5%. All statistical analyses were performed using RStudio (version 3.6.1, R Core Team, 2019) and all results are summarized in Table S2.

Table 1: Meiotic behavior, pollen fertility and seed set of the hybrids used in this study.

Number of chromosomes (2n)	Number of PMC	Meiotic behavior	Percentage of cells at the expected meiotic behavior	Pollen viability (%)	Seed set (per pollinated flower)
29	21	9,38I+9,81II	81	68,80	2,26
38	20	0,2I+18,8II+0,05IV	85	96,70	10,16
29	20	9I+10II	100	64,90	1,52
29	20	9I+10II	100	61,40	1,49
38	17	0,2I+18,8II+0,05IV	85	93,80	13,22
38	20	0,3I+18,75II+0,05IV	80	96,70	14,42

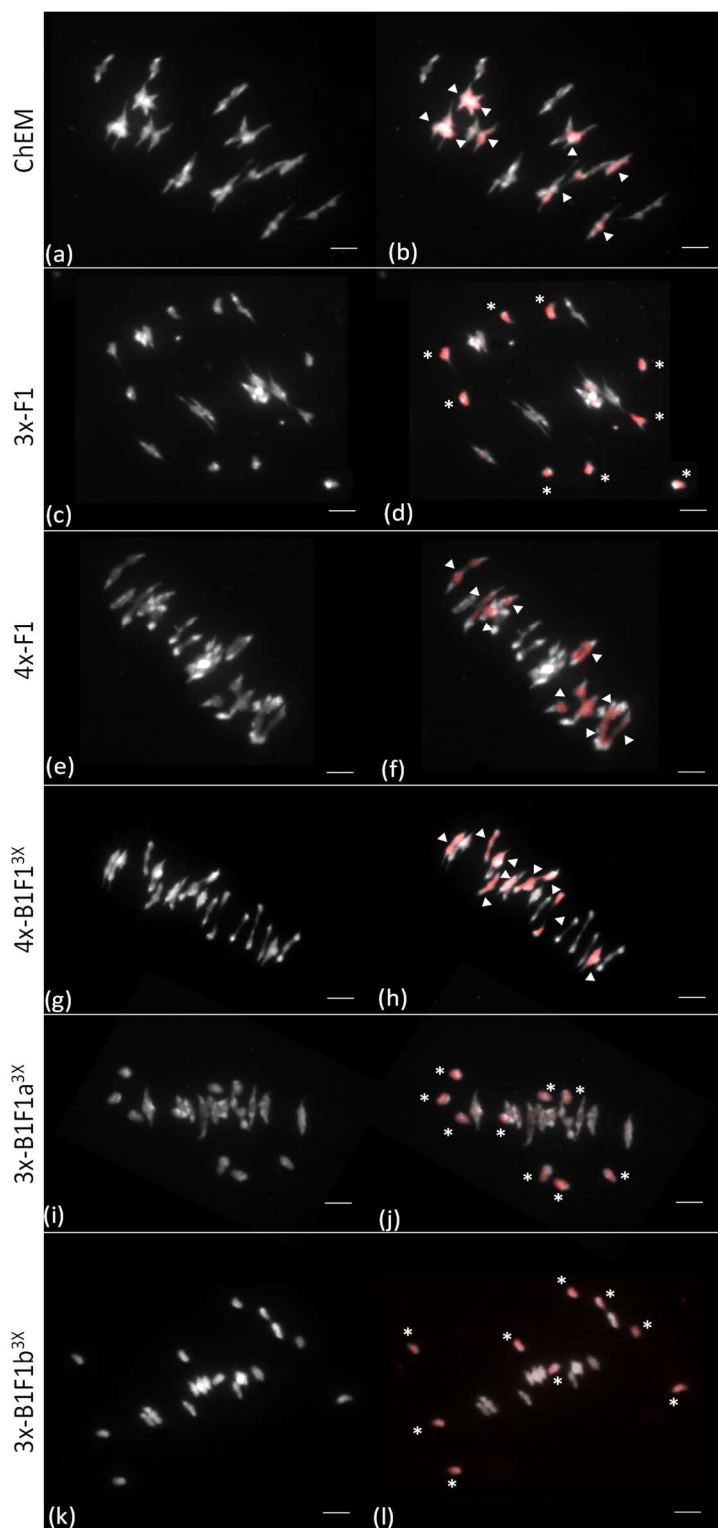


Figure 2: GISH-like labelling of meiotic metaphase I chromosome spreads in different hybrids using the BoB014O06 GISH-like probe. Chromosomes in grey and red are from the A and C subgenome, respectively. GISH-like analyses of meiotic chromosomes were carried out in a synthetic *B. napus* (ChEM, AACC) (a-b), 3x-F1 (AAC) (c-d), 4x-F1(18DChEM8) (AACC) (e-f), 4x-B1F1<sup>3x</sup> (AACC) (g-h), 3x-B1F1a<sup>3x</sup> (AAC) (i-j) and 3x-B1F1b<sup>3x</sup> (AAC) (k-l). Bivalent and univalent chromosomes from the C subgenome are indicated by white arrow heads and stars, respectively. Bars = 5µm

## **Results**

For all of the different hybrids analyzed, the genetic maps were established using the 15K and 19K Brassica Infinium Illumina arrays. On total, 2274 SNPs were polymorphic between the parental lines *B. napus* cv. Darmor and *B. rapa* cv. Chiifu, could be physically anchored on the A chromosomes of the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 genome assembly (Rousseau-Gueutin et al. 2020), and were used to establish the genetic maps of the different hybrids. The average SNP density on the A genome was 6.56 SNP per Mb (or a mean of one SNP every 152 kb). However, the distribution of the SNPs was not homogenous along the A genome, with a lower SNP density in the pericentromeric regions (2.60 SNP per Mb) compared to the non-pericentromeric regions (8.85 SNP per Mb).

For the F1 generations, the allotriploid 3x-F1 ( $2n = 3x = 29$ ) and allotetraploid 4x-F1 ( $2n = 4x = 38$ ) hybrids showed the expected meiotic behavior with a majority of Pollen Mother Cells with 10 A bivalents plus 9 C univalents and 10 A bivalents plus 9 C bivalents, respectively (Table 1, Figure 2). The 3x-F1 hybrid present a lower pollen fertility than the 4x-F1 hybrid (69% and 97%, respectively, Table 1), which is associated with a lower number of seeds per pollinated flower in the 3x-F1 hybrid compared to the 4x-F1 hybrid (2.3 and 10.2 seeds per flowers, respectively, Table 1). We observed a significant 3.7-fold increase of the recombination frequency in the 3x-F1 hybrid compared to the 4x-F1 hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value < 2.2E-16). This increase of COs frequency was observed for each A chromosomes with a fold change ranging from 2.8 to 4.6 (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 2.56E-31). Per interval (distance between two adjacent polymorphic markers), significant differences were observed for only 1.45% of the genetic intervals between these two hybrids (33 intervals, Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 3.88E-02). Nonetheless, at the scale of the chromosome compartments, the 3x-F1 hybrid presents significantly more COs both in the pericentromeric and non-pericentromeric regions compared to the 4x-F1 hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-values < 2.2E-16).

To determine if the observed increase of COs was linked to class I COs, we performed HEI10 immunostaining on pollen mother cells at diakinesis (Figure 3). To unequivocally determine that the counted foci were present on A chromosomes, we combined the HEI10 immunostaining with a C-chromosome specific probe using BAC-FISH. Using this method, we observed a 1.34-fold increase of HEI10 foci on the A chromosomes of 3x-F1 compared to the 4x-F1 hybrid (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 2.05E-08).

To determine the impact on the recombination landscape of the maintenance of an allotriploid compared to an allotetraploid structure in the following generation, we identified two allotriploid hybrids (thereafter referred as 3x-B1F1a<sup>3x</sup> and 3x-B1F1b<sup>3x</sup>) as well as one allotetraploid hybrid (4x-B1F1<sup>3x</sup>). The genome structure and chromosome number of these individuals were firstly identified using flow cytometry and then validated using GISH-like experiment allowing to distinguish the C and A chromosomes. As these hybrids derived from a backcross, on average 50% of the A genome is at the heterozygous stage and can be genetically mapped. Therefore, the genetic mapping comparisons between the hybrids were performed only between the similar heterozygous regions present in the two hybrids considered, preventing biases when comparing their recombination profiles. In addition, we performed HEI10 immunostaining on pollen mother cells at diakinesis in the different hybrids, enabling to compare their recombination rate at the whole genome level.

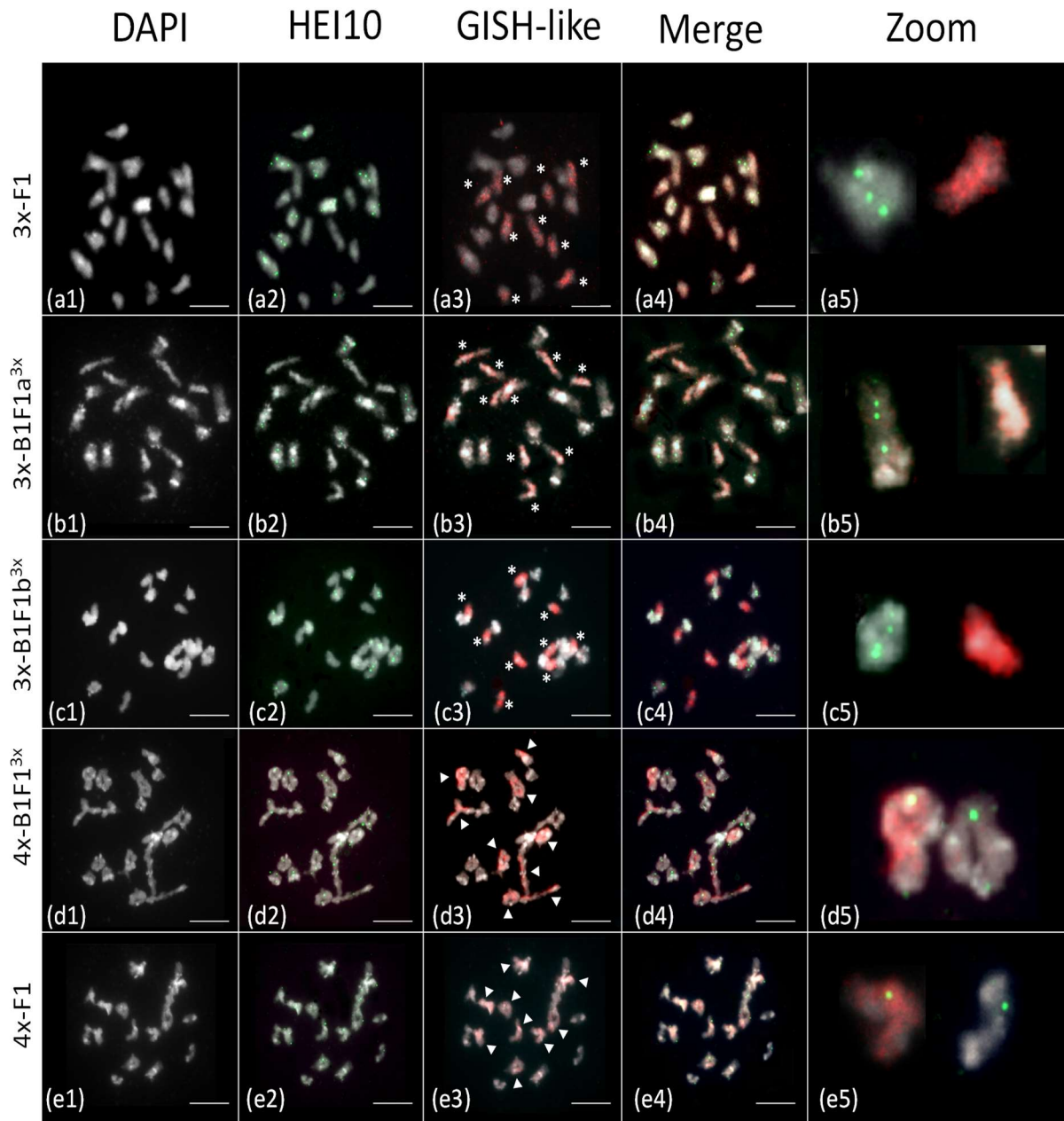


Figure 3: Immunolocalization of HEI10 and GISH-like labelling on diakinesis chromosomes in *Brassica* hybrids pollen mother cells. For each cell, chromosomes were counterstained with DAPI (white), HEI10 labeled (green) and chromosomes painted in red are from the C-genome (BoB014O06). The overlay of the three signals is shown (Merge) and a focus on A and C chromosomes is displayed at the end of each rows (Zoom). The following genotypes were studied: 3x-F1 (AAC) (a), 3x-B1F1a<sup>3x</sup> (AAC) (b), 3x-B1F1b<sup>3x</sup> (AAC) (c), 4x-B1F1<sup>3x</sup> (AACC) (d) and 4x-F1 (AACC). Bars = 5 $\mu$ m

1. Maintenance of the modified recombination profile in successive generations of allotriploid hybrids, with an even slight increase of CO frequency in the 3x-B1F1 hybrid compared to the 3x-F1 mother plant.

Among the backcross progeny of the 3x-F1 hybrid, two hybrids were retrieved with a AAC genomic structure. As expected, they presented a contrasted pattern of heterozygous regions along the genome (3x-B1F1a<sup>3x</sup> and 3x-B1F1b<sup>3x</sup>). The meiotic behavior of these two hybrids was slightly improved compared to the 3x-F1, with systematically ten A bivalents and nine C univalents (Table 1, Figure 2). However, this improved meiotic behavior had little to no impact on the fertility, as these two hybrids presented a similar male fertility and seed set as their parental mother plant 3x-F1 (Table 1). The first AAC B1F1 hybrid (3x-B1F1a<sup>3x</sup>) retrieved presented 146.7 Mb (i.e. 42.3%) of its genome at the heterozygous stage, distributed in 22 regions on the ten A chromosomes that can be followed by a total of 980 SNP (Table 2, Figure 5). Using this latter set of SNPs, the comparative genetic mapping indicates a slight, yet significant, increase of recombination of 1.35-fold in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid compared to its 3x-F1 parent (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 1.92E-19). Per interval, only one genetic interval localized on the long arm of the chromosome A09 was significantly different between the two hybrids, with more recombination in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid compared to the 3x-F1 (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.033). At the chromosome scale, there is a slight, yet significant, increase of recombination in the pericentromeric regions (chi-squared test, p-value = 0.044). However, the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid presents significantly more recombination in the non-pericentromeric regions compared to its parental line (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 9.93E-19). These results suggest that the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid has a similar modified distribution as its 3x-F1 parent, with a global increase of COs all along the genome.

To determine if the increase of COs in these 22 regions of the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid was linked to a redistribution of class I COs from the adjacent homozygous regions or to a global increase of COs, we performed HEI10 immunostaining. This allowed us to determine genome wide the frequency of class I COs, considering this time both the heterozygous and homozygous regions (Figure 3). Despite we observed a slight 1.08-fold increase of HEI10 foci frequency in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> compared to the 3x-F1 hybrid, this was not significantly different (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 0.98) (Figure 4).

To further validate this result, we performed this analysis using another B1F1 individual (3x-B1F1b<sup>3x</sup>). This latter hybrid presents 182.3 Mb of its genome (i.e. 52.6%) at the heterozygous stage (Table 2, Figure 5), with only 75 Mb of its genome (i.e. 21.1%) presenting the same heterozygous region as the other B1F1a<sup>3x</sup> hybrid. The overall heterozygous regions of the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrid were distributed over 18 A chromosome regions that were covered by 1205 polymorphic SNPs. Comparative genetic mapping of the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> with the 3x-F1 hybrid reveals that it presents a significant 1.7-fold increase of the recombination rate (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 3.82E-78), which was even higher than the one observed in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid. This increase is observed for the 18 tested regions, but only 14 regions present a significant difference (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.017). Along the genome, only five genetic intervals presented a significant difference of recombination frequency (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.022E-12). At the chromosome scale, this 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrid presented more recombination in both the pericentromeric and non-pericentromeric regions (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 1.36E-14 and 2.71E-65, respectively). This increase of COs frequency established from genetic maps in both 3x-B1F1<sup>3x</sup> hybrids compared to the 3x-F1 was associated with a significant 1.18-fold increase of HEI10 foci observed on A bivalents (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 1.27E-05) (Figure 3, Figure 4).



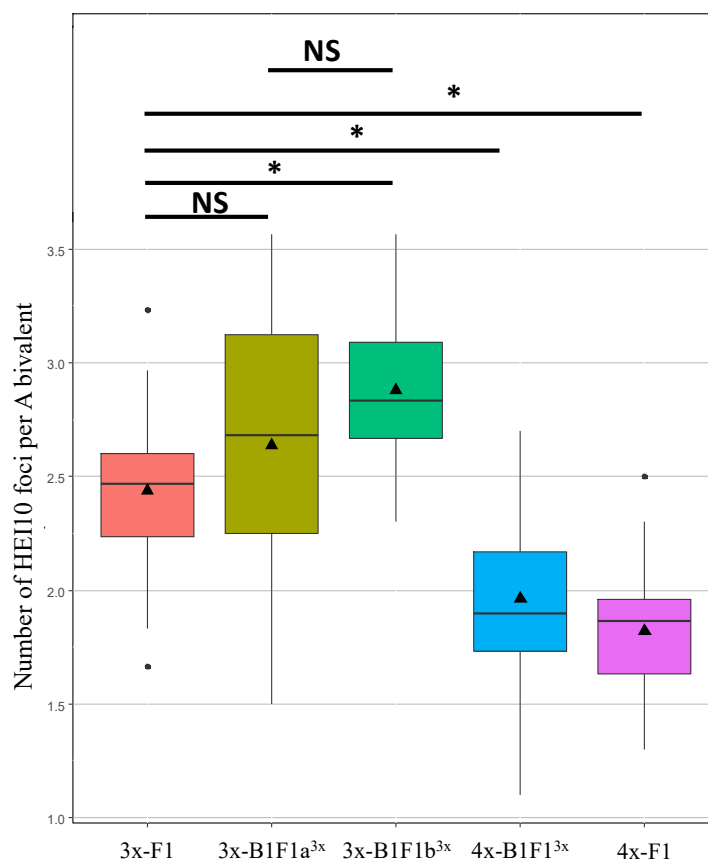


Figure 4: Number of HEI10 foci per A bivalent in five hybrids, 3x-F1 (AAC), 3x-B1F1a<sup>3x</sup> (AAC), 3x-B1F1b<sup>3x</sup> (AAC), 4x-B1F1<sup>3x</sup> (AACC) and 4x-F1 (AACC). The means are indicated by a black triangle.

Table 2: Genomic structure and genetic size of the hybrids.

Hybrid	Number of plants	Number of regions	Number of SNP	Number of COs	Genetic size (cM)	Coverage (Mb)	Genome coverage (%)	Average recombination rate (cM/Mb)
3x-F1	131	10	2274	3946	3045,3	327,58	94,55	9,30
3x-B1F1a <sup>3x</sup>	130	22	980	2216	1739,7	146,68	42,33	11,86
3x-B1F1b <sup>3x</sup>	130	18	1205	3365	2673,3	182,27	52,61	14,67
4x-B1F1 <sup>3x</sup>	172	17	1128	946	574,6	125,18	36,13	4,59
4x-F1	172	10	2274	1408	829,6	327,58	94,55	2,53
4x-B1F1a <sup>4x</sup>	172	14	1099	1093	665,4	198,84	57,39	3,35

○ Diversity within the 3x-B1F1<sup>3x</sup> hybrids

To determine if the recombination landscape was similar between the two investigated 3x-B1F1<sup>3x</sup> hybrids, we performed comparative genetic mapping on 16 heterozygous regions shared by both hybrids (Figure 5). These regions covered 73 Mb of the genome (i.e. 21.1%) and were covered by 609 SNPs. We observed a significant 1.24-fold increase of the COs frequency in the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> compared to 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 1.29E-07). Over the 16 regions, three regions presented slightly more COs in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup>, whereas the remaining 13 regions had more COs in the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrid. Among these 13 regions, only two regions presented a statistically significant increase of COs (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.030). Per interval, only one genetic region localized on the short arm of the chromosome A06 showed a significant increase of COs in the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.023). At the chromosome scale, the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> presented more recombination both in the pericentromeric and non-pericentromeric regions (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 6.33E-04 and 7.71E-06, respectively). The comparison of the recombination frequency (class I CO) between these two hybrids was also evaluated using HEI10 immunostaining on pollen mother cells, and GISH-like to distinguish C chromosomes, but no differences were observed (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 0.58) (Figure 3, Figure 4).

2. A normal meiotic control is mainly recovered in an AACC hybrid produced from a 3x-F1 mother plant

To decipher if the modified recombination landscape observed in the 3x-F1 hybrid may be reverted back to a normal meiotic control, we compared the genetics maps of an allotetraploid 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid identified in the progeny of the 3x-F1 hybrid to its 3x-F1 mother plant. This 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid presented a regular meiosis, with ten A bivalents and nine C bivalents at metaphase I (Table 1, Figure 2). It presented an improved pollen viability compared to its mother plant, associated with an improved seed set, which was comparable to the 4x-F1 hybrid (Table 1). The 4x-B1F1<sup>3x</sup> presented 125,2 Mb of its genome (i.e. 36.1%) at the heterozygous stage (Figure 5, Table 2), distributed over 17 regions. By comparing the same genetic intervals between this 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid and its parental line 3x-F1 (using the same set of polymorphic markers), a significant 2.6-fold decrease of recombination frequency was detected in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid genome wide (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 2.45E-19). Each of the 17 regions presented less recombination in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid, with a fold change ranging from 1.3 to 3.5, but with only 12 regions presenting a statistically significant reduction of COs (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.026). Locally, only nine genetic intervals were statistically significantly different between the two hybrids (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.039). At the chromosome scale, the differences observed between these two hybrids are also significant, both in the pericentromeric and non-pericentromeric regions (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 1.43E-38 and 5.59E-124, respectively). These differences were confirmed by HEI10 immunostaining, which revealed a significant 1.24-fold decrease of the number of HEI10 foci per A bivalent in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid compared to its parent 3x-F1 (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 5.92E-05) (Figure 3, Figure 4).

To determine if the increased recombination rate observed in the 3x-B1F1 hybrids compared to their 3x-F1 mother plant may also be present in an allotetraploid hybrid, we produced a backcrossed progeny from the 4x-F1 hybrid and compared the recombination landscape of the 4x-B1F1<sup>4x</sup> and the 4x-F1 hybrids. Importantly, the chosen 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrid presented a similar

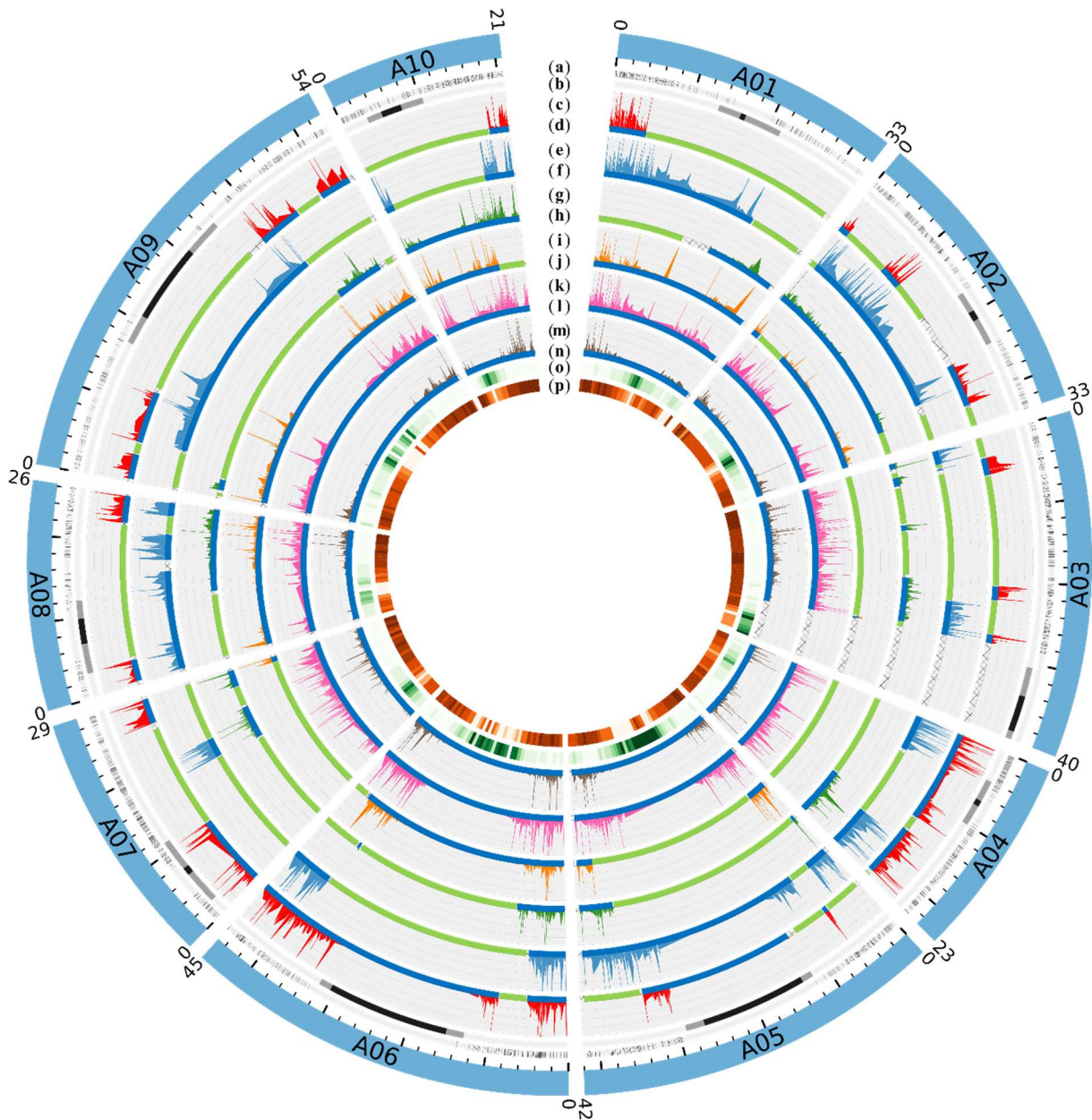


Figure 5: Homologous recombination landscape on the A genome of the six hybrids. The first outer circle represents the ten A chromosomes from *B. napus* cv. Darmor-bzh. The second circle represents the position of the polymorphic SNPs used to generate the genetic maps (a). The third circle refers to the position of the pericentromeric and centromeric regions in grey and black respectively (b). The lineplots correspond to the recombination rates in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> (c), 3x-B1F1b<sup>3x</sup> (e), 4x-B1F1<sup>3x</sup> (g), 4x-B1F1<sup>4x</sup> (i), 3x-F1 (k) and 4x-F1 (m) hybrids. The genotyping blocks bellow each lineplot correspond to the polymorphism (i.e. heterozygous (blue) or homozygous (green)) in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> (d), 3x-B1F1b<sup>3x</sup> (f), 4x-B1F1<sup>3x</sup> (h), 4x-B1F1<sup>4x</sup> (j), 3x-F1 (l) and 4x-F1 (n) hybrids. The hatched areas correspond to regions without informative genotyping data. Finally, the two most inner circles represent the TEs density (o) and gene density (p), respectively.

meiotic behavior, pollen viability and seed set compared to its parent 4x-F1 (Table 1, Figure 3). It had 198.84 Mb of the genome (i.e. 57.39%) at the heterozygous state, which were distributed over 14 regions (on 9 out of the 10 A chromosomes) covered by a total of 1099 SNP (Figure 5, Table 2). Using this set of common SNPs between the two hybrids and by performing their genetic maps, we found a 1.5-fold significant increase of the recombination frequency in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrid compared to its parent 4x-F1 (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 3.40E-13). This increase was observed in all regions, but was only significantly increased in three regions (Bonferroni corrected chi-squared test, highest p-value = 0.03). At the interval level, no significant differences were observed between the two hybrids (Bonferroni corrected chi-squared test, p-values > 0.05). At the chromosome scale, significant differences in both pericentromeric and non-pericentromeric regions were observed between these two hybrids (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 7.54E-09 and 3.89E-08, respectively). These results are currently being validated using HEI10 immunostaining combined to GISH-like experiments.

To unambiguously determine if the allotriploidy had an impact on the recombination landscape of the recovered 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid, we compared the 4x-B1F1<sup>3x</sup> and 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrids deriving from the 3x-F1 and the 4x-F1 hybrid, respectively. The shared heterozygous regions between these two hybrids covered 84.66 Mb of the genome (i.e. 24.44%) (Figure 5, Table 2). They correspond to 16 common regions distributed on nine of the ten A chromosomes, and were covered by 646 SNP. Comparison of the genetic maps obtained from this latter set of SNPs revealed, at the genome scale, a slightly higher recombination frequency in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> compared to the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.026). At the chromosome scale, the two hybrids presented no differences of their recombination frequency for the pericentromeric regions (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.34). However, slightly more COs were detected in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrid for the non-pericentromeric regions (578 vs 510 COs, Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.041). Over the 14 heterozygous regions common between these two hybrids, four regions present more recombination in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> than in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> while for the ten remaining regions the 4x-B1F1<sup>4x</sup> present more recombination than the 4x-B1F1<sup>3x</sup>. However, only one region on the chromosome A07 present significantly more COs in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> compared to the 4x-B1F1<sup>3x</sup> (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.028), this region explaining the significant difference observed between these two hybrids genome-wide (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.082).

3. The recombination landscape in pericentromeric regions is affected by the genomic structure as exemplified on chromosomes A01 and A02

The Illumina Brassica 19K array presents a relatively poor SNP density over the pericentromeric regions compared to the non-pericentromeric regions, with 2.60 SNP/Mb and 8.85 SNP/Mb respectively. However, a main feature of the AAC recombination landscape is the presence of recombination close to the centromeric regions (Pelé et al. 2017, Boideau et al. 2021). Therefore, to assess more finely the recombination landscape within the pericentromeric regions and to determine to what extent COs can arise close to the centromere in the AAC hybrids, we increased the SNP density in the pericentromeric regions of two chromosomes (A01 and A02) that were heterozygous in most of our hybrids. This analysis did not include the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> hybrid as it was homozygous for these regions. Similarly, as the left pericentromeric region of the chromosome A01 was homozygous in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid, this specific region could not be analyzed for this hybrid either. Overall, the analyses of the A01 and A02 pericentromeric regions span 8.2 and 7.1 Mb, respectively. They were poorly covered by SNPs using the 15K Illumina array, with 2.2 SNP/Mb and no SNP for A01 and A02, respectively.

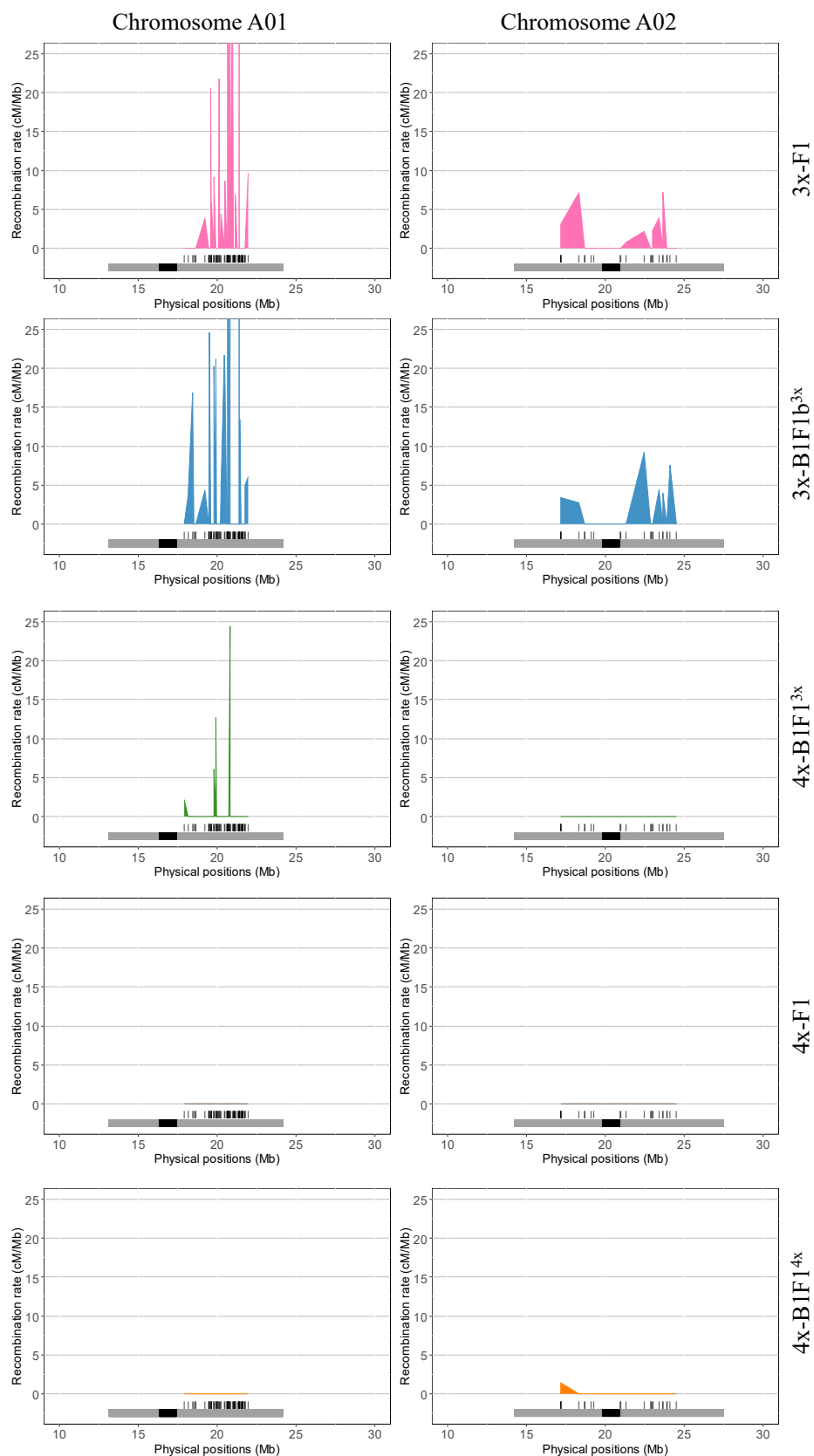


Figure 6: Comparison of the homologous recombination landscape within the pericentromeric regions of A01 and A02 chromosomes within the five investigated hybrids, 3x-F1, 3x-B1F1b<sup>3x</sup>, 4x-B1F1<sup>3x</sup>, 4x-F1, 4x-B1F1<sup>4x</sup>.

Therefore, we densified these two regions by developing an additional set of 87 KASPar markers deriving from SNPs present on the Brassica 60K Illumina array or using the genome assembly of the parental lines (see Methods). This led to an increased marker density by 4.7 folds for the pericentromeric region of chromosome A01, with 10.3 SNP per Mb. It also permitted to add 19 markers to the previously uncovered A02 pericentromeric region, leading to a marker density of 2.7 SNP/Mb.

For both pericentromeric regions studied, the 4x-F1 hybrid present no COs, while the 3x-F1 hybrid present 36 COs in total (Figure 6). Interestingly, these COs can arise as close as 411 kb from the centromeric borders in the 3x-F1. In addition, the 3x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid presented a similar recombination frequency (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 0.634) and distribution in both pericentromeric regions as the 3x-F1 hybrid (Bonferroni corrected chi-squared test, p-values > 0.05). Interestingly, the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid presented a significant decrease of recombination frequency of 13.4 folds (Bonferroni corrected chi-squared test, p-value = 2.16E-09), associated with an absence of COs on the A01 chromosome and only four COs in the pericentromeric region of the A02 chromosome. These results are similar to those observed for the 4x-F1 hybrid, where no COs were detected on both A01 and A02 pericentromeric regions. However, a few COs (two) were detected on the chromosome A01 in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrid and only four COs on the chromosome A02 in the 4x-B1F1<sup>3x</sup> hybrid, thus preventing the comparison of COs distribution between these two hybrids.

The allotriploid genome structure thus allows the formation of many COs within the pericentromeric regions. In stark contrast, an allotetraploid hybrid deriving from either an allotriploid or allotetraploid individuals has nearly no COs in these pericentromeric regions.

#### 4. Different factors contribute to the increase of recombination in B1F1 plants, which are partially heterozygous

Overall, we observed an increased recombination rate in both 3x-B1F1 or 4x-B1F1 hybrids compared to the F1 plants with a similar ploidy level. These different hybrids differed by their overall level of heterozygosity compared to their mother plants. Indeed, the B1F1 plants are only partially heterozygous (~50%), whereas the F1 plants are fully heterozygous. We thus tested several hypotheses that may explain this different recombination rate between F1 and B1F1 plants. Firstly, we looked at the impact of the length of the heterozygous regions on the CO frequency in the B1F1 hybrids. We could observe a positive linear correlation between the size of the region and the recombination rate in the 3x-B1F1 hybrids, whereas we found a negative correlation in both 4x-B1F1 hybrids (Figure 7). Secondly, we tested if the juxtaposition of heterozygous and homozygous regions affects the recombination landscape, as observed in *Arabidopsis* (Ziolkowski et al. 2015). To that purpose, we defined three categories, corresponding to a heterozygous region surrounded by none, one, or two homozygous regions (Figure 8 A, Table S3). Thereafter, the number of COs per Mb was retrieved for each region of each of the four B1F1 hybrids and normalized by the population size. For each B1F1 hybrids, independently of their ploidy level, we observed no significant differences between the different categories (Mann Whitney Wilcoxon test, lowest p-value = 0.10). Similar results were obtained when considering either all three allotriploid or all three allotetraploid hybrids together (Mann Whitney Wilcoxon test, lowest p-value = 0.07). However, when considering all hybrids together, significant differences were observed (Figure 8 B, Table S3). An increase of the recombination frequency was observed in heterozygous regions surrounded by either one (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 0.02) or two (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 0.03) homozygous regions, compared to fully heterozygous regions. In addition, no statistical

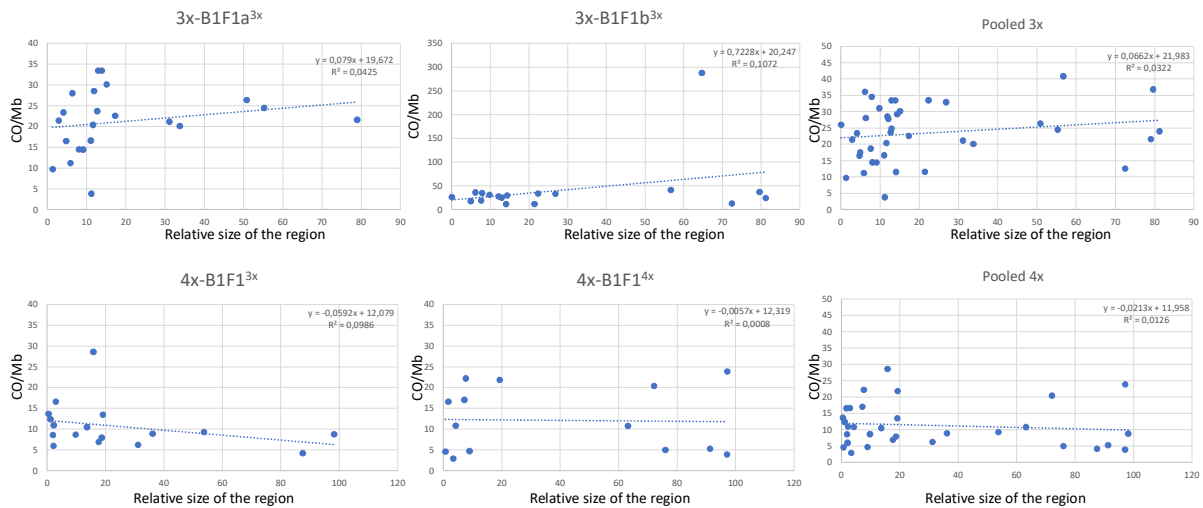


Figure 7: Linear correlation between the recombination frequency and the relative size of the heterozygous regions in the B1F1 hybrids. The linear regression equation is indicated on the upper right corner of each diagram.

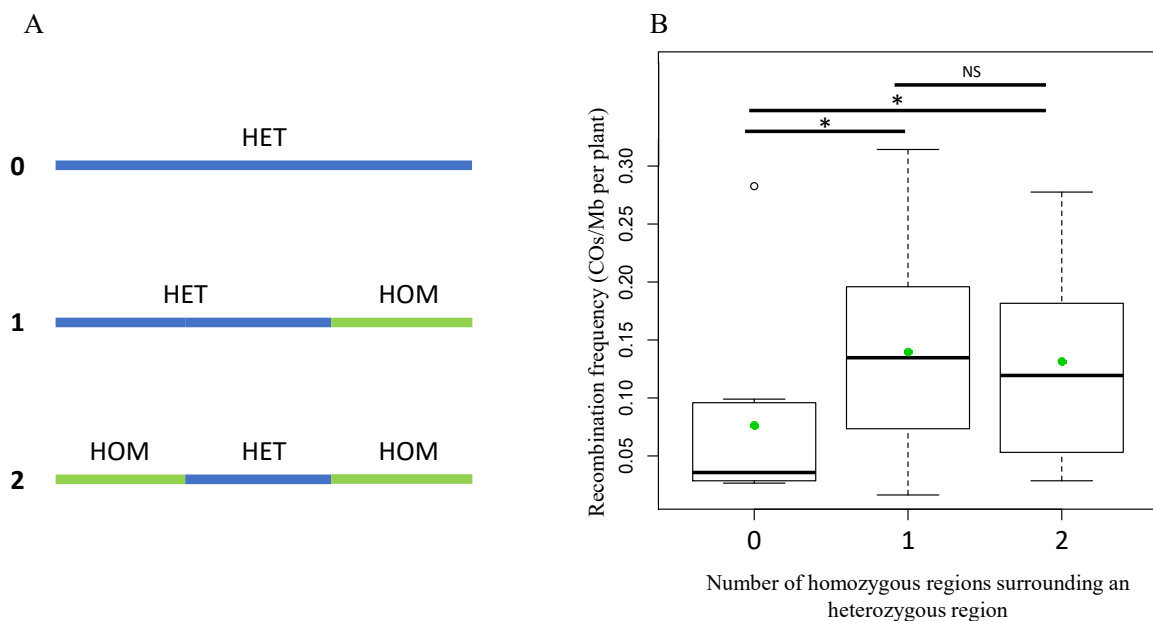


Figure 8: Schematic representation of the three classes of regions used to study the juxtaposition effect of homozygous and heterozygous regions on recombination. The regions were classified into three categories (A): heterozygous region without any homozygous border (0), heterozygous region bordered by a single homozygous region (1) and heterozygous region surrounded by two homozygous regions (2). (B) Impact of the border on recombination frequency in the B1F1 hybrids. Significance p-value < 0.05: \*; NS: not significant. Means are indicated by a green dot.

difference was observed for the heterozygous next to a single or two homozygous regions (Mann Whitney Wilcoxon test, p-value = 0.96). These results remain true when discarding an extreme value (observed for the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrid), which resulted from the presence of 8 COs in the progeny of the 3x-B1F1b<sup>3x</sup> in a small 27 kb region.

## **Discussion**

The main aim of this study was to decipher if the increased homologous recombination rate (3,7 fold) and modified landscape observed in *Brassica* allotriploid AAC hybrids (Leflon et al. 2010; Pelé et al. 2017; Boideau et al. 2021), obtained by crossing *B. napus* with *B. rapa*, may either be maintained or reverted back to normal in the following generation. To that purpose, we firstly looked at the chromosome number of the progenies obtained by backcrossing the allotriploid with *B. napus* cv. Darmor. We notably identified few allotriploid and allotetraploid individuals, for which we examined the recombination landscape using both genetic mapping or HEI10 immunostaining. We could demonstrate that the modified recombination landscape can remain by performing successive generations at the allotriploid level, enabling to breaking down the linkage disequilibrium in cold recombining regions. As the cold recombining pericentromeric regions were poor in markers, we densified these regions for two chromosomes and could determine that crossovers may occur at 411 kb compared to 4.5 Mb in the vicinity to the centromeres in allotriploid compared to allotetraploid hybrids. We also demonstrated that the recovery of an allotetraploid individual in the progeny of an allotriploid hybrid allows the recovery of a normal meiotic regulation similar to the one observed in a *B. napus* allotetraploid hybrid, preventing the putative genomic instabilities resulting from a modified regulation of the homologous recombination process. Interestingly, we also detected an increase of recombination in all investigated B1F1 plants, independently of their ploidy level, and investigated its potential origin.

### *1. The recombination landscape remains modified and the boost of recombination is even exacerbated when maintaining an AAC allotriploid structure in the backcross progeny.*

By comparing the recombination landscape of an allotriploid AAC hybrid with two allotriploid AAC B1F1 hybrids, we could demonstrate that the modified regulation of homologous recombination can be maintained for several generations. The presence of this unique recombination landscape, only in allotriploid hybrids, indicates that it results from this particular genomic structure with C chromosomes at the univalent stage. Surprisingly, we observed an even higher recombination rate in the 3x-B1F1 compared to the 3x-F1 hybrids: 1.35-fold and 1.7-fold in the 3x-B1F1a<sup>3x</sup> and 3x-B1F1b<sup>3x</sup> hybrids, respectively. This increased CO frequency was also detected at the genome scale by counting HEI10 foci but at a lower level (1.08-fold and 1.17-fold for 3x-B1F1a<sup>3x</sup> and 3x-B1F1b<sup>3x</sup>). These fold-change differences between the genetic maps and HEI10 immunostaining experiment may result from heterochiasmy (differential recombination rate between male and female meiosis). Indeed, Pelé et al. (2017) already showed that AAC female meiosis, investigated here through genetic mapping, formed significantly more COs than the male meiosis, from which we performed HEI10 immunostaining on pollen mother cells. So, this increased recombination rate observed in allotriploids is partially due to an increase of class I COs (at least in male meiosis). In our previous investigation of the recombination rate in an allotriploid *Brassica* hybrid, Pelé et al. (2017) revealed an important decrease of the interference strength. In this current study, we used 10 times more SNPs compared to the previous study and were able to finely examine some uninvestigated pericentromeric regions, due to the important improvement of the genome assemblies of the parental lines (Wang et al. 2018, Rousseau-Gueutin et al. 2020). To that purpose, we also designed additional SNP markers in two pericentromeric regions, enabling to





determine that these regions present numerous COs in allotriploid hybrids (F1 and B1F1), whereas almost none were detected in allotetraploid hybrids (none in 4x-F1, two in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> and four in the 4x-B1F1<sup>3x</sup>). This observation supports the hypothesis of a modified chromatin structure in the allotriploid. Indeed, in Arabidopsis different studies showed that the KO of genes impacting DNA methylation such as MET1, DDM1 or CMT3 (Yelina, 2012 & 2015, Melamed-Bessudo and Levy 2012, Underwood et al. 2018) can promote the formation of COs in pericentromeric regions. Complementary analyses of the methylation rate along the chromosome are needed to validate this hypothesis. Additionally, it is possible that the meiotic proteins deriving from C chromosomes, remaining as univalents, may partially explain the increased recombination rate observed in allotriploids. Indeed, as the C chromosomes might transcribe genes of the recombination machinery but are unable to perform homologous recombination as univalent, the machinery may thus be used to form additional COs between homologous A chromosomes. Comparative transcriptomic analyses from pollen mother cells in prophase will enable to test this hypothesis.

2. *Recovering an AACC tetraploid progeny from an allotriploid AAC hybrid restores a normal meiotic regulation.*

The comparison of an allotetraploid B1F1 plant (4x-B1F1<sup>3x</sup>) with its allotriploid mother plant (3x-F1) enabled us to decipher that the modified recombination landscape in an allotriploid individual may be reverted back to normal in an allotetraploid progeny. This latter individual harbored a meiotic behavior similar to most allotetraploid *B. napus* varieties, with the formation of 10 A and 9 C bivalents for the majority of the pollen mother cells analyzed. This 4x-B1F1<sup>3x</sup> showed a clear decrease of CO frequency (by 2.6-fold) compared to its 3x-F1 mother-plant. Additionally, it also had a drastic decrease (by 13.4-fold) of COs in pericentromeric regions, despite four COs were observed on A01 pericentromeric region. It still remains to be deciphered if the interference strength is also restored in the 4x-B1F1<sup>3x</sup>. The recombination rate observed in this latter plant was similar to those observed from the 4x-B1F1<sup>4x</sup>. Interestingly, the comparison of CO frequency between the 4x-B1F1<sup>4x</sup> and its 4x-F1 mother plant indicated a significant CO increase of 1.5-fold. The HEI10 immunostaining is being currently investigated in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> and will provide novel information on the precise role of class I COs in this phenomenon. Additionally, the genetic mapping of the C genome is also in progress in the 4x-F1 and 4x-B1F1<sup>4x</sup> hybrids, enabling to validate these observations of the C subgenome.

3. *A complementary increase of homologous recombination is observed in the backcrossed progeny whatever the ploidy level of the mother plants*

Different hypotheses may explain the increase of COs frequency in B1F1 progeny compared to their mother plant, independently of their ploidy level. A first explanation relies on the overall level of heterozygosity of the hybrid and the length of the heterozygous regions. In our investigated B1-F1 hybrids, 36.1% to 57.4% of the A genome was at heterozygous stage.

We firstly tested if there is a positive correlation between the length of the heterozygous region and the CO frequency. We could validate this hypothesis, as a positive linear regression between the size of the mapped regions and the CO frequency is observed, but only in our 3x-B1F1 hybrids. The negative linear regression between the size of the mapped regions and the CO frequency observed in the 4x-B1F1 hybrids could be linked to interference, as small regions can present one CO, while larger regions can hardly harbor more than two COs, leading to a decreased number of COs per Mb in large regions. However, as the CO distribution is not homogenous along the chromosome, it is likely that the position of the heterozygous regions



combined with the size of the regions could play a role. A second explanation of these different recombination rates relies on the juxtaposition of heterozygous and homozygous regions in B1F1 compared to fully heterozygous regions in F1 plants. Indeed, Ziolkowski et al. (2015) showed in *Arabidopsis* that such juxtapositions favor CO formation in the heterozygous regions through ZMM interfering repair pathway and reduce the formation of CO in homozygous regions. Combining all the information obtained from our different hybrids investigated, we could observe an increase of COs rate in the heterozygous regions surrounded by either one or two homozygous regions. The mechanism at the origin of such regulation remains to be deciphered but our results suggest that it may be linked to a global increase of class I CO, as HEI10 foci are more frequent in 3x-B1F1<sup>3x</sup> than in 3x-F1 hybrids. These results have to be confirmed by comparing the number of HEI10 foci in the 4x-B1F1<sup>4x</sup> compared to 4x-F1 hybrids. A third explanation corresponds to the SNP polymorphism rate, which is known to influence the CO formation with an optimum as demonstrated by Blackwell et al. (2020), this CO distribution being under the control of MSH2, a protein involved in the mismatch repair system. The different heterozygous regions within each B1F1 hybrids can present different SNP polymorphism rate, which is known to impact on the recombination frequency. Such hypothesis may be tested taking advantage of the high quality de novo genome assemblies of our parental lines (Rousseau-Gueutin et al. 2020; Zhang et al. 2018). In addition, as the SNP polymorphism has no effect at the megabase scale in *Arabidopsis* (Lian et al. 2022), the recombination landscapes must be studied at both the scale of genetic markers (i.e. intervals between two polymorphic SNPs) and at the megabase scale. Finally, we cannot exclude that these differences do not result from trans-acting factors, i.e. different allelic copies of certain meiotic genes between the hybrids.

4. *The boost of recombination is a relevant method for introduction of a new variability in breeding programs.*

Mathematical modelling, based on previous results (Pelé et al. 2017), revealed that the triploid boost can be highly efficient, especially for the modification of linkage disequilibrium in pericentromeric regions (Tourrette et al. 2021). However, the unexpected CO increase observed in 3x-B1F1 compared to F1 hybrids was not considered in this latter study. The use over several generations of 3x hybrids thus still has to be established. Similarly, the link between their recombination frequency and the introgression efficiency of *B. rapa* genomic regions within the *B. napus* genetic background (as demonstrated in Boideau et al. 2021 in first generation) remain to be determined in advanced generations.

The recovery of an allotetraploid *B. napus* individual in the progeny of an allotriploid hybrid, associated with a stable meiosis and an improved seed set, is a proof of concept that the allotriploid pathway is of high relevance (i) to speed up breeding programs, (ii) to reduce the size of *B. rapa* introgressed regions of interests (preventing the parallel introgression of deleterious alleles),(iii) but also to reduce the linkage disequilibrium observed within *B. napus*.



**Supplementary information:**

Table S1: Genotyping data used to create all the genetic maps

Table S2: Statistical comparisons performed in this study (per regions, per chromosomes compartments and per intervals)

Table S3: Number of regions per classes in the four B1F1 hybrids.

**Acknowledgments**

We thank the Genetic Resource Center BrACySol ([https://www6.rennes.inrae.fr/igepp\\_eng/About-IGEPP/Platforms/BrACySol](https://www6.rennes.inrae.fr/igepp_eng/About-IGEPP/Platforms/BrACySol)) for providing seeds of the parental lines. We also thank the UMR 1905 GENTYANE Platform (especially C. Poncet, Clermont-Ferrand, France, <http://gentyane.clermont.inra.fr>) for performing DNA extractions and KASPar genotyping. We thank Trait Genetics (especially M. Ganal) for generating the genotyping data from the 15K and 19K Brassica Illumina Infinium array (<http://www.traitgenetics.com/>). We acknowledge the molecular cytogenetics platform ([https://www6.rennes.inrae.fr/igepp\\_eng/About-IGEPP/Platforms/Molecular-Cytogenetics-Platform-PCMV](https://www6.rennes.inrae.fr/igepp_eng/About-IGEPP/Platforms/Molecular-Cytogenetics-Platform-PCMV)) for performing the cytogenetic experiments. We thank Mathilde Grelon for providing the HEI10 antibodies, sharing protocols and productive discussions. We thank the GOGEP team and GenOuest bioinformatic platform (<https://www.genouest.org/>), especially F. Legeai, S. Robin, M. Boudet and A. Bretaudeau. We are thankful to Matthieu Falque and Eric Jenczewski for helpful discussions on the statistical analysis of the data concerning the juxtaposition effect. We would also like to thank all the staff who took care of our plant material (especially L. Charlon, P. Rolland, J-P. Constantin, J. M. Lucas and F. Letertre).

**Contributions**

FB, A-MC and MR-G designed the study, FB performed the genetic maps and statistical analyses, LM contributed to the automatization of the genetic map establishment, AB and VH performed the HEI10 experiments, AB, VH, GT, OC and FB analyzed the HEI10 images, GT performed and analyzed the MI BAC FISH meiotic behavior, GT developed the macro used to analyze HEI10 images, ML-T took care of the DNA samples, ML-T, GD, CF and FB analyzed the genotyping data, FE performed the classical meiotic behavior, MG generated and took care of the plant material, JB designed the additional pericentromeric SNP, JM generated the Circos representations.

**Data availability:** All data analyzed in this study are provided as supplementary material.

**Funding:** This work was made possible by the financial support of the ANR ‘Stirrer’ (ANR-19-CE20-001 awarded to MR-G). This project also received funding from INRAE ‘Biology and Plant Breeding’ department to perform part of the experiments presented here (projects ‘Recipe’ and ‘Recoptic’ awarded to MR-G and A-MC respectively), as well as for part of FB’s PhD salary. We also thank the ‘Region Bretagne’ that financed the second half of FB’s PhD salary (project ‘Diverse’).

**References**

Alonso-Blanco C, Andrade J, Becker C, Bemm F, Bergelson J, Borgwardt KMM, Cao J, Chae E, Dezaan TMM, Ding W, *et al.* 2016. 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **166**: 481–491.



- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens F-C, Falentin C, Genete M, Berrabah W, Chèvre A-M, Delourme R, et al. 2018.** Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nature Plants* **4**: 879–887.
- Blackwell AR, Dluzewska J, Szymanska-Lejman M, Desjardins S, Tock AJ, Kbir N, Lambing C, Lawrence EJ, Bieluszewski T, Rowan B, et al. 2020.** MSH 2 shapes the meiotic crossover landscape in relation to interhomolog polymorphism in Arabidopsis. *The EMBO Journal* **39**: 1–22.
- Boideau F, Pelé A, Tanguy C, Trotoux G, Eber F, Maillet L, Gilet M, Lodé-Taburel M, Huteau V, Morice J, et al. 2021.** A Modified Meiotic Recombination in Brassica napus Largely Improves Its Breeding Efficiency. *Biology* **10**.
- Boideau F, Richard G, Coriton O, Huteau V, Belser C, Deniot G, Eber F, Falentin C, Ferreira de Carvalho J, Gilet M, et al. 2022.** Epigenomic and structural events preclude recombination in *Brassica napus*. *New Phytologist*.
- Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF. 1999.** Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. **203**: 184–203.
- Capilla-pérez L, Durand S, Hurel A, Lian Q, Chambon A, Taochy C. 2021.** The synaptonemal complex imposes crossover interference and heterochiasmy in Arabidopsis. **118**: 1–11.
- Crismani W, Mercier R. 2012.** What limits meiotic crossovers. *Cell Cycle* **11**: 3527–3528.
- Desai A, Chee PW, Rong J, May OL, Paterson AH. 2006.** Chromosome structural changes in diploid and tetraploid A genomes of Gossypium. *Genome* **49**: 336–345.
- Dooner HK, He L. 2008.** Maize genome structure variation: Interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination. *Plant Cell* **20**: 249–258.
- Fernandes JB, Séguéla-Arnaud M, Larchevêque C, Lloyd AH, Mercier R. 2018.** Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 2431–2436.
- Fransz P, Linc G, Lee CR, Aflitos SA, Lasky JR, Toomajian C, Ali H, Peters J, van Dam P, Ji X, et al. 2016.** Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **88**: 159–178.
- Girard C, Chelysheva L, Choinard S, Froger N, Macaisne N, Lehmemdi A, Mazel J, Crismani W, Mercier R. 2015.** AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genetics* **11**.
- de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T. 2005.** Carhta Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* **21**: 1703–1704.
- Howell EC, Barker GC, Jones GH, Kearsey MJ, King GJ, Kop EP, Ryder CD, Teakle GR, Vicente JG, Armstrong SJ. 2002.** Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of Brassica oleracea. *Genetics* **161**: 1225–1234.
- Jahier J, et al. 1992.** *Techniques de cytologie végétale*. INRA.





- Jayakodi M, Padmarasu S, Haberer G, Bonthala VS, Gundlach H, Monat C, Lux T, Kamal N, Lang D, Himmelbach A, et al. 2020.** The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* **588**: 284–289.
- Kosambi DD. 1943.** THE ESTIMATION OF MAP DISTANCES FROM RECOMBINATION VALUES. *Annals of Eugenics* **12**: 172–175.
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA. 2009.** Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research* **19**: 1639–1645.
- Książczyk T, Kovarik A, Eber F, Huteau V, Khaitova L, Tesarikova Z, Coriton O, Chèvre A-M. 2011.** Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploid species *Brassica napus*. *Chromosoma* **120**: 557–571.
- Leflon M, Eber F, Letanneur JC, Chelysheva L, Coriton O, Huteau V, Ryder CD, Barker G, Jenczewski E, Chèvre AM. 2006.** Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) × *Brassica napus* (AACC) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 1467–1480.
- Leflon M, Grandont L, Eber F, Huteau V, Coriton O, Chelysheva L, Jenczewski E, Chevre A-M. 2010.** Crossovers Get a Boost in Brassica Allotriploid and Allotetraploid Hybrids. *the Plant Cell Online* **22**: 2253–2264.
- Lian Q, Solier V, Walkemeier B, Durand S, Huettel B, Schneeberger K, Mercier R. 2022.** The megabase-scale crossover landscape is largely independent of sequence divergence. *Nat Communications* **13**(1):3828.
- de Maagd RA, Loonen A, Chouaref J, Pelé A, Meijer-Dekens F, Fransz P, Bai Y. 2020.** CRISPR/Cas inactivation of RECQ4 increases homeologous crossovers in an interspecific tomato hybrid. *Plant Biotechnology Journal* **18**: 805–813.
- Melamed-bessudo C, Levy AA. 2012.** Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in *Arabidopsis*. *PNAS* **109**.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015.** The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 297–327.
- Mieulet D, Aubert G, Bres C, Klein A, Droc G, Vieille E, Rond-coissieux C, Sanchez M, Dalmais M, Mauxion J, et al. 2018.** Unleashing meiotic crossovers in crops. *Nature Plants* **4**.
- Park HR, Park JE, Kim JH, Shin H, Yu SH, Son S, Yi G, Lee SS, Kim HH, Huh JH. 2020.** Meiotic Chromosome Stability and Suppression of Crossover Between Non-homologous Chromosomes in xBrassicoraphanus, an Intergeneric Allotetraploid Derived From a Cross Between *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–12.
- Parker JS. 1975.** Chromosome-specific control of chiasma formation. *Chromosoma* **49**.
- Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy AA, Scheid OM. 2011.** Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biology* **9**: 24.



- Pelé A, Falque M, Trotoux G, Eber F, Nègre S, Gilet M, Huteau V, Lodé M, Jousseume T, Dechaumet S, et al. 2017.** Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in Brassicas (K Bomblies, Ed.). *PLOS Genetics* **13**: e1006794.
- Rousseau-Gueutin M, Belser C, Da Silva C, Richard G, Istace B, Cruaud C, Falentin C, Boideau F, Boutte J, Delourme R, et al. 2020.** Long-read assembly of the Brassica napus reference genome Darmor-bzh. *GigaScience* **9**: 1–16.
- Rowan BA, Heavens D, Feuerborn TR, Tock AJ, Henderson IR, Weigel D. 2019.** An Ultra High-Density Arabidopsis thaliana Crossover Map That Refines the Influences of Structural Variation and Epigenetic Features. *Genetics* **213**: 771–787.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. 2012.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.
- Schmidt C, Fransz P, Rönspies M, Dreissig S, Fuchs J, Heckmann S, Houben A, Puchta H. 2020.** Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* **11**: 1–8.
- Séguéla-Arnaud M, Crismani W, Larchevêque C, Mazel J, Froger N, Choinard S, Lemhemdi A, Macaisne N, Van Leene J, Gevaert K, et al. 2015.** Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 $\alpha$  and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 4713–4718.
- Serra H, Da Ines O, Degroote F, Gallego ME, White CI. 2013.** Roles of XRCC2, RAD51B and RAD51D in RAD51-Independent SSA Recombination. *PLOS Genetics* **9**: e1003971.
- Serra H, Lambing C, Griffin CH, Topp SD, Nageswaran DC, Underwood CJ, Ziolkowski PA, Séguéla-Arnaud M, Fernandes JB, Mercier R, et al. 2018.** Massive crossover elevation via combination of HEI10 and recq4a recq4b during Arabidopsis meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 2437–2442.
- Tease C, Jones GH. 1976.** Chromosome-specific control of chiasma formation in *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **57**: 33–49.
- Tourrette E, Falque M, Martin OC. 2021.** Enhancing backcross programs through increased recombination. *Genetics Selection Evolution* **53**.
- Underwood CJ, Choi K, Lambing C, Zhao X, Serra H, Borges F, Simorowski J, Ernst E, Jacob Y, Henderson IR, et al. 2018.** Epigenetic activation of meiotic recombination near Arabidopsis thaliana centromeres via loss of H3K9me2 and non-CG DNA methylation. *Genome research* **28**.
- Wan H, Li J, Ma S, Yang F, Chai L, Liu Z, Wang Q, Pu Z, Yang W. 2021.** Allopolyploidization increases genetic recombination in the ancestral diploid D genome during wheat evolution. *Crop Journal*.
- Wang Y, Copenhaver GP. 2018.** Meiotic Recombination : Mixing It Up in Plants.
- Wang J, Lin M, Crenshaw A, Hutchinson A, Hicks B, Yeager M, Berndt S, Huang W-Y, Hayes RB, Chanock SJ, et al. 2009.** High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics* **10**: 561.



**Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, Miller N, Drouaud J, Grelon M, Copenhaver GP, et al. 2012.** Epigenetic Remodeling of Meiotic Crossover Frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA Methyltransferase Mutants. *PLoS Genetics* **8**.

**Yelina NE, Lambing C, Hardcastle TJ, Zhao X, Santos B, Henderson IR. 2015.** DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **29**: 2183–2202.

**Zhang L, Cai X, Wu J, Liu M, Grob S, Cheng F, Liang J, Cai C, Liu Z, Liu B, et al. 2018.** Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies. *Horticulture Research* **5**.

**Ziolkowski PA, Berchowitz LE, Lambing C, Yelina NE, Zhao X, Kelly KA, Choi K, Ziolkowska L, June V, Sanchez-Moran E, et al. 2015.** Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during *Arabidopsis* meiosis. *eLife* **4**.

**Ziolkowski PA, Underwood CJ, Lambing C, Martinez-Garcia M, Lawrence EJ, Ziolkowska L, Griffin C, Choi K, Franklin FCH, Martienssen RA, et al. 2017.** Natural variation and dosage of the HEI10 meiotic E3 ligase control *Arabidopsis* crossover recombination. *Genes & Development* **31**: 306–317.



### III. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence que les modifications du profil de recombinaison observées chez un allotriploïde AAC pouvaient être maintenues si la structure est également AAC en seconde génération. Lorsqu'une structure AACC est retrouvée en seconde génération après un passage par la voie allotriploïde AAC, il y a un retour à la normale de la régulation de la recombinaison. Ces deux résultats permettent donc de conforter l'hypothèse que c'est bien la structure particulière AAC qui est responsable de la modification des règles de la recombinaison.

De manière surprenante, les hybrides B1F1 présentent plus de recombinaison que les hybrides F1, à niveau de ploïdie similaire. Cela est peut-être en lien avec le phénomène de juxtaposition. La présence d'une ou deux régions homozygotes à côté d'une région hétérozygote semble corréluer avec une augmentation de la fréquence de recombinaison dans cette dernière région. Cela suggère qu'il existe un effet de juxtaposition homozygote-hétérozygote chez les *Brassica*, comme démontré chez *Arabidopsis* (Ziolkowski et al. 2015).

Bien que les hybrides AAC présentent une modification de la régulation de la recombinaison, leur prophase de méiose se déroule normalement, les différentes phases étant identifiables chez l'ensemble des hybrides et similaire à celles des euploïdes (Figure 1). De la même manière, le fait que la moitié du génome est présent sous forme hétérozygote ne semble pas impacter la réalisation des différents stades de la prophase chez les hybrides B1F1.

Ce chapitre correspond à la première version d'un manuscrit que nous n'avons pas encore soumis. Plusieurs analyses restent à finaliser. Nous allons réaliser de l'immunomarquage de la protéine HEI10 sur les chromosomes de l'hybride 4x-B1F1<sup>4x</sup>, afin de déterminer si la faible augmentation de COs observée en comparaison avec les observations faites sur le parent 4x-F1 est associée à une augmentation des COs de classe I ou s'il s'agit d'une redistribution des COs vers les régions hétérozygotes. Nous allons également étudier l'effet du polymorphisme SNP sur la variabilité de la recombinaison au sein des régions hétérozygotes de chaque hybride B1F1. Pour compléter l'étude de l'effet de juxtaposition, nous allons finaliser la cartographie du génome C et conduire les mêmes analyses. Enfin, nous évaluerons l'évolution de l'interférence dans les différents hybrides par modélisation à partir des données de génotypage.

L'ensemble de ces résultats présentent une étude globale du lien entre le changement de niveau de ploïdie et de la recombinaison à l'échelle du génome et des chromosomes. Cependant, à une échelle beaucoup plus locale, des facteurs peuvent modifier la distribution de la recombinaison le long des chromosomes, tel que le polymorphisme de séquence ou la présence de réarrangements structuraux ou encore la méthylation de l'ADN.





**Chapitre IV : Impact de la méthylation de  
l'ADN et des variations structurales sur le profil  
de recombinaison du colza *Brassica napus***



## Chapitre IV : Impact de la méthylation de l'ADN et des variations structurales sur le profil de recombinaison du colza *Brassica napus*

### **I. Introduction**


A l'échelle du chromosome, la recombinaison a lieu préférentiellement dans les régions distales des chromosomes, loin des centromères, comme par exemple chez l'humain (Myers et al. 2005) ou encore le blé (Raz et al. 2021). A une échelle beaucoup plus fine, la méthylation de l'ADN est capable d'inhiber la formation de COs, comme démontré chez *Arabidopsis* (Yelina et al. 2012). En effet, la méthylation d'une région correspondant à un hotspot de recombinaison est capable d'induire une diminution drastique du nombre de COs dans cet intervalle. De même, les variations structurales sont également capables d'inhiber la formation de COs lorsqu'elles sont présentes à l'état hétérozygote au sein d'un hybride (Rowan et al. 2019), les variants structuraux ayant le plus fort impact sur la recombinaison étant les inversions chromosomiques (Rowan et al. 2019). La présence de COs dans ces régions est à l'origine de gamètes non viables ou peu fertiles du fait de la présence de chromosomes dicentriques ou acentriques dans le cas d'inversions paracentriques ou présentant des duplications et des délétions dans le cas d'inversion péricentriques (Huang & Rieseberg, 2020).

Cependant, le rôle de la méthylation de l'ADN et des variations structurales sur le profil global de recombinaison chez le colza *Brassica napus* reste à déterminer. Ce type d'étude est désormais possible et plus aisé grâce à la présence de plusieurs génomes assemblés chez cette espèce et à la réduction des coûts de séquençage à haut débit. Nous avons donc étudié ces éléments chez deux types de colza, un hybride F1 semi-synthétique issu du croisement entre un colza cultivé et un colza resynthétisé et un hybride F1 issu du croisement entre deux colzas cultivés, ces deux hybrides F1 ayant un parent commun. Nous avons eu la possibilité de publier ces résultats dans la revue *New Phytologist* en 2022.

### **II. Epigenomic and structural events preclude recombination in *Brassica napus***



# Epigenomic and structural events preclude recombination in *Brassica napus*

Franz Boideau<sup>1\*</sup> , Gautier Richard<sup>1\*</sup> , Olivier Coriton<sup>1</sup> , Virginie Huteau<sup>1</sup>, Caroline Belser<sup>2</sup> ,  
Gwenaelle Deniot<sup>1</sup>, Frédérique Eber<sup>1</sup>, Cyril Falentin<sup>1</sup> , Julie Ferreira de Carvalho<sup>1</sup> , Marie Gilet<sup>1</sup>,  
Maryse Lodé-Taburel<sup>1</sup>, Loeiz Maillat<sup>1</sup> , Jérôme Morice<sup>1</sup>, Gwenn Trotoux<sup>1</sup>, Jean-Marc Aury<sup>2</sup> ,  
Anne-Marie Chèvre<sup>1</sup>  and Mathieu Rousseau-Gueutin<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, Le Rheu 35653, France; <sup>2</sup>Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Université Evry, Université Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Crémieux, Evry 91057, France

## Summary

Author for correspondence:  
Mathieu Rousseau-Gueutin  
Email: mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr

Received: 8 October 2021  
Accepted: 15 January 2022

New Phytologist (2022)  
doi: 10.1111/nph.18004

**Key words:** *Brassica napus*, chromosome inversion, DNA methylation, oligo-FISH, recombination.

- Meiotic recombination is a major evolutionary process generating genetic diversity at each generation in sexual organisms. However, this process is highly regulated, with the majority of crossovers lying in the distal chromosomal regions that harbor low DNA methylation levels. Even in these regions, some islands without recombination remain, for which we investigated the underlying causes.
- Genetic maps were established in two *Brassica napus* hybrids to detect the presence of such large nonrecombinant islands. The role played by DNA methylation and structural variations in this local absence of recombination was determined by performing bisulfite sequencing and whole genome comparisons. Inferred structural variations were validated using either optical mapping or oligo fluorescence *in situ* hybridization.
- Hypermethylated or inverted regions between *Brassica* genomes were associated with the absence of recombination. Pairwise comparisons of nine *B. napus* genome assemblies revealed that such inversions occur frequently and may contain key agronomic genes such as resistance to biotic stresses.
- We conclude that such islands without recombination can have different origins, such as DNA methylation or structural variations in *B. napus*. It is thus essential to take into account these features in breeding programs as they may hamper the efficient combination of favorable alleles in elite varieties.

## Introduction

Crop improvement relies on the exchange of genetic information between chromosomes to produce novel favorable gene combinations in the progeny (Moose & Mumm, 2008). This phenomenon occurs during meiosis, a specialized cell division resulting in gamete formation, during which crossovers (COs) are formed. In plants, this process is highly regulated, both in frequency and in distribution, with one obligatory (and rarely more than three) CO between each pair of homologous chromosomes to ensure proper chromosome segregation (Mercier *et al.*, 2015; Mézard *et al.*, 2015). CO distribution is regulated at the chromosome level but also locally along chromosome arms, with a gradient from telomeres to centromeres. Indeed, COs are prevented around centromeres, which present a high level of DNA methylation, of H3K9me2 histone mark (Choulet *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019), and where kinetochores attach to spindle microtubules to allow chromosome segregation (Underwood *et al.*, 2018).

Conversely, COs are concentrated in distal euchromatic regions (Marand *et al.*, 2017; Dreissig *et al.*, 2019; Raz *et al.*, 2021), but where local islands without recombination have been observed, and which can notably be explained by the local DNA methylation status or structural variations (SVs). For instance, targeted DNA methylation of a CO hotspot in the euchromatic region of *Arabidopsis thaliana* was shown to significantly decrease the formation of COs, highlighting the role played by DNA methylation level on recombination (Yelina *et al.*, 2015). Similarly, recent and highly methylated retrotransposon clusters of some maize lines were shown to greatly reduce recombination at the heterozygous state (Dooner & He, 2008). In these regions, the highly condensed chromatin state partially resulting from cytosine methylation are hypothesized to interfere with access of the recombination machinery in the adjacent gene-carrying euchromatic regions (He & Dooner, 2009). Besides methylation, SVs, such as presence/absence variations (PAVs), translocations or inversions, have also been shown to locally preclude recombination (Rowan *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2020). Sturtevant

\*These authors contributed equally to this work.

(1921, 1926) was the first to propose and experimentally test that structural rearrangements, such as inversions, could be at the origin of CO suppression in *Drosophila*. Indeed, recombination in heterozygous chromosomal inversions may lead to the generation of unbalanced gametes or chromosomes lacking some genomic regions, leading to the production of lethal or less fit embryos (Sybenga, 1975). The detection of inversions is now easier as *de novo* genome assemblies or pangenome have become recently available in many species, as exemplified in *Brassica* (Song *et al.*, 2020), wheat (Walkowiak *et al.*, 2020), barley (Jayakodi *et al.*, 2020) or *Arabidopsis* (Jiao & Schneeberger, 2020). In these two latter species, similar impacts of inversion on recombination were observed (Alonso-Blanco *et al.*, 2016; Franz *et al.*, 2016; Jayakodi *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2020). The drastic decrease of COs within inversions can be an obstacle to breeders but can also promote speciation. Indeed, large SVs may disrupt the course of meiosis leading to a decrease of hybrid fertility, and inducing reproductive isolation, thus promoting speciation, as exemplified in sunflower (Rieseberg, 2001) and *Drosophila* (Fuller *et al.*, 2018).

*Brassica napus* (AACC,  $2n=4x=38$ ) is the second most produced oleaginous crop worldwide. It was formed about 7500 yr ago (Chalhoub *et al.*, 2014) via the interspecific hybridization and genome doubling of *B. rapa* (AA,  $2n=2x=20$ ) and *B. oleracea* (CC,  $2n=2x=18$ ) (Nagaharu, 1935). Due to the small number of allopolyploid founder events at the origin of the *B. napus* species (Allender & King, 2010), as well as the intensive agronomic selection for essential seed quality traits during the last 60 yr of breeding (Qian *et al.*, 2014), *B. napus* genetic diversity has been severely eroded. Nevertheless, the recent genome assemblies of several varieties (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020) as well as pangenome studies revealed the presence of an important number of SVs at the origin of phenotypic diversities (Hurgobin *et al.*, 2018). Notably, it was observed that several of these SVs were impacting major agronomic traits, such as resistance to biotic stresses and seed quality (Zhao *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2017; Kittipol *et al.*, 2019). It is thus crucial to increase our understanding of the impact of these SVs on recombination and on limiting *B. napus* breeding.

In this paper, we studied the recombination landscape of two *B. napus* hybrids and focused on the identification of nine large nonpericentromeric regions (> 1 Mb) devoid of COs. These non-recombinant regions ranged from 1.0 to 3.5 Mb, each of them containing several hundred genes (Belser *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020). Taking advantage of the whole genome assembly of the parental lines of one of these two hybrids, we aimed to unravel the importance of methylation and SVs on the lack of recombination in these large nonpericentromeric regions. We first used whole genome bisulfite sequencing (BS-seq) on the two parental lines and observed that hypermethylation was associated with recombination suppression in some regions. We also inspected in detail and compared these regions using available genome assemblies of the parental lines to detect the presence of SVs, such as PAVs or inversions. We infer that two inversions were at the origin of the absence of recombination for two regions. We validated the existence of these two

large heterozygous paracentric inversions by either oligo fluorescence *in situ* hybridization (oligo-FISH) or optical mapping. To determine if such large inverted regions were common in *B. napus* and to what extent it could hamper breeding strategies, we performed pairwise genome comparisons between nine currently available high-quality *B. napus* genomes (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020). For the identified large inverted regions, we determined the number of resistance genes in order to assess how such SVs may impact the combination of these alleles of interest within elite varieties. Finally, we discuss the importance of considering all these recombination suppression factors in breeding programs.

## Materials and Methods

### Plant material

Two *B. napus* populations were used in this study. The first population, hereafter referred to as DY, derives from the cross of *B. napus* L. cv. Darmor-bzh ( $A_nA_nC_nC_n$ ) (female) with *B. napus* L. cv. Yudal ( $A_nA_nC_nC_n$ ) and is a doubled haploid population produced from a single F<sub>1</sub> hybrid DY ( $A_nA_nC_nC_n$ ) plant (Foisset *et al.*, 1997). To generate the second population, hereafter named DChEM, we performed a cross between *B. napus* L. cv. Darmor ( $A_nA_nC_nC_n$ ) (female) with the *B. napus* resynthesized line referred as ChEM. This latter line was obtained by crossing the Chinese cabbage *B. rapa* cv. Chiifu (accession Chiifu-401-42,  $A_rA_r$ ) with *B. oleracea* cv. HDEM ( $C_oC_o$ ), for which spontaneous chromosome doubling occurred. The F<sub>1</sub> hybrid ( $A_nA_rC_nC_o$ ) resulting from the cross between *B. napus* L. cv. Darmor and ChEM was thereafter backcrossed to *B. napus* L. cv. Darmor to generate the DChEM population, containing 215 plants (Supporting Information Fig. S1).

### Genetic maps

To establish the genetic maps, DNA extraction and single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping were performed on the two populations. For the DY population, genotyping data were previously obtained using the Brassica 60K Illumina Infinium SNP array (Kumar *et al.*, 2018). For the DChEM population, young leaves from 215 plants (plus parental lines and F<sub>1</sub> hybrid) were frozen and then lyophilized. DNA was then extracted using the beadex maxi plant kit (LGC Genomics, Teddington, UK) on the oKtopure robot at the GENTYANE platform (INRAE, Clermont-Ferrand, France). For the DChEM population, genotyping data were obtained using the Brassica 15K Illumina Infinium SNP array (TraitGenetics, Gatersleben, Germany) that consists of a subset of the 60K array. The raw genotyping data were analyzed using GENOME STUDIO v.2011.1 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) processed with the auto-clustering option and validated manually. To construct the genetic maps for each segregating population, we first selected the codominant markers that were polymorphic between the parental lines (i.e. AA vs BB or BB vs AA) and heterozygous in the F<sub>1</sub> hybrid (AB). Only the polymorphic markers in both

populations were kept to perform comparative genetic mapping. We first genetically mapped the markers using CARTHAGENE software (v.1.2.3, LOD threshold = 4, distance threshold = 0.3, de Givry *et al.*, 2005) and determined their physical localization by blasting their context sequences against the reference genome *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020). This step allowed us to discard a few markers showing discordant genetic and physical positions (Table S1). Finally, we imposed the marker physical order to produce the genetic maps using CARTHAGENE software. The genetic distance (in cM) between linked SNP markers was evaluated using the Kosambi function (Kosambi, 1943) (Table S2). For all chromosomal regions outside the defined pericentromeric regions, we searched for large regions lacking recombination (> 1 Mb) and containing a minimum of three SNPs per Mb.

### Inference of pericentromeric regions in *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 genome

To study the impact of genome organization on the distribution of recombination, we defined the centromeric and pericentromeric regions on *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) (Table S3). Centromeric regions were determined using the method described in Zhang *et al.* (2018) and Istace *et al.* (2021). Briefly, we retrieved the localization of the centromeric-specific repeat sequences using BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) and a cutoff of one-third of the maximal density identified on the chromosome. Thereafter, we defined the pericentromeres as regions flanking the centromere and with a gene density below the chromosome average, as described in Yelina *et al.* (2012). For chromosomes A07, C03, C07 and C08, one border was visually defined using the local maximum of the chromosomal arm, when the chromosomal average gene density of one arm was below the chromosomal average. The remaining parts of the chromosome arms were defined as nonpericentromeric regions.

### Evaluation of DNA methylation levels by BS-seq

Plants were grown in a growth chamber with a photoperiod of 16 h per day. Young leaves from *B. napus* cv. Darmor, *B. rapa* cv. Chiifu and *B. oleracea* cv. HDEM were collected and flash frozen. DNA was extracted using the Macherey-Nagel (Düren, Germany) NucleoSpin Plant II kit. Bisulfite conversion was performed using the EZ DNA Methylation-Gold kit from Zymo research (Irvine, CA, USA). Libraries were generated by using the Swift Bioscience (Ann Arbor, MI, USA) Accel-NGS Methyl-Seq DNA library kit on treated DNA, and 150 bp paired-end sequencing was performed on a HiSeq 4000 platform at the Genewiz facility (Genewiz, La Jolla, CA, USA). Fastq file processing was performed using the SNAKEPIPES v.2.0.1 WGBS pipeline. Briefly, the reads were trimmed using FASTP v.0.20.0 with the following custom parameters: '-q 5 -l 30 -M 5 --trim\_front2 14 --trim\_front1 14' and the library quality was analyzed using FASTQC v.0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Reads were then mapped using BWAMETH v.0.2.2 (<https://github.com/brentp/bwa-meth>)

to the following reference genomes depending on the sequenced genotype: *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020), *B. rapa* cv. Chiifu v3 (Zhang *et al.*, 2018) and *B. oleracea* cv. HDEM (Belser *et al.*, 2018). Duplicated reads were flagged and further ignored using SAMBAMBA v.0.7.2. Mapping and library quality metrics were summarized using MULTQC v.1.8. Methylation bias was corrected and the methylation level in the CpG context was extracted using METHYLDAKEL v.0.5.0 (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). The average methylation level in 1 kb windows along the three genomes was then calculated using a custom bash script. Additionally, reads were aligned to the *B. napus* chloroplast genome (Hu *et al.*, 2011) to assess the cytosine conversion rate on nonmethylated DNA using the same method as described above.

### Estimating methylation levels of nonpericentromeric regions lacking recombination using bootstrapping

We compared the mean CpG level and its variance between nonrecombinant genomic regions with random genomic regions on the same chromosome, by first defining the coordinates of 100 random noncentromeric regions for each of the six nonrecombinant regions in the three genome assemblies using BEDTOOLS SHUFFLE v.2.29.2 with the following optional parameters: '-excl centromeres.bed -chrom'. We then extracted the distribution of CpG methylation level in 1 kb windows along the random and nonrecombinant regions using BEDTOOLS INTERSECT. We then estimated the methylation variance using the BOOT R package (Davison & Hinkley, 1997) to calculate the 95% confidence interval of the CpG methylation level in each region after 500 bootstraps. Each bootstrap corresponds to a sampling with replacement of  $n$  values ( $n$  corresponding to the number of 1 kb windows overlapping the region of interest), followed by computation of the mean of the  $n$  sampled CpG methylation values. The distributions of the 500 bootstrapped means were then compared between the target nonrecombinant region and its associated 100 random regions by calculating for each comparison a  $Z$ -score. For each nonrecombinant region, the 100  $Z$ -scores were converted to  $P$ -values using the two-tailed pnorm test in R, assuming the  $Z$ -scores follow a normal distribution, followed by Bonferroni correction for multiple comparisons. The adjusted  $P$ -values are displayed on Fig. 2(c,d), top rows on the  $y$ -axis. To estimate if the nonrecombinant regions are hypomethylated or hypermethylated compared to the noncentromeric random regions of the chromosome, we calculated the proportion of random regions for which the nonrecombinant region is similarly methylated, hypomethylated or hypermethylated and performed a one-sided multiple test of equality of proportions without continuity correction using the R prop.test function. The same analyses were made in the CHG and CHH contexts.

### Identification of putative large chromosomal inversions

To determine if the absence of recombination in certain genomic regions may result from chromosomal inversions between parental lines, we aligned and compared each *B. napus* cv.



Darmor A chromosome (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) with those of *B. rapa* cv. Chiifu (Zhang *et al.*, 2018), as well as each *B. napus* cv. Darmor C chromosome with those of *B. oleracea* cv. HDEM (Belser *et al.*, 2018) using NUCMER (Kurtz *et al.*, 2004). The resulting whole genome alignments were filtered to remove spurious and low-identity alignments using the delta-filter tool with a minimum identity of 95% and a minimum alignment block length of 10 kb, followed by further filtering during the MUMMERPLOT step. The alignment coordinates obtained in both genomes were converted to a tab-delimited file using show-coords from MUMMER, which was then parsed to keep only the inverted synteny blocks aligning on the same chromosomes. The obtained small inverted synteny block coordinates were iteratively merged by BEDTOOLS MERGE and then size-selected to keep only large inversions of at least 1 Mb. All the command lines (including details for installation and method description) and parameters used for this analysis are available in the following github repository: <https://github.com/gtrichard/InversionFinder>. Given a list of genomes, the SNAKEMAKE pipeline INVERSIONSFINDER performs the above-described tasks to automatically retrieve large inversions between two genomes. Additionally, INVERSIONSFINDER was used to identify putative large inversions between nine *B. napus* genomes (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020).

#### Validation of rearrangements using optical maps and cytogenetics

The presence of inverted regions in two nonpericentromeric regions lacking recombination in our DChEM hybrid was tested using different experimental approaches: comparative optical mapping and oligo-FISH.

**Comparative optical mapping** The previously generated optical molecules of *B. oleracea* cv. HDEM (Belser *et al.*, 2018) were assembled thanks to the BIONANO GENOMICS (BNG, San Diego, CA, USA) software (BIONANO SOLVE and TOOLS v.1.6.1) using the following options: 'add pre-assembly' and 'non haplotype without extend and split'. The *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 genome (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) was *in silico* digested with the enzyme DLE-1 and used as reference. Structural variations were detected using the BNG assembly pipeline and by aligning the *B. oleracea* HDEM DLE-1 optical map against the reference.

**Oligo-FISH** Oligo-FISH was performed to physically visualize and test the presence of an inversion on the A10 chromosome between *B. napus* cv. Darmor and *B. rapa* cv. Chiifu. For this, two oligo probe libraries (1 and 2) overlapping and extending outside the inverted regions were designed by Arbor Biosciences (Ann Arbor, MI, USA) using the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 assembly and their proprietary software. The coordinates of the A10 target region were 17 713 848–18 826 398 (probe 1) and 18 826 398–20 021 286 (probe 2). Probe libraries 1 and 2 contained 6934 and 6784 oligos of 45 nucleotides, labeled with ATTO 594 (red fluorescence) and Alexa 488 (green fluorescence), respectively. The physical localizations of the different oligos used for each probe were determined on either *B. napus* cv.

Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) or *B. rapa* cv. Chiifu v3 (Zhang *et al.*, 2018) genomes using BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) and graphically represented using IGV (Robinson *et al.*, 2011). FISH with chromosome-specific oligo probes was performed on pachytene chromosomes, as previously described (Boutte *et al.*, 2020). Fluorescence images were captured using an ORCA-Flash4 (Hamamatsu, Japan) on an Axioplan 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed using ZEN software (v.2.6, Carl Zeiss).

#### Identification of resistance genes analogs

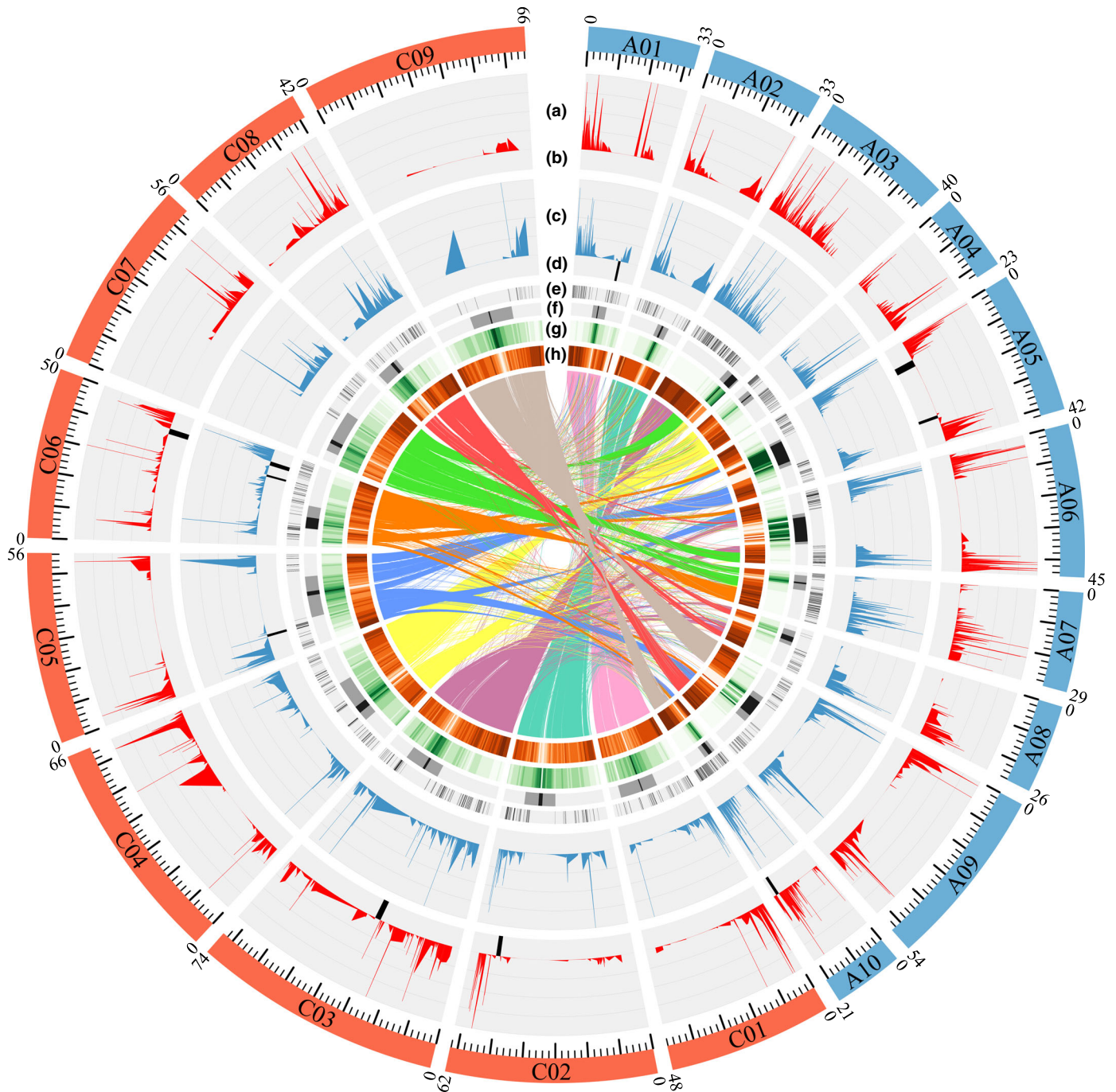
To estimate the impact of inversion on the introgression of genes involved in the resistance to biotic stresses, we first identified resistance genes analogs (RGAs) in nine *B. napus* assembled genomes (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020) using RGAUGURY (commit 57d58f887ad8c70e5d4c619a3d5e207158822819; Li *et al.*, 2016; Table S4). The parameters used were as follows: 'RGAugury.pl -p {peptides.fa} -e 1e-5 -c 10 -pfx {output}'. Briefly, this pipeline identifies the different major RGA families (NBS encoding; RLP: membrane-associated receptor-like proteins; RLK: surface-localized receptor-like protein kinases) on the basis of the presence or absence of some domain structures (CC: coiled-coil; TIR: Toll/interleukin 1 receptor; NB-ARC: nucleotide binding site activity regulated cytoskeleton; LRR: leucine-rich repeat). Thereafter, we determined the presence of some of these RGAs within the inverted regions previously identified using INVERSIONFINDER.

## Results

#### Identification of large nonpericentromeric regions devoid of recombination

The meiotic recombination landscape was studied in two *B. napus* populations of 215 individuals (DChEM and DY) sharing one common parent using genotyping data obtained from the 15 K and 60 K Illumina arrays. We found 5370 and 13 781 polymorphic SNPs for the DChEM and DY populations, respectively. Within these polymorphic markers, 2423 were common between the two populations and 1961 SNP were successfully localized on the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 assembly chromosomes (Fig. 1e). This latter set of common SNPs was used to construct and compare the genetic maps of the two F<sub>1</sub> hybrids (genotyping data available in Table S1). Most of the 1961 polymorphic SNPs (86.9%) were present in the nonpericentromeric regions (Fig. 1e,f), corresponding to an average physical distance between two SNPs of 267 kb in these latter regions.

Using the SNP dataset described above, we established the DChEM and DY genetic maps (Fig. 1a,c). The accumulated genetic lengths were of 1486.5 and 1772.4 cM with a mean distance of 0.7654 and 0.9127 cM per SNP for the DChEM and DY genetic maps, respectively. Similarly, we observed a slight but significantly higher number of COs (1.2×) in DY compared to DChEM (3765 vs 3172; chi-squared test,  $P=3.78e-13$ ). However, at the chromosome level, the two genetic maps showed no



**Fig. 1** Graphical representation using CIRCOS of the recombination landscape in two *Brassica napus* populations. The *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 chromosomes (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) belonging to the A and C subgenomes are shown in blue and red, respectively. On the first and third circles are presented the recombination rate (scale from 0 to 25 cM Mb<sup>-1</sup>) determined in *B. napus* DChEM (a) and DY (c) hybrids, respectively. In the second and fourth circles, regions lacking recombination and > 1 Mb are highlighted in black for the DChEM (b) and DY (d) genetic maps, respectively. The fifth circle (e) shows the position of all polymorphic markers used to generate and compare DY and DChEM genetic maps. In the sixth circle (f), the positions of centromeres and pericentromeres are indicated by black and gray rectangles, respectively. On the seventh and last circles are presented the transposable element (TE) density (g) and gene density (h). The central line represents the homoeologous relationships between A and C genes.

significant differences, except for the C02 chromosome (Bonferroni-corrected chi-squared test,  $P=2.1e-04$ ). Correspondingly, when considering intervals between two consecutive SNPs along the entire genome, we did not find any significant differences between the two genetic maps (Bonferroni-corrected

chi-square test,  $P>0.05$ ), indicating a similar distribution of COs between these two maps.

The recombination landscape at the chromosome level presents a U shape, with the higher recombination rates being localized in the nonpericentromeric regions, far from the centromeres

**Table 1** Summary of the nonpericentromeric regions lacking recombination in the two genetic maps.

Species	Genome assembly	Region ID	Chromosome	Start	End	Size (bp)	Number of markers	Genetic map	Genes number	RGA number
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	A05-1	A05	8230 889	10 834 455	2603 566	11	DChEM	359	5
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	A05-2	A05	31 155 636	32 252 633	1096 997	9	DChEM	170	4
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	A10	A10	18 312 403	19 448 225	1135 822	17	DChEM	287	12
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C02	C02	50 934 777	52 559 269	1624 492	7	DChEM	163	4
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C03	C03	31 853 823	34 039 153	2185 330	11	DChEM	235	5
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C06	C06	41 516 838	45 026 273	3509 435	9	DChEM*	478	16
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	A01	A01	2265 2709	23 862 073	1209 364	6	DY	174	2
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C05	C05	13 103 116	14 352 579	1249 463	12	DY	128	0
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C06-1	C06	35 574 799	36 592 931	1018 132	5	DY	136	5
<i>Brassica napus</i>	Darmor-bzh v10	C06-2	C06	41 516 988	43 594 592	2077 604	9	DY*	278	6

\*Similar region.

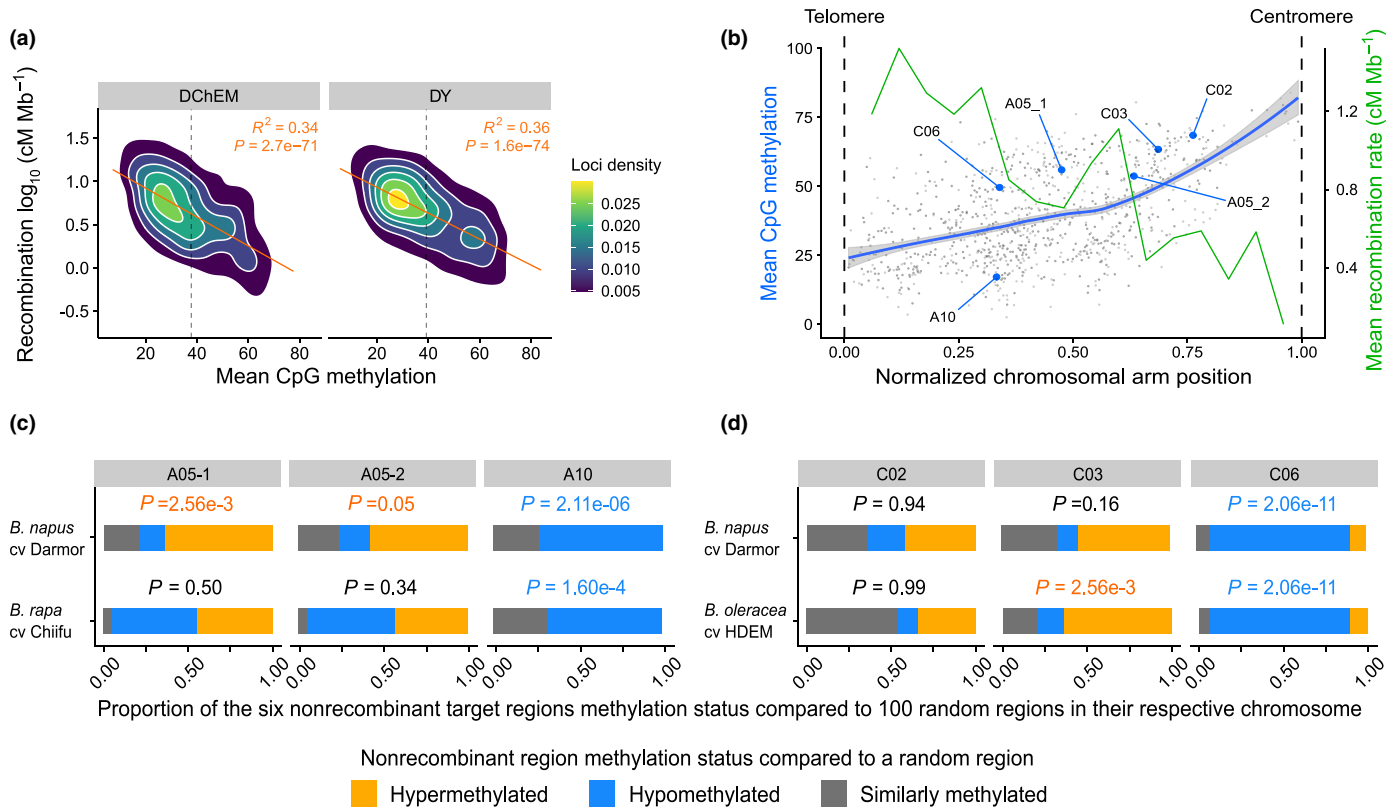
(Fig. 1a,c,f). Indeed, the nonpericentromeric regions of the two studied *B. napus* populations had > 90% of the total recombination in both populations (Table S2). Surprisingly, inside these nonpericentromeric regions, we identified regions larger than 1 Mb and deprived of recombination in one or both genetic maps (Table 1; Fig. 1b,d). Specifically, we detected four regions, one on chromosomes A01 and C05 and two regions on the C06 chromosome for the DY genetic map (Fig. 1d). We also found six regions, one on chromosomes A10, C02, C03 and C06 and two regions on the A05 chromosome for the DChEM genetic map (Fig. 1b), for which we described the genes and repeated elements content (Table S5). These regions are on average 2 Mb long and contained on average 10 polymorphic SNPs (Table 1). From these regions, only one was common to the two genetic maps (C06) totaling nine different regions. For the six regions lacking recombination in DChEM, we used the genome assemblies of the parental lines and looked either at the methylation status or at the presence of putative SVs that may be responsible for the absence of meiotic recombination.

### Some nonrecombinant regions are hypermethylated

To determine if high levels of CpG methylation may explain the absence of recombination in the six nonpericentromeric regions in the DChEM genetic map (Table 1), we performed BS-seq using young leaves of *B. napus* cv. Darmor, *B. rapa* cv. Chiifu and *B. oleracea* cv. HDEM. After controlling the BS-seq library quality (conversion rate > 98.7%, Table S6) and subsequent reads mapping, we found an expected and significant negative correlation between recombination level for both genetic maps and CpG methylation level across the *B. napus* cv. Darmor-bzh genome (Figs 2a, S2). As the methylation status and recombination varies along each chromosome, the position of the six nonrecombinant regions towards centromeres was determined (Fig. 2b). We found that four of the six nonrecombinant regions (A05-1, A05-2, C02 and C03) are close to their respective centromeres (Figs 2b, S2), and also show a high methylation level compared to the genome average at their position (Fig. 2b). To better assess the methylation status of these six nonrecombinant regions compared to their adjacent regions, we compared each of them to a corresponding set of 100 random nonpericentromeric

regions defined in their respective chromosomes, namely A05, A10, C02, C03 and C06. For this analysis, we developed a statistical method based on bootstrapping, followed by computation of Z-scores and corrected P-values for each comparison of the nonrecombinant region to one of the 100 random regions. The nonrecombinant regions have thus been attributed a ‘hypermethylated’, ‘hypomethylated’ or ‘similarly methylated’ status for each comparison in the CpG, CHG and CHH contexts (Figs S3–S6). From this information, we performed a test of proportion to estimate if each nonrecombinant region is ‘hypomethylated’ or ‘hypermethylated’ in the context of its chromosome out of the 100 comparisons, which correspond to the reported P-values hereafter (Figs 2c,d, S4–S6, see the Materials and Methods section). For the A subgenome of *B. napus* cv. Darmor and the *B. rapa* cv. Chiifu genome (Figs 2c, S4, S5 we found that the A05-1 ( $P=2.56e-03$ ) and A05-2 ( $P=0.05$ ) nonrecombinant regions were significantly hypermethylated in the CpG context of the *B. napus* cv. Darmor genome. The A10 region was, however, found to be hypomethylated in both *B. napus* and *B. rapa* genomes in the CpG, CHG and CHH contexts compared to the random nonpericentromeric regions in the same chromosome (lowest P-value of  $2.7e-21$ ). For the C subgenome of *B. napus* cv. Darmor and the *B. oleracea* cv. HDEM genome (Figs 2d, S4–S6), we found that the C03 region lacking recombination was hypermethylated in the CpG and CHG contexts in the *B. oleracea* genome ( $P=2.56e-03$  and  $P=3.3e-08$ , respectively) while the C06 region was hypomethylated in both *B. napus* and *B. oleracea* in the CpG and CHG contexts, as well as in *B. napus* CHH context (Figs 2d, S4–S6) (lowest P-value of  $3.2e-05$ ). Surprisingly, the C02 region was not considered hypermethylated (lowest P-value > 0.9) using our stringent tests, despite its high CpG methylation and its proximity to a centromere (Fig. 2b). It is also surprising to find the C06 region to be hypomethylated despite its high CpG methylation compared to the average (Fig. 2b). This can be attributed to the high methylation level of the whole C02 (median CpG methylation of 90% and a third quartile of 25.1%) and C06 chromosomes compared to other chromosomes in both *B. napus* and *B. oleracea* (Fig. S7). This thus reduces the efficiency of our test for the methylation status of the C02 nonrecombinant region. Alternatively, the absence of recombination may partially be explained by the small DChEM population size. We thus





**Fig. 2** Most nonrecombinant regions display high CpG methylation levels and are physically close to centromeres. (a) Each dot (not shown) represents one locus consisting of one block between two consecutive markers of the DChEM hybrid genetic map and the DY genetic map. The position of one locus in the plot space depends on its recombination level (expressed in  $\log_{10}$  (cM Mb<sup>-1</sup>), y-axis) and on its mean CpG methylation level in *Brassica napus* cv. Darmor-bzh leaves (x-axis). The density of all genomic loci is shown in the plot space (loci density). Dashed vertical lines represent the mean CpG methylation of *B. napus* cv. Darmor-bzh for the plotted loci in each population. (b) Mean CpG methylation and mean recombination rate along the Darmor-bzh 10 size-normalized chromosome arms. Gray dots: mean CpG methylation of all the 1000 bp windows in DChEM population recombinant regions. Blue dots: normalized chromosomal arm position of the six large nonrecombinant regions and their average CpG methylation level in *B. napus* cv. Darmor-bzh. Blue line: modeled methylation level of recombinant regions in the DChEM population by a linear model. Gray area: 95% confidence interval of the linear model. Green line: average recombination frequency (cM) in the DChEM hybrid over windows of 6% of the normalized total size of chromosomes arms. The position of blue dots does not depend on the recombination rate (right y-axis) as they do not present recombination (Table 1). (c, d) Estimation of the methylation status of the six large nonrecombinant loci compared to 100 noncentromeric random regions in their respective chromosome in *B. napus* cv. Darmor-bzh A-subgenome and *B. rapa* cv. Chiifu (c), *B. napus* cv. Darmor-bzh C-subgenome and *B. oleracea* cv. HDEM (d). Each of the six nonrecombinant regions (A05-1, A05-2, A10, C02, C03 and C06) is compared to 100 noncentromeric random regions defined in their respective chromosome, based on the CpG methylation distribution of the regions, using bootstraps (Supporting Information Fig. S1). The displayed *P*-values are calculated using a one-sided multiple test of equality of proportions without continuity correction for hypermethylated (orange) or hypomethylated (blue) status of the nonrecombinant regions out of the 100 comparisons to random regions. If the *P*-value is displayed in black, neither test was significant and the lowest *P*-value is reported.

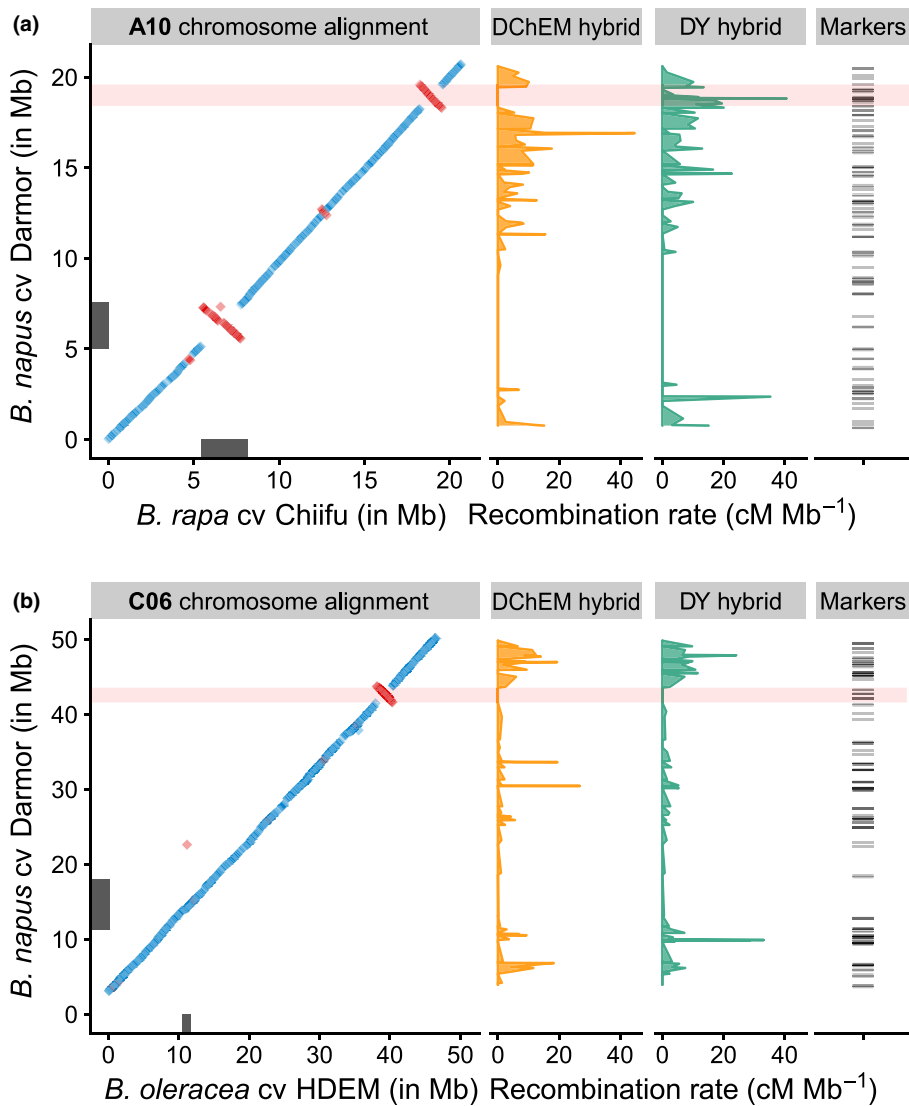
report that three of the six nonrecombinant regions (A05-1, A05-2 and C03) are hypermethylated in at least one genome, that the C02 region is highly methylated and the closest to a pericentromere, and that the A10 and C06 regions are hypomethylated and located far from their associated pericentromere. These results suggest that the high methylation level concurs with the lack of recombination for three to four of the six identified regions.

### The two most distal nonpericentromeric regions lacking recombination contain large inversions

To determine if SVs may explain the lack of recombination in six nonpericentromeric regions of the DChEM population, especially for the two hypomethylated regions (A10 and C06), we

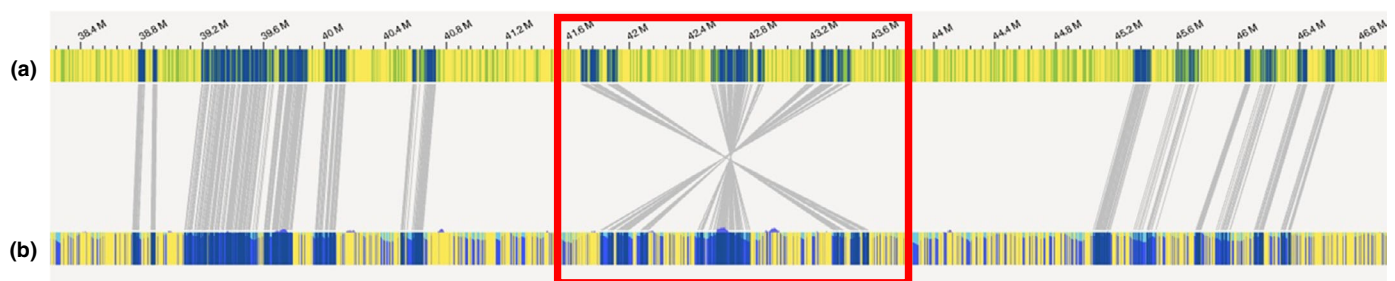
performed genome alignment between the chromosomes of *B. napus* cv. Darmor-bzh and either *B. rapa* cv. Chiifu (for A subgenome) or *B. oleracea* cv. HDEM (for C subgenome). These genome comparisons revealed that the two most distal and hypomethylated regions lacking recombination (A10 and C06) were inverted between the parental lines (Fig. 3; Table S7). Additionally, these analyses did not reveal any large PAV for the other regions lacking recombination (Fig. S8).

To validate that these two putative inversions were not the result of assembly errors, we performed complementary experiments using oligo-FISH and optical mapping results. For the C06 region, we first compared the optical maps previously obtained for *B. napus* cv. Darmor and *B. oleracea* cv. HDEM genome assemblies. The region lacking recombination is localized between 41.5 and 45.0 Mb and the optical map alignment



**Fig. 3** Two nonrecombinant regions overlap with large inversions. (a) A10 nonpericentromeric inverted region lacking recombination in our DChEM hybrid (red). (b) C06 noncentromeric inverted region lacking recombination in both DChEM and DY hybrids (red). Left: whole chromosome alignment of *Brassica napus* cv. Darmor-bzh and *B. rapa* cv. Chiifu A10 chromosomes (a) or whole chromosome alignment of *B. napus* cv. Darmor-bzh with *B. oleracea* cv. HDEM C06 chromosome (b). Each dot represents a large synteny block identified by NUCMER (Kurtz *et al.*, 2004). Syntenic and inverted regions are displayed in blue and red, respectively. Gray blocks near plot axes represent centromeres. Red overshadowed areas represent nonpericentromeric large inversions. Middle: DChEM and DY hybrid recombination rate along the Darmor-bzh genome are displayed in orange and turquoise. Right: position of the polymorphic SNP markers used to identify the crossovers and to estimate the recombination rate.

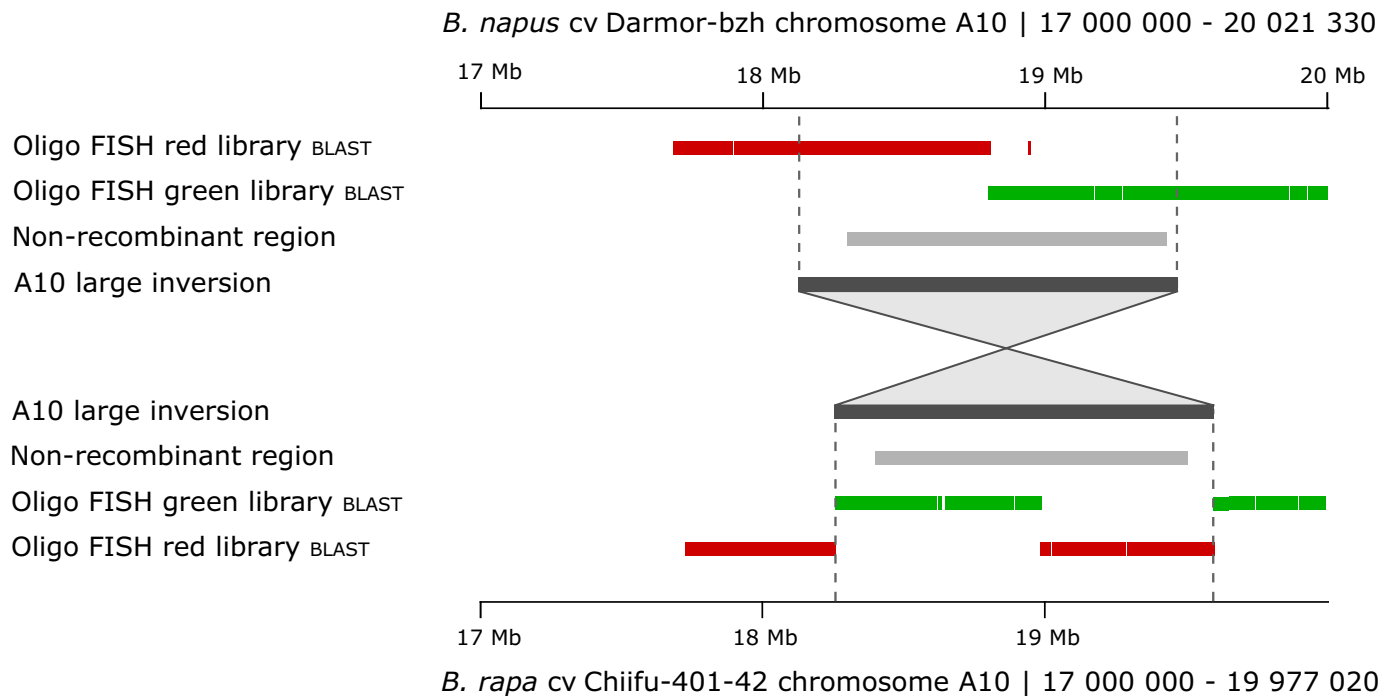
### C06 chromosome



**Fig. 4** C06 DLE-1 optical map alignment of Darmor-bzh and HDEM. The physical positions (in Mb) along the C06 chromosome of Darmor-bzh v10 are indicated at the top. The optical maps of Darmor-bzh (a) and HDEM (b) are displayed and the vertical gray line shows the correspondence between DLE-1 labeled positions (blue regions) of the two optical maps.

revealed a chromosomal inversion inside this region, between 41.6 and 43.6 Mb (Fig. 4). Concerning the A10 region lacking recombination in DChEM, we decided to perform oligo-FISH painting on pachytene chromosomes. More precisely, we

designed two probes (*B. napus* cv. Darmor-bzh v10 as a reference), each one corresponding to a region next to and within the inversion (Fig. 5). Using these two probe libraries, two signals (one red and one green) should be observed in the absence of an



**Fig. 5** Distribution of oligo FISH library probes in the *Brassica napus* cv. Darmor-bzh and *B. rapa* cv. Chiifu genomes. Genomic sequences recognized by the oligo FISH probes were aligned with BLAST to the *B. napus* cv. Darmor-bzh (top) and *B. rapa* cv. Chiifu (bottom) genomes. No off-target regions were detected and the probes were evenly distributed (red and green blocks) around the potential inverted region of the A10 chromosome (dark gray block), comprising the A10 nonrecombinant region (light gray block). Oligo FISH should thus display a constant red–green fluorescence on the *B. napus* A10 chromosome, while a red–green–red–green pattern should be observed on the *B. rapa* A10 chromosome.

inversion (Darmor) whereas four signals (alternation of red–green–red–green) are expected if this region is inverted in Chiifu. As expected, we observed a red region followed by a green region in Darmor (Fig. 6a). Concerning Chiifu or ChEM, we observed an alternation of red–green–red–green regions (Figs 6b, S9), validating that this region is inverted compared to Darmor. Yudal has a similar A10 chromosome structure as Darmor and presents the same red–green signals as Darmor (Fig. 6c), consistent with the pattern observed in the F<sub>1</sub> hybrid DY (Fig. 6d) and the presence of recombination within this region in DY. For the DChEM F<sub>1</sub> hybrid we were able to detect the two parental haplotypes from Darmor and Chiifu (Fig. 6e,f). In 96.2% of the analyzed cells, the two regions were closely coaligned (Fig. 6e); the remaining 3.8% presented an absence of close coalignment between the two parental haplotypes (Fig. 6f), but no inversion loops were observed over the 103 analyzed cells for this F<sub>1</sub> hybrid.

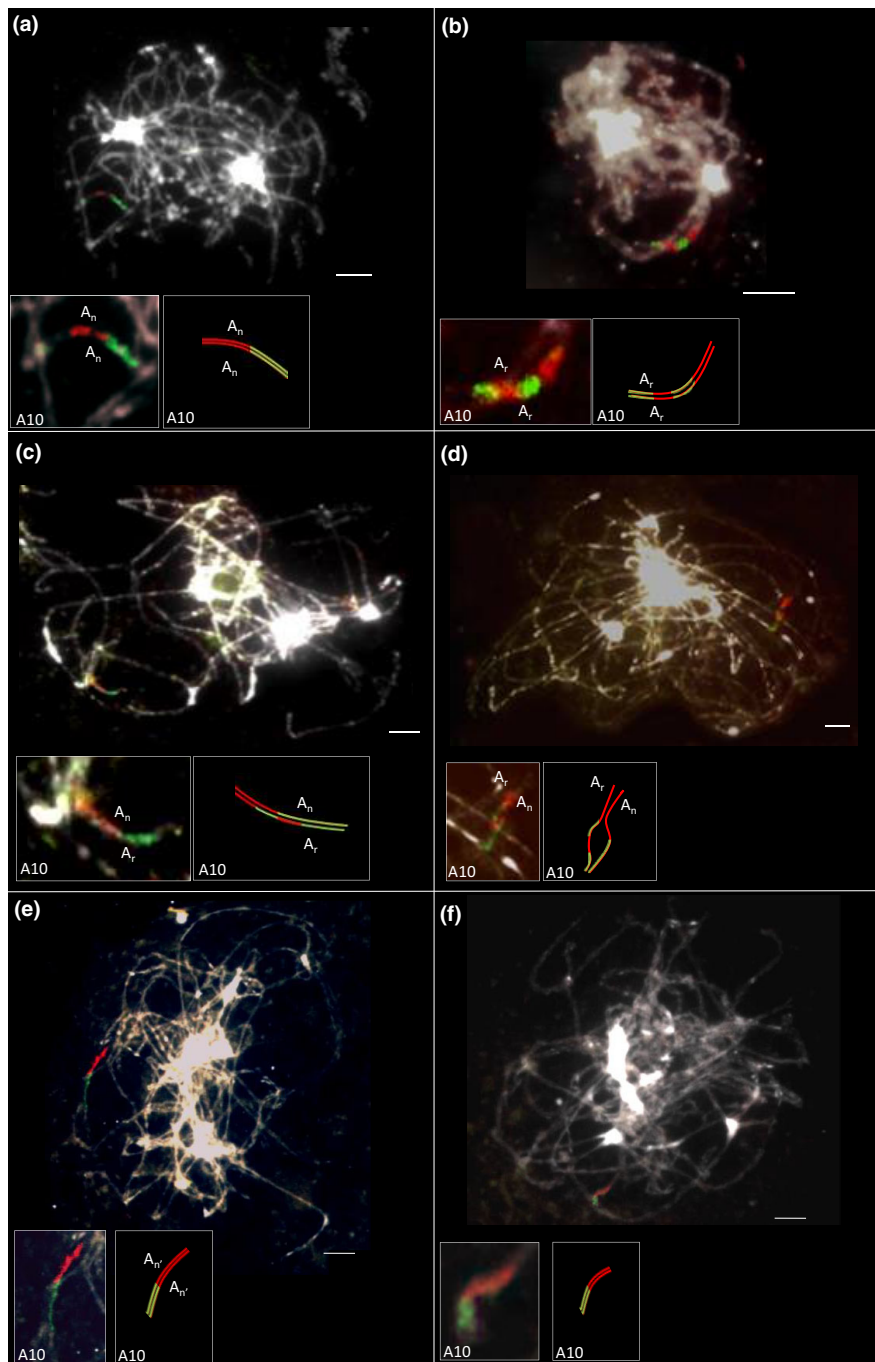
### *Brassica napus* displays numerous inferred inversions accumulated over a short evolutionary time

To determine if inversions were common within *B. napus* varieties and should be more commonly considered in breeding programs, we performed alignments of nine *B. napus* genomes (pairwise comparisons, 72 alignments in total; Fig. 4; Table S8) and used the INVERSIONSFINDER automated pipeline. As these nine genomes were recently assembled using state-of-the-art technologies, it may be assumed that these structural variants are

biologically relevant and are probably not the result of assembly errors. Despite these nine *B. napus* varieties having recently diverged, we found on average 24 inversions between pairwise comparisons (Table S8), impacting on average 14 chromosomes. Chromosomes A06 and C05 were the most (12%) and the least (0.8%) often impacted, respectively. Moreover, the median total size of all inversions found across the 72 alignments is 65.4 Mb (Fig. 7), which represents *c.* 6% of the *B. napus* genome. These inversions encompass a median number of 2892 genes, from which 38 RGAs on average were identified using RGAUGURY (Fig. 7). Regarding the two inversions validated in the DChEM F<sub>1</sub> hybrid, the inversion on chromosome A10 is specific to *B. rapa* cv. Chiifu as it was not detected among the nine *B. napus* genomes, while the C06 inversion is specific to *B. napus* cv. Darmor as it was not detected in the remaining eight *B. napus* genomes (Table S8).

### Discussion

In this study, we determined the recombination landscape in cultivated and semi-resynthesized *B. napus* F<sub>1</sub> hybrids. The recombination landscape was similar between these hybrids, with a decreasing gradient of COs from the telomeres to the centromeres, as commonly described (Nambiar & Smith, 2016; Shen *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2018; Kianian *et al.*, 2018; Gardiner *et al.*, 2019). More precisely, we determined that all COs were present in only 38% of the genome and that 80% of the COs occurred in 20% of the genome, as observed in other



**Fig. 6** Oligo-FISH validation of an inverted region between *Brassica napus* cv. Darmor and *B. rapa* cv. Chiifu A10 chromosomes, preventing recombination in this region in the DChEM population. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was carried out using A10 chromosome-specific oligo probes, A10-ATTO594 probe 1 (in red) and A10-Alexa 488 probe 2 (in green). FISH analyses of meiotic chromosomes at pachytene were carried out in *B. napus* cv. Darmor (a), *B. rapa* cv. Chiifu (b), F<sub>1</sub> hybrid DChEM (c, d), *B. napus* cv. Yudal (e) and the F<sub>1</sub> hybrid DY (f). Pachytene meicyote of *B. napus* cv. Darmor ( $A_nA_nC_nC_n$ ) showing red–green signals in both homologs of chromosome A10 (a) and green–red–green–red signals in A10 from *B. rapa* cv. Chiifu ( $A_rA_r$ ). Pachytene meicyote of the F<sub>1</sub> hybrid DChEM ( $A_nA_rC_nC_n$ ) showing red–green signals in the A10 chromosome from Darmor ( $A_n$ ) and red–green–red–green signals in the A10 from Chiifu ( $A_r$ ) (c,d). Chromosomes were counterstained with DAPI (gray). Bar, 5  $\mu$ m.

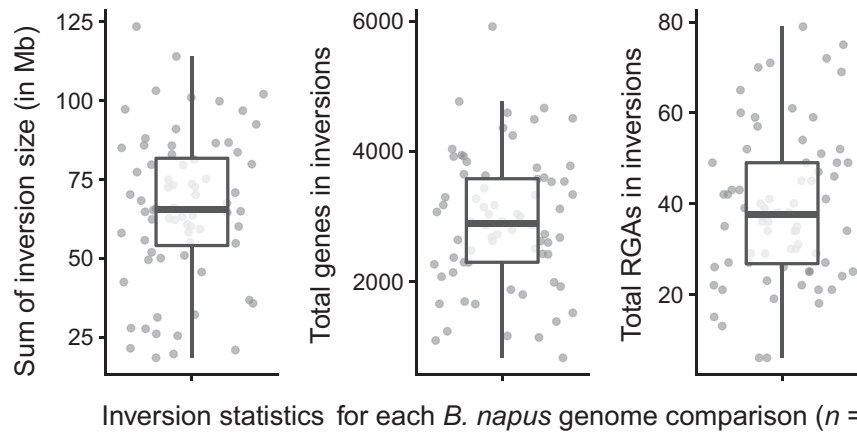
species such as *Triticum aestivum* (Saintenac *et al.*, 2009). Within these recombinant regions, we notably identified six regions larger than 1 Mb that were deprived of recombination in one population. We demonstrated that four regions are highly methylated whereas the two remaining regions are hypomethylated and correspond to inverted regions.

#### DNA methylation of regions lacking recombination

Interestingly, the four highly methylated nonrecombinant regions (A05-1, A05-2, C02 and C03, Fig. 2) are close to the

pericentromeres. The differential methylation status remained difficult to determine for chromosomes A05 and C02 because they are the most highly methylated chromosomes. Our results suggest that their methylation statuses and their relatively close positions to the centromere explain the absence of recombination. In fact, in plants, it is known that COs are usually absent in pericentromeric regions that are highly enriched in CpG methylation (He *et al.*, 2017; Raz *et al.*, 2021). Functional genetics experiments notably showed the importance of cytosine methylation in the definition of the CO landscape. For instance, knock-out of either *met1* (methyltransferase 1) or *ddm1* (decreased





**Fig. 7** Size and gene content (including resistance gene analogs (RGAs)) of all inverted regions inferred from pairwise comparisons (72 in total) of nine fully assembled *Brassica napus* varieties (Darmor, Gangan, No2127, Quinta, Shengli, Tapidor, Westar, Zheyou 73, Zs11). The left box plot represents the total size (in Mb) of all inverted regions between two varieties. The middle box plot corresponds to the total number of genes present in inferred inverted regions. The right box plot refers to the total number of RGAs inferred in all inverted regions observed from each pairwise comparison. Each dot corresponds to the alignment of two genomes. Dots are jittered for better data visualization. For the boxplots, the bold bar corresponds to the median, the top and bottom bars correspond to the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles respectively, while the top and bottom whiskers correspond to  $\max(\min(x), Q_1 - 1.5 \times IQR)$  and  $\min(\max(x), Q_3 + 1.5 \times IQR)$  respectively with  $IQR = Q_3 - Q_1$  (quartiles).

DNA methylation 1) in *Arabidopsis* causes a loss of CpG methylation and an increase of the recombination rate (Melamed-Bessudo & Levy, 2012; Yelina *et al.*, 2012). Moreover, a straightforward relationship between methylation and the formation of COs has been established in *A. thaliana*, where it has been shown that RNA-directed DNA methylation significantly reduces the recombination rate in CO hotspots in euchromatic regions (Yelina *et al.*, 2015). These results prompt further studies concerning the four highly methylated nonrecombinant regions that we identified. For instance, DNA demethylation through *ddm1* mutants, flower bud treatment by 5-*aza*-2-deoxycytidine (Ramos *et al.*, 2015) or CRISPR-based DNA demethylation (Taghbalout *et al.*, 2019) in *B. napus* may be used to determine if CO events will occur in these regions following a loss or reduction of cytosine methylation. In the near future, with the advent of Nanopore sequencing to generate chromosome-level genome assemblies, and the ever growing number of tools able to infer DNA methylation from Nanopore reads (Yuen *et al.*, 2021), new avenues are being paved for large-scale studies involving many genomes, providing finer insights of the relationships between DNA methylation and CO landscape across evolutionary time.

### Inversions prevent recombination in *B. napus*

To explain the absence of recombination in two hypomethylated regions, we checked in detail the putative presence of large SVs, such as important PAVs or inversions, as COs are generally suppressed by such SVs (Rowan *et al.*, 2019). Genomic alignments indicated the putative presence of large inverted regions between the parental lines. Despite the improvement of genome assembly techniques, scaffolding errors can still occur, requiring the physical validation of identified SVs. Therefore, we validated the presence of these inverted regions between our parental lines using optical maps or oligo-FISH. Oligo-FISH is a recently developed tool enabling the localization of genomic regions or the

identification of chromosomal rearrangements (such as inversions) within complex plant genomes (Jiang, 2019). Here, we notably used this technique to validate the presence of a A10 inverted region (spanning 2 Mb) among the highly duplicated *Brassica* genomes. This A10 inversion has already been described as specific to *B. rapa* cv. Chiifu compared to other *B. rapa* varieties (Boutte *et al.*, 2020).

The absence of recombination in inverted regions agrees with previous studies in *Arabidopsis* or barley (Fransz *et al.*, 2016; Jayakodi *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2020). In *Arabidopsis*, using a ultrahigh-density genetic map, it was observed that COs were generally absent in regions containing SVs, independently of their sizes, and that this suppression did not extend far beyond the SV borders (< 10 kb, Rowan *et al.*, 2019). As double strand break (DSB) formation was similar within and without SVs, suppression of COs within SVs occurs downstream of DSB formation (Rowan *et al.*, 2019). However, COs may occasionally occur within SVs and, depending on their relative position to the centromere, generate two types of gametes. Indeed, in paracentric inversions (localized away from the centromere), recombination leads to the formation of unbalanced gametes with dicentric and/or acentric chromosomes, whereas in pericentric inversions (encompassing the centromere) recombination leads to the formation of balanced gametes with chromosomes carrying duplications and deletions. In both cases, recombination within an inverted region potentially reduces gamete viability or leads to the production of lethal or less fit aneuploid embryos (Sybenga, 1975). COs within inversions can also lead to viable progeny, as demonstrated in *Arabidopsis* (Serra *et al.*, 2018; Rowan *et al.*, 2019). Preliminary to the formation of COs, coalignment and synapsis of the region are needed to form an inversion loop, as cytologically observed in barley (Ekberg, 1974). Using oligo-FISH on pachytene chromosomes, we did not detect an inversion loop in the heterozygous hybrid DChEM (for the A10 inversion), and only 3.8% of



the analyzed cells presented an absence of coalignment. Similar results were described in Arabidopsis (Ji, 2014; Fransz *et al.*, 2016), where no synapsis was observed despite a linear coalignment of the inverted region. In this study, the genome alignment of the parental lines of the DChEM F<sub>1</sub> hybrid allowed us to identify a total of three pericentric (1.7–5.6 Mb) and nine paracentric (1.0–2.7 Mb) inversions, for which six paracentric nonpericentromeric regions were analyzed. The formation of COs within pericentromeric regions is limited in *B. napus* allotetraploids, but has been observed in *Brassica* AAC allotriploid hybrids (resulting from a cross between *B. napus* and *B. rapa*), for which a modified recombination pattern has been observed (Pelé *et al.*, 2017). Hence, these allotriploid hybrids are ideal to study the impact of pericentric inversions on recombination.

### Impact of inversion on breeding programs

In this study, we focused only on large inverted regions, as they may greatly hamper the combination of favorable alleles during the breeding process. As our DChEM hybrid derived from a cross between a resynthesized and a cultivated *B. napus* variety, such inversions may have been formed any time after the emergence of *B. rapa* or *B. oleracea*, thus in the last 2 Myr (Liu *et al.*, 2014). To decipher if some inversions have been formed within *B. napus* in the last 100 yr and thus may be problematic for its breeding, we looked for the presence of such large inversions using nine assembled *B. napus* genomes (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020). Pairwise alignments of these genomes revealed that there were on average 24 large inversions between two *B. napus* varieties, where few to no COs will occur. Moreover, the regions we detected using INVERSIONSFINDER were shown to contain on average 38 RGAs, highlighting the importance of considering inversions but also other types of large SVs, especially before attempting to introgress a trait of interest (e.g. a resistance gene toward a pathogen) in elite varieties. Indeed, as recombination is prevented in inverted regions, the whole inverted region will be genetically inherited as a single locus and putative unfavorable (deleterious or less advantageous) alleles may be transmitted along with the gene of interest (linkage drag), preventing further reduction in the size of the introgression or performing a fine mapping and cloning of genes of interest. Such a phenomenon was notably observed in tomato when attempting to introgress in *Solanum lycopersicum* regions conferring resistance to tomato yellow leaf curl from wild relatives, such as *S. habrochaites* or *S. chilense* (Verlaan *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2015). Paracentric inversions were also associated with main agronomic traits in *Glycine max*, where a 360 kb inversion is associated with the yellow seed coat (Xie *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020), a character linked to high-quality soybean oil (Choi *et al.*, 2021). Additionally, inversions were also shown to play an important role in the adaptation of some maize populations to cultivation in highland environments (Crow *et al.*, 2020) or in the expansion of the geographical range of some barley (Jayakodi *et al.*, 2020). In this latter species, the genome assembly of 20 varieties highlighted that

large inversions were common and may be up to 141 Mb long (Jayakodi *et al.*, 2020).

Inversions strongly affect the ability of homologous chromosomes to pair and recombine in the inverted region, resulting in a large number of genes being excluded in the recombination process (Schwartz *et al.*, 2020). To increase the chance to generate recombination within an inversion, it was recently demonstrated that it was possible to revert the inversion in the donor variety using the CRISPR/Cas9 technology, as performed in Arabidopsis for a 1.17 Mb inversion (Schmidt *et al.*, 2019, 2020) or even in maize for a large 75.5 Mb pericentric inversion (Schwartz *et al.*, 2020). Conversely, when linked favorable alleles need to be held together during the breeding process, inversion of a region carrying the group of alleles allows maintenance of linked loci, avoiding this group from being split by COs in the progenies. This can be especially useful for RGAs, which often work as clusters, as seen for instance in lettuce (Meyers *et al.*, 1998), rice (Mizuno *et al.*, 2020) and rapeseed (Dolatabadian *et al.*, 2020).

In this study, we have shown that DNA methylation and SV landscapes are important factors shaping meiotic recombination in *B. napus*. Both factors remain poorly studied and used in *B. napus*, despite the fact that they may have either tremendous positive or negative impacts on plant breeding. With the recent technological advances that enable to perform rapid assembly of chromosome-scale genomes at relatively low cost, it seems prudent to assemble and compare the genomes of donor and recipient varieties before launching a long-lasting and time-consuming breeding program.

### Acknowledgements











We thank the Genetic Resource Center BrACySol ([https://www6.rennes.inrae.fr/igepp\\_eng/About-IGEPP/Platforms/BrACySol](https://www6.rennes.inrae.fr/igepp_eng/About-IGEPP/Platforms/BrACySol)) for providing seeds from different genotypes (*B. napus* cv. Darmor, Darmor-bzh and Yudal, *B. oleracea* cv. HDEM and *B. rapa* cv. Chiifu). We also thank the UMR 1905 GENTYANE Platform (especially C Poncet, Clermont-Ferrand, France, <http://gentyane.clermont.inra.fr>) for performing DNA extractions, and Trait Genetics (especially M Ganal) for generating the genotyping data (<http://www.traitgenetics.com/>). We also thank Arbor Biosciences (especially J-M Rouillard) for designing the oligo-FISH probes. We acknowledge the molecular cytogenetics platform ([https://www6.rennes.inrae.fr/igepp\\_eng/About-IGEPP/Platforms/Molecular-Cytogenetics-Platform-PCMV](https://www6.rennes.inrae.fr/igepp_eng/About-IGEPP/Platforms/Molecular-Cytogenetics-Platform-PCMV)) for performing the oligo-FISH experiments. We thank the GOGEP team and GenOuest bioinformatic platform (<https://www.genouest.org/>), especially F. Legeai, S. Robin, M. Boudet and A. Bretaudeau. We would also like to thank all the staff who took care of our plant material (especially L. Charlon, P. Rolland, J-P. Constantin, J. M. Lucas and F. Letertre). This work was made possible by financial support of the ANR 'Stirrer' (ANR-19-CE20-001 awarded to MR-G) and France Genomique (ANR-10-INBS-09-08) 'Polysuccess' projects. This project also received funding from INRAE 'Biology and Plant Breeding' department to perform part of the experiments presented here (projects 'Recipe' and 'Recoptic' awarded to MR-G and A-MC,

respectively), as well as for part of FB's PhD salary. We also thank the 'Region Bretagne' that financed the second half of FB's PhD (project 'Diverse'), as well as GR's post-doc ('Epitrans': ref. 0311/SAD18012/00 057661) salaries.

## Author contributions

FB, GR, A-MC and MR-G performed the conceptualization and experimental design of this study, and wrote the manuscript. FB and CF generated and analyzed the genetic maps. GR analyzed the BS-seq data and created the INVERSIONSFINDER tool and performed MUMMER analyses. OC and VH performed the oligo-FISH experiments. CB and J-MA produced and analyzed the optical map alignments. FB, A-MC, GD, CF, JFdC, ML-T, LM and MR-G participated in leaf sampling for BS-seq experiments. ML-T, GD and CF took care of the plant samples for BS-seq and genotyping DNA. LM performed genome alignment comparisons using SyRI. JM generated the data visualization using CIRCOS. MG and GT generated and took care of the plant material. FE performed the cytogenetic analysis to select the DChEM F<sub>1</sub> hybrid. A-MC and MR-G acquired funding. All authors read and approved the final manuscript.

## ORCID

Jean-Marc Aury  <https://orcid.org/0000-0003-1718-3010>  
 Caroline Belser  <https://orcid.org/0000-0002-8108-9910>  
 Franz Boideau  <https://orcid.org/0000-0001-5967-8746>  
 Anne-Marie Chèvre  <https://orcid.org/0000-0001-5312-032X>  
 Olivier Coriton  <https://orcid.org/0000-0003-3741-447X>  
 Cyril Falentin  <https://orcid.org/0000-0002-9901-3412>  
 Julie Ferreira de Carvalho  <https://orcid.org/0000-0001-6200-3344>  
 Loeiz Maillat  <https://orcid.org/0000-0002-8686-5982>  
 Gautier Richard  <https://orcid.org/0000-0003-3663-4569>  
 Mathieu Rousseau-Guetin  <https://orcid.org/0000-0002-1130-1090>

## Data availability

All BS-seq data are available at the NCBI Sequence Read Archive (SRA), under BioProject PRJNA769222. The genotyping data used in this study are available in Table S1.

## References

Allender CJ, King GJ. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* 10: 54.  
 Alonso-Blanco C, Andrade J, Becker C, Bemm F, Bergelson J, Borgwardt KM, Cao J, Chae E, Dezaan TM, Ding W *et al.* 2016. 1,135 Genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 166: 481–491.  
 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.  
 Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens F-C, Falentin C, Genete M, Berrabah W, Chèvre A-M, Delourme R *et al.* 2018. Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nature Plants* 4: 879–887.

Boutte J, Maillat L, Chaussepied T, Letort S, Aury J-M, Belser C, Boideau F, Brunet A, Coriton O, Deniot G *et al.* 2020. Genome size variation and comparative genomics reveal intraspecific diversity in *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science* 11: 577536.  
 Chalhoub B, Denoed F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B *et al.* 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345: 950–953.  
 Choi Y-M, Yoon H, Shin M-J, Lee Y, Hur OS, Lee BC, Ha B-K, Wang X, Desta KT. 2021. Metabolite contents and antioxidant activities of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds of different seed coat colors. *Antioxidants* 10: 1210.  
 Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, Barbe V, Daron J, Pingault L, Sourdille P, Couloux A, Paux E *et al.* 2014. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345: 1249721.  
 Crow T, Ta J, Nojoomi S, Aguilar-Rangel MR, Torres Rodríguez JV, Gates D, Rellán-Álvarez R, Sawers R, Runcie D. 2020. Gene regulatory effects of a large chromosomal inversion in highland maize. *PLoS Genetics* 16: e1009213.  
 Davison AC, Hinkley DV. 1997. *Bootstrap methods and their application*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.  
 Dolatabadian A, Bayer PE, Tirnaz S, Hurgobin B, Edwards D, Batley J. 2020. Characterization of disease resistance genes in the *Brassica napus* pangenome reveals significant structural variation. *Plant Biotechnology Journal* 18: 969–982.  
 Dooner HK, He L. 2008. Maize genome structure variation: interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination. *Plant Cell* 20: 249–258.  
 Dreissig S, Mascher M, Heckmann S. 2019. Variation in recombination rate is shaped by domestication and environmental conditions in barley. *Molecular Biology and Evolution* 36: 2029–2039.  
 Ekberg I. 1974. Cytogenetic studies of three paracentric inversions in barley. *Hereditas* 76: 1–30.  
 Fernandes JB, Séguéla-Arnaud M, Larchevêque C, Lloyd AH, Mercier R. 2018. Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 115: 2431–2436.  
 Foisset N, Delourme R, Lucas M-O, Renard M. 1997. In vitro androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: spontaneous versus colchicine-doubled lines. *Plant Cell Reports* 16: 464–468.  
 Franz P, Linc G, Lee C-R, Aflitos SA, Lasky JR, Toomajian C, Ali H, Peters J, van Dam P, Ji X *et al.* 2016. Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 88: 159–178.  
 Fuller ZL, Leonard CJ, Young RE, Schaeffer SW, Phadnis N. 2018. Ancestral polymorphisms explain the role of chromosomal inversions in speciation. *PLoS Genetics* 14: e1007526.  
 Gardiner L-J, Wingen LU, Bailey P, Joyson R, Brabbs T, Wright J, Higgins JD, Hall N, Griffiths S, Clavijo BJ *et al.* 2019. Analysis of the recombination landscape of hexaploid bread wheat reveals genes controlling recombination and gene conversion frequency. *Genome Biology* 20: 69.  
 de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T. 2005. CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21: 1703–1704.  
 He L, Dooner HK. 2009. Haplotype structure strongly affects recombination in a maize genetic interval polymorphic for Helitron and retrotransposon insertions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 8410–8416.  
 He Y, Wang M, Dukowic-Schulze S, Zhou A, Tiang C-L, Shilo S, Sidhu GK, Eichten S, Bradbury P, Springer NM *et al.* 2017. Genomic features shaping the landscape of meiotic double-strand-break hotspots in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 114: 12231–12236.  
 Hu Z-Y, Hua W, Huang S-M, Wang H-Z. 2011. Complete chloroplast genome sequence of rapeseed (*Brassica napus* L.) and its evolutionary implications. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 875–887.  
 Hurgobin B, Goliz AA, Bayer PE, Chan CK, Tirnaz S, Dolatabadian A, Schiess SV, Samans B, Montenegro JD, Parkin IAP *et al.* 2018. Homoeologous exchange is a major cause of gene presence/absence variation in the amphidiploid *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* 16: 1265–1274.  
 Istace B, Belser C, Falentin C, Labadie K, Boideau F, Deniot G, Maillat L, Craud C, Bertrand L, Chèvre A-M *et al.* 2021. Sequencing and

- chromosome-scale assembly of plant genomes, *Brassica rapa* as a use case. *Biology* 10: 732.
- Jayakodi M, Padmarasu S, Haberer G, Bonthala VS, Gundlach H, Monat C, Lux T, Kamal N, Lang D, Himmelbach A *et al.* 2020. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* 588: 284–289.
- Ji X. 2014. *Numerical and structural chromosome aberrations in cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis) and Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 1: 137.
- Jiang J. 2019. Fluorescence in situ hybridization in plants: recent developments and future applications. *Chromosome Research* 27: 153–165.
- Jiao W-B, Schneeberger K. 2020. Chromosome-level assemblies of multiple *Arabidopsis* genomes reveal hotspots of rearrangements with altered evolutionary dynamics. *Nature Communications* 11: 989.
- Kianian PMA, Wang M, Simons K, Ghavami F, He Y, Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Sun QI, Pillardy J, Mudge J *et al.* 2018. High-resolution crossover mapping reveals similarities and differences of male and female recombination in maize. *Nature Communications* 9: 2370.
- Kittipol V, He Z, Wang L, Doheny-Adams T, Langer S, Bancroft I. 2019. Genetic architecture of glucosinolate variation in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* 240: 152988.
- Kosambi DD. 1943. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12: 172–175.
- Kumar V, Paillard S, Fopa-Fomeju B, Falentin C, Deniot G, Baron C, Vallée P, Manzanera-Dauleux MJ, Delourme R. 2018. Multi-year linkage and association mapping confirm the high number of genomic regions involved in oilseed rape quantitative resistance to blackleg. *Theoretical and Applied Genetics* 131: 1627–1643.
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL. 2004. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology* 5: R12.
- Li P, Quan X, Jia G, Xiao J, Cloutier S, You FM. 2016. RGAUGURY: a pipeline for genome-wide prediction of resistance gene analogs (RGAs) in plants. *BMC Genomics* 17: 852.
- Li Z, Wang M, Lin K, Xie Y, Guo J, Ye L, Zhuang Y, Teng W, Ran X, Tong Y *et al.* 2019. The bread wheat epigenomic map reveals distinct chromatin architectural and evolutionary features of functional genetic elements. *Genome Biology* 20: 139.
- Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S *et al.* 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications* 5: 3930.
- Liu Y, Du H, Li P, Shen Y, Peng H, Liu S, Zhou G-A, Zhang H, Liu Z, Shi M *et al.* 2020. Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell* 182: 162–176.e13.
- Marand AP, Jansky SH, Zhao H, Leisner CP, Zhu X, Zeng Z, Crisovan E, Newton L, Hamernik AJ, Veilleux RE *et al.* 2017. Meiotic crossovers are associated with open chromatin and enriched with Stowaway transposons in potato. *Genome Biology* 18: 203.
- Martin G, Baurens F-C, Hervouet C, Salmon F, Delos J-M, Labadie K, Perdereau A, Mournet P, Blois L, Dupouy M *et al.* 2020. Chromosome reciprocal translocations have accompanied subspecies evolution in bananas. *The Plant Journal* 104: 1698–1711.
- Melamed-Bessudo C, Levy AA. 2012. Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: E981–E988.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015. The molecular biology of meiosis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 66: 297–327.
- Meyers BC, Chin DB, Shen KA, Sivaramkrishnan S, Lavelle DO, Zhang Z, Michelmore RW. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10: 1817.
- Mézard C, Jahns M, Grelon M. 2015. Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers. *Trends in Genetics* 31: 393–401.
- Mizuno H, Katagiri S, Kanamori H, Mukai Y, Sasaki T, Matsumoto T, Wu J. 2020. Evolutionary dynamics and impacts of chromosome regions carrying R-gene clusters in rice. *Scientific Reports* 10: 872.
- Moose SP, Mumm RH. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology* 147: 969–977.
- Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7: 389–452.
- Nambiar M, Smith GR. 2016. Repression of harmful meiotic recombination in centromeric regions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 54: 188–197.
- Pelé A, Falque M, Trotoux G, Eber F, Nègre S, Gilet M, Huteau V, Lodé M, Jousseau T, Dechaumet S *et al.* 2017. Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in Brassicas. *PLoS Genetics* 13: e1006794.
- Qian L, Qian W, Snowdon RJ. 2014. Sub-genomic selection patterns as a signature of breeding in the allopolyploid *Brassica napus* genome. *BMC Genomics* 15: 1170.
- Ramos M-P, Wijetunga NA, McLellan AS, Suzuki M, Grealley JM. 2015. DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics & Chromatin* 8: 11.
- Raz A, Dahan-Meir T, Melamed-Bessudo C, Leshkowitz D, Levy AA. 2021. Redistribution of meiotic crossovers along wheat chromosomes by virus-induced gene silencing. *Frontiers in Plant Science* 11: 635139.
- Rieseberg LH. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 351–358.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29: 24–26.
- Rousseau-Guetin M, Belser C, Da Silva C, Richard G, Istace B, Cruaud C, Falentin C, Boideau F, Boutte J, Delourme R *et al.* 2020. Long-read assembly of the *Brassica napus* reference genome Darmor-bzh. *GigaScience* 9, 12: g1aa137.
- Rowan BA, Heavens D, Feuerborn TR, Tock AJ, Henderson IR, Weigel D. 2019. An ultra high-density *Arabidopsis thaliana* crossover map that refines the influences of structural variation and epigenetic features. *Genetics* 213: 771–787.
- Saintenac C, Falque M, Martin OC, Paux E, Feuillet C, Sourdille P. 2009. Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 181, 2: 393–403.
- Schmidt C, Frasz P, Rönspies M, Dreissig S, Fuchs J, Heckmann S, Houben A, Puchta H. 2020. Changing local recombination patterns in *Arabidopsis* by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* 11: 4418.
- Schmidt C, Pacher M, Puchta H. 2019. Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system. *The Plant Journal* 98: 577–589.
- Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L, Barone P, Llacá V, Fengler K, Svitashv S. 2020. CRISPR–Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. *Nature Plants* 6: 1427–1431.
- Serra H, Lambing C, Griffin CH, Topp SD, Nageswaran DC, Underwood CJ, Ziolkowski PA, Séguéla-Arnaud M, Fernandes JB, Mercier R *et al.* 2018. Massive crossover elevation via combination of HEI10 and recq4a recq4b during *Arabidopsis* meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 115: 2437–2442.
- Shen C, Li X, Zhang R, Lin Z. 2017. Genome-wide recombination rate variation in a recombination map of cotton. *PLoS ONE* 12: e0188682.
- Song J-M, Guan Z, Hu J, Guo C, Yang Z, Wang S, Liu D, Wang BO, Lu S, Zhou R *et al.* 2020. Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nature Plants* 6: 34–45.
- Stein A, Coriton O, Rousseau-Guetin M, Samans B, Schiessl SV, Obermeier C, Parkin IAP, Chèvre A-M, Snowdon RJ. 2017. Mapping of homoeologous chromosome exchanges influencing quantitative trait variation in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* 15: 1478–1489.
- Sturtevant AH. 1921. A case of rearrangement of genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 7: 235–237.
- Sturtevant AH. 1926. A crossover reducer in *Drosophila melanogaster* due to inversion of a section of the third chromosome. *Biologisches Zentralblatt* 46: 697–702.



- Syngena J. 1975. *Meiotic configurations: a source of information for estimating genetic parameters*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Taghbalout A, Du M, Jillette N, Rosikiewicz W, Rath A, Heinen CD, Li S, Cheng AW. 2019. Enhanced CRISPR-based DNA demethylation by Casilio-ME-mediated RNA-guided coupling of methylcytosine oxidation and DNA repair pathways. *Nature Communications* 10: 4296.
- Underwood CJ, Choi K, Lambing C, Zhao X, Serra H, Borges F, Simorowski J, Ernst E, Jacob Y, Henderson IR *et al.* 2018. Epigenetic activation of meiotic recombination near *Arabidopsis thaliana* centromeres via loss of H3K9me2 and non-CG DNA methylation. *Genome Research* 28: 519–531.
- Verlaan MG, Szinay D, Hutton SF, de Jong H, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Bai Y. 2011. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene Ty-1. *The Plant Journal* 68: 1093–1103.
- Walkowiak S, Gao L, Monat C, Haberer G, Kassa MT, Brinton J, Ramirez-Gonzalez RH, Kolodziej MC, Delorean E, Thambugala D *et al.* 2020. Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature* 588: 277–283.
- Wolters A-MA, Caro M, Dong S, Finkers R, Gao J, Visser RGF, Wang X, Du Y, Bai Y. 2015. Detection of an inversion in the Ty-2 region between *S. lycopersicum* and *S. habrochaites* by a combination of de novo genome assembly and BAC cloning. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 1987–1997.
- Xie M, Chung CY-L, Li M-W, Wong F-L, Wang X, Liu A, Wang Z, Leung AK-Y, Wong T-H, Tong S-W *et al.* 2019. A reference-grade wild soybean genome. *Nature Communications* 10: 1216.
- Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, Miller N, Drouaud J, Grelon M, Copenhaver GP *et al.* 2012. Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants. *PLoS Genetics* 8: e1002844.
- Yelina NE, Lambing C, Hardcastle TJ, Zhao X, Santos B, Henderson IR. 2015. DNA methylation epigenetically silences crossover hot spots and controls chromosomal domains of meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 29: 2183–2202.
- Yuen ZW-S, Srivastava A, Daniel R, McNeven D, Jack C, Eyras E. 2021. Systematic benchmarking of tools for CpG methylation detection from nanopore sequencing. *Nature Communications* 12: 3438.
- Zhang L, Cai XU, Wu J, Liu M, Grob S, Cheng F, Liang J, Cai C, Liu Z, Liu BO *et al.* 2018. Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies. *Horticulture Research* 5: 50.
- Zhao J, Udall JA, Quijada PA, Grau CR, Meng J, Osborn TC. 2006. Quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and its association with a homeologous non-reciprocal transposition in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 509–516.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Fig. S1** Plant material used in this study.

**Fig. S2** Linear representation of the genomic data studied in the *B. napus* cv. Darmor-bzh chromosomes (v10 assembly)

**Fig. S3** Comparison of the bootstraps of the CpG methylation distribution in 100 random regions compared to the six large nonrecombinant regions (one per panel) in the A subgenome and in the C subgenome.

**Fig. S4** Estimation of the methylation status in the CHG and CHH contexts of the six large nonrecombinant loci compared to

100 noncentromeric random regions in their respective chromosome in *B. napus* cv. Darmor-bzh (v10 assembly).

**Fig. S5** Estimation of the methylation status in the CHG and CHH contexts of the three large nonrecombinant loci compared to 100 noncentromeric random regions in their respective chromosome in the *B. rapa* cv. Chiifu genome.

**Fig. S6** Estimation of the methylation status in the CHG and CHH contexts of the three large nonrecombinant loci compared to 100 noncentromeric random regions in their respective chromosome in the *B. oleracea* cv. HDEM genome.

**Fig. S7** CpG methylation distribution for each chromosome (1 kb windows) of the three investigated genotypes.

**Fig. S8** Four of the six nonrecombinant regions (A05-1, A05-2, C02 and C03) do not display any large SV.

**Fig. S9** Oligo-FISH staining of the region of interest on the A10 chromosome in the resynthesized *B. napus* line ChEM.

**Table S1** Genotyping data of the two populations.

**Table S2** Physical and genetic position of the 1961 SNP markers used to create the DY and DChEM genetic maps.

**Table S3** Inferred positions of the centromeric and pericentromeric regions for the 19 *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 chromosomes.

**Table S4** List of putative resistance gene analogs inferred from nine *B. napus* genomes.

**Table S5** List of the genes and repeated elements present within the six large nonrecombinant regions of the DChEM population in the *B. napus* cv. Darmor-bzh v10, *B. oleracea* cv. HDEM and *B. rapa* cv. Chiifu v3 genome assemblies.

**Table S6** BS-seq quality control metrics in young leaves of *B. napus* cv. Darmor-bzh, *B. rapa* cv. Chiifu and *B. oleracea* cv. HDEM.

**Table S7** List of large putative inverted regions (> 1 Mb) inferred from pairwise comparisons of the assembled genomes of *B. napus* cv. Darmor-bzh, *B. rapa* cv. Chiifu and *B. oleracea* cv. HDEM.

**Table S8** List of large putative inverted regions (> 1 Mb) inferred from pairwise comparisons of the assembled genomes of nine *B. napus*.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



### III. Conclusion

Ces résultats nous ont permis de montrer qu'un colza semi-synthétique présente un profil de recombinaison similaire à un colza cultivé. Et comme chez de nombreuses espèces d'intérêt agronomique, la majorité de la recombinaison a lieu aux extrémités distales des chromosomes chez cette espèce.

Par ailleurs, le profil de méthylation de l'ADN observé chez *B. napus* est similaire à celui observé chez de nombreuses espèces telles que *Arabidopsis* (Underwood et al. 2018) ou le chou (Parkin et al. 2014). Il est notamment caractérisé par une forte méthylation des régions péricentromériques par rapport aux bras chromosomiques. Nous avons également montré qu'il existe une corrélation négative entre le niveau de méthylation de l'ADN et la fréquence de recombinaison chez le colza *B. napus*, comme cela a été démontré par exemple chez *Arabidopsis* (Yelina et al. 2012).

En étudiant le profil de recombinaison de ces deux colzas, nous avons détecté neuf régions génomiques relativement grandes (> 1 Mb) localisées en dehors des régions péricentromériques et présentant une absence complète de recombinaison. Nous avons pu lier l'absence de recombinaison de sept régions à leur fort taux de méthylation.

Pour les deux régions restantes faiblement méthylées, nous avons étudié si des variations structurales pouvaient être la cause de cette absence de recombinaison. En utilisant l'alignement de cartes optiques et de l'oligo-FISH, nous avons été capables de démontrer que l'absence de recombinaison dans ces deux régions était liée à la présence d'inversions chromosomiques paracentriques présentes à l'état hétérozygote dans nos hybrides.

Dans le manuscrit, l'utilisation de colzas synthétiques nous a permis de révéler des inversions entre le colza et ses parents diploïdes (entre *B. napus* cv. Darmor et *B. rapa* cv. Chiifu pour le chromosome A10 et entre *B. napus* cv. Darmor et *B. oleracea* cv. HDEM pour le chromosome C06). Cependant, des inversions intraspécifiques peuvent également être détectées entre variétés de colza (Song et al. 2020). Nous avons confirmé ces résultats en comparant la variété Darmor et Yudal. L'inversion observée sur le chromosome C06 est spécifique de *B. napus* cv. Darmor et ne permet pas la formation de COs au sein de l'hybride intraspécifique DarmorxYudal.

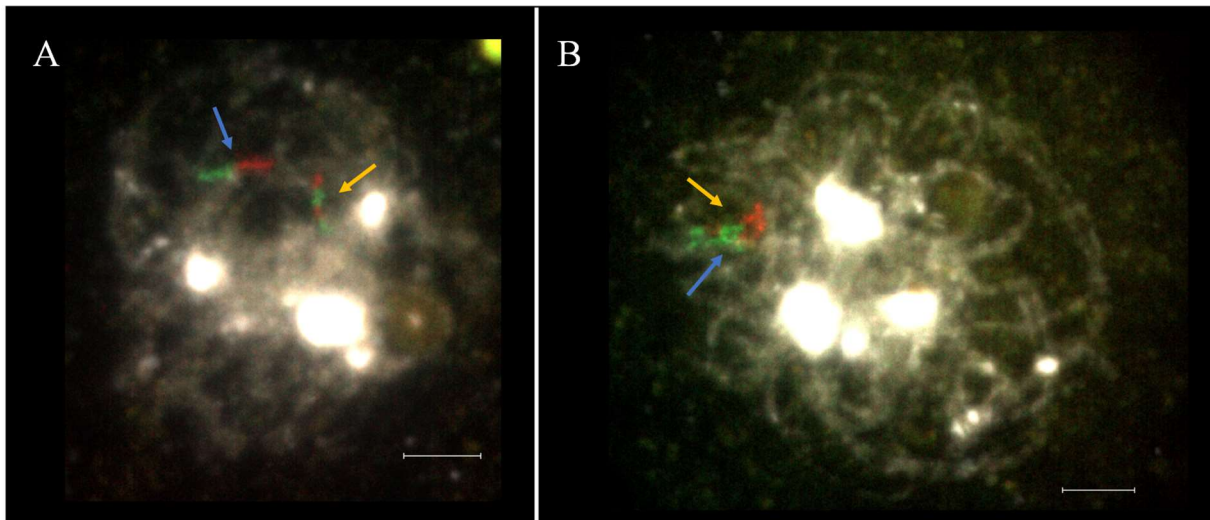


Figure 1 : Validation par oligo-FISH d'une inversion entre le chromosome A10 de *B. rapa* cv. Chiifu et de *B. napus* cv. Darmor au sein d'un hybride 3x-F1  $A_nA_rC_n$ . (A) Cellule au stade leptotène-zygotène, la région A10 n'est pas encore appariée mais les deux haplotypes parentaux sont clairement visibles. (B) Cellule au stade pachytène, la région A10 est alignée et il est possible de distinguer les deux haplotypes parentaux. A10 *B. napus* cv. Darmor (flèche bleue), A10 *B. rapa* cv. Chiifu (flèche orange). Barre d'échelle = 5 $\mu$ m.

Les inversions chromosomiques sont loin d'être rares dans les génomes de *Brassica napus*. En effet, nous avons détecté en moyenne 24 inversions par comparaisons 2 à 2 entre neuf génomes de colza. Ces régions inversées couvrent en moyenne 6% du génome, soit en moyenne 2892 gènes. Ces variants structuraux sont importants à prendre en compte dans les schémas de sélection variétale lors de la production d'hybrides F1 présentant ces inversions à l'état hétérozygote. Les gènes portés par ces régions vont rester liés génétiquement en l'absence de recombinaison alors qu'ils peuvent contenir des gènes d'intérêt agronomique, comme observé chez la tomate (Verlaan et al. 2011, Wolters et al. 2015).

Comme présenté dans les deux chapitres précédant, les hybrides AAC présentent une fréquence de recombinaison plus élevée et une distribution des COs modifiée par rapport aux allotétraploïdes AACC. Cependant, les inversions chromosomiques semblent faire partie des limites à ces modifications de la recombinaison. En effet, l'inversion chromosomique caractérisée sur le chromosome A10 entre les génotypes *B. napus* cv. Darmor et *B. rapa* cv. Chiifu est retrouvée chez l'hybride allotriploïde AAC 3x-F1 (Figure 1) et cette région est également dépourvue de COs au sein de cet hybride (Figure 2A). De manière intéressante dans la population en backcross de l'hybride 3x-B1F1a<sup>3x</sup>, de la recombinaison a été détectée dans cet intervalle sur le chromosome A10 (Figure 2B). Il serait donc intéressant de déterminer s'il y a lors de la méiose de cet hybride des chromosomes qui présentent des retards de migration lors de l'anaphase I ou s'il y a des micronoyaux en télophase II. Ces éléments indiquant respectivement la présence de chromosomes dicentriques et de chromosomes acentriques.



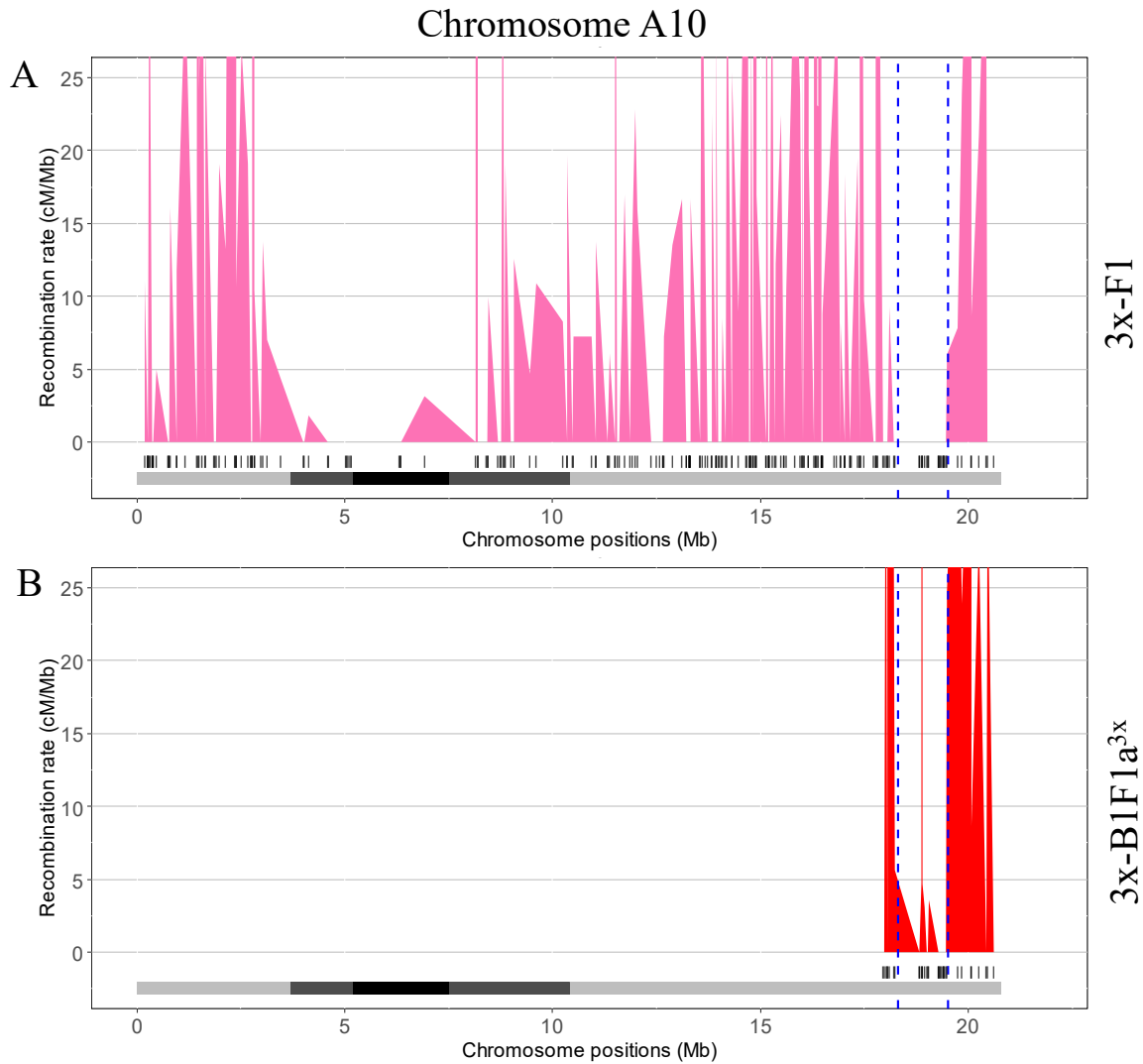


Figure 2 : Distribution de la recombinaison homologue au sein d'une inversion chromosomique chez deux hybrides allotriploïdes AAC. (A) Profil de recombinaison chez l'hybride 3x-F1. (B) Profil de recombinaison chez l'hybride 3x-B1F1a<sup>3x</sup>. L'inversion chromosomique détectée entre *B. napus* cv. Darmor et *B. rapa* cv. Chiifu est délimitée par des pointillés bleus sur le bras long du chromosome A10. Sous chaque courbe la position des SNP (traits verticaux noirs) ainsi que la structure du chromosome (centromère en noir, péricentromères en gris foncé et bras chromosomiques en gris clair) sont indiqués.

## **Chapitre V : Discussion générale**



## Chapitre V : Discussion générale

Au travers de ces travaux de thèse, nous avons pu montrer que les hybrides allotriploïdes AAC présentent à la fois une fréquence de recombinaison plus élevée et une modification de la distribution des COs sur les chromosomes A par rapport aux hybrides diploïdes AA ou allotétraploïdes AACC. De plus, cette différence entre AAC et AACC est observable en première et seconde génération. Par ailleurs de façon surprenante, nous avons pu démontrer que la recombinaison est un peu plus importante en seconde (backcross) qu'en première génération, quel que soit le niveau de ploïdie. Ces travaux démontrent donc que cette modification de la recombinaison chez les hybrides AAC est bien dépendante de la structure allotriploïde AAC. Par ailleurs, nous avons pu montrer que cette dérégulation est réversible, les plantes retrouvant une structure AACC présentant un profil de recombinaison comparable à celui observée chez un colza.

Nous proposons dans cette discussion :

- De décrire les différentes hypothèses qui peuvent être proposées pour expliquer cette modification drastique du profil de recombinaison chez les hybrides AAC et des travaux restant à conduire pour les valider,
- De préciser le rôle des variations structurales,
- D'analyser les conséquences d'un mécanisme réversible à la fois pour la connaissance de la méiose et en amélioration des plantes, y compris chez d'autres modèles.

### **I. Modification du profil de recombinaison**

#### I.A. Résultats

La présence de neuf chromosomes C non appariés dans les hybrides AAC est responsable de la dérégulation des contrôles méiotiques et le retour de chromosomes C sous forme de paires permet une restauration des contrôles. Différentes étapes de la méiose pourraient être affectées. Par ailleurs, les travaux antérieurs de Suay et al. (2014) ont montré que des hybrides AA + 1, 3, 6 ou 9 chromosomes C de chou présentent une augmentation constante de la fréquence de COs, révélant qu'il peut y avoir un effet additif et un effet dosage des chromosomes C. Ce dernier dépend cependant de la nature des chromosomes C en addition, le chromosome C09 de chou pouvant, à lui seul, expliquer une part des variations observées. Ces résultats couplés à ceux de cette thèse pourraient indiquer une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelles dans les hybrides AAC.



## I.B Etudes des différentes étapes de la méiose qui pourraient être affectées

### *I.B.1 Initiation de la méiose*

Au vu de l'augmentation du nombre de COs observés chez les AAC, on peut se demander si les précurseurs des COs, les cassures double brin (CDB) de l'ADN, ne sont pas également impactées par la structure AAC et modifiées. Cette hypothèse nous semble peu probable, étant donné que les CDB sont déjà en excès comparées au nombre de COs et qu'en plus l'augmentation de CDB n'induit pas d'augmentation de la fréquence de recombinaison chez *Arabidopsis* (Varas et al. 2015).

Cependant, il est possible qu'une redistribution des CDB soit responsable de la modification de la distribution de la recombinaison chez les AAC. Chez *Arabidopsis*, le knockout (KO) de la protéine CMT3 induit une modification de la méthylation de l'ADN le long des chromosomes, avec une augmentation de la fréquence de la recombinaison dans les régions péracentromériques associée à une augmentation de la fréquence de CDB dans ces dernières régions (Underwood et al. 2018). Bien que chez le maïs, les COs sont peu associés à la présence de hotspots de CDB, et que les régions dépourvues de COs sont également riches en CDB (He et al. 2017). Afin de déterminer si les AAC présentent une augmentation ou une variation du profil de distribution des CDB en comparaison à un hybride AACC, il serait donc intéressant de pouvoir réaliser, par exemple, un immunomarquage des protéines RAD51 ou DMC1 sur des méiocytes au stade leptotène pour déterminer la fréquence des CDB et du ChIP-seq de RAD51 ou SPO11 afin d'établir le profil de CDB le long du génome chez les AAC par rapport à ses parents euploïdes.

### *I.B.2 Réparation des CDB en COs*

Si le nombre de CDB n'est pas limitant, plusieurs d'entre elles sont réparées en COs uniquement dans les hybrides AAC. Nous avons réussi à lier l'augmentation de la fréquence de recombinaison à une augmentation de la fréquence de foci HEI10, au moins chez la voie mâle. Ceci est en accord avec les données d'immunomarquage MLH1 réalisées par Leflon et al. (2010) et les données de cartographie génétique en voie mâle de Pelé et al. (2017), tous deux indiquant une augmentation d'un facteur 1,7 de la fréquence de COs entre un diploïde AA et un allotriploïde AAC. Par ailleurs, ces deux publications ont également lié cette augmentation de la fréquence de COs à une diminution de la force de l'interférence. Cependant, une augmentation de la fréquence de COs de classe II est capable de faire diminuer artificiellement la force de l'interférence lorsque des données de cartographie génétique sont utilisées.



Il serait donc pertinent de réaliser de l'immunomarquage de la protéine MUS81 sur l'ensemble de ce matériel pour déterminer la fréquence des COs de classe II sur des cellules mères de pollen et ainsi tester leur potentiel rôle. Cependant, vues les difficultés pour réaliser ce type d'immunomarquage, il serait aussi envisageable de réaliser des mutants KO de MUS81 ou de MSH4 qui permettront d'estimer la fréquence de COs par cartographie génétique chez les AAC et de déterminer l'ampleur de leur implication dans l'augmentation de la fréquence de recombinaison observée chez les AAC. Cette stratégie de KO reste difficile à mettre en œuvre chez le colza du fait de la présence de plusieurs copies par gène. Cependant, les gènes de méiose retournent fréquemment à l'état de copie unique (Lloyd et al. 2014) et Gonzalo et al. (2019) ont montré que le gène MSH4 est en copie unique par sous-génome et qu'il est possible de réaliser leur KO. Il est aussi important de noter qu'il sera aussi nécessaire de réaliser le KO de ce gène chez *B. rapa* afin d'obtenir un hybride AAC avec l'ensemble des allèles mutés du gène considéré.

La diminution de l'interférence chez les hybrides AAC pourrait correspondre à une augmentation des COs de classe I. Bénéficiant dans nos travaux d'une plus grande densité en SNP, je suis en train de mesurer l'interférence dans les différents hybrides générés en collaboration avec M. Falque (INRAE, UMR GQE Le Moulon). L'interférence est un phénomène qui a été observé il y a plus d'une centaine d'année par Sturtevant chez la *Drosophile*. Cependant, la nature moléculaire et le mécanisme de fonctionnement de cet effet reste encore mystérieux actuellement. HEI10 semble être une bonne protéine candidate pour le modèle de coalescence (Morgan et al. 2021, Diezmann & Rog, 2021). Par ailleurs, les derniers travaux de Capilla-Perez et al. (2021) semblent indiquer que ZYP1 est un médiateur important de l'interférence ainsi que de l'hétérochiasmie chez *Arabidopsis*. L'absence d'interférence chez les espèces présentant une absence de CS (*S. pombe*, *Aspergillus*) semble confirmer ces observations. Chez les hybrides AAC, l'interférence semble être très fortement diminuée (Leflon et al. 2010, Pelé et al. 2017). Cependant, contrairement aux mutants *zyp1* d'*Arabidopsis*, ces hybrides présentent le phénomène d'hétérochiasmie, la fréquence de COs étant plus élevée par la voie femelle que mâle, même si la distribution des COs est affectée de la même façon. De plus, l'assemblage de ZYP1 le long des chromosomes A ne semble pas compromis chez les AAC (Leflon et al. 2010). Il est ainsi possible que l'hétérochiasmie soit médiée par ZYP1 chez les AAC mais que cette protéine ne participe peut-être pas (ou dans une moindre mesure) à la modification de la fréquence de recombinaison.





### *I.B.3 La durée de la méiose*

L'impossibilité pour les chromosomes C de former des paires pourrait induire une prolongation du stade pachytène, ce qui pourrait laisser plus de temps pour réparer davantage de CDB en COs par la machinerie de recombinaison, comme cela a été observé chez le vers *C. elegans* lorsqu'une partie de chromosome n'est pas capable de se former (Carlton et al. 2006). Pour étudier ce délai de progression de la prophase, il serait nécessaire de mesurer la durée de la méiose et de ses différentes phases chez les AAC par rapport à ses parents AA et AACC. Pour déterminer la durée de la méiose, il est possible d'utiliser des analogues de la thymidine, (tel que le BrdU ou l'EdU) qui seront incorporés pendant la phase S précédant la méiose. Par la suite, l'immunomarquage de ces analogues de la thymidine sur des méiocytes prélevés à des temps précis permettrait de déterminer la durée des différentes phases de la méiose. Cela a notamment été utilisé chez *Arabidopsis* (Armstrong et al. 2003, Sanchez-Moran et al. 2007, Stronghill et al. 2014). Une autre technique possible est de générer des mutants ayant des tags fluorescents sur quelques protéines clés de la méiose et de suivre par video-microscopie *in planta* le déroulement de la méiose, comme réalisé chez *Arabidopsis* (Prusiki et al. 2019). Comme évoqué précédemment, la transformation du colza et de l'espèce diploïde parentale nécessite beaucoup de temps (1 an par génération) et d'efforts pour générer les transformants, en particulier si le gène est en de nombreuses copies

### I.C Régulations fonctionnelles

Il est probable que les univalents des chromosomes C, qui ne sont pas impliqués dans la recombinaison mais dont les gènes sont fonctionnels dans les hybrides AAC, entraînent des modifications sur les chromosomes A appariés. Ces modifications peuvent être transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles, pouvant affectés des gènes pro ou anti-COs aussi bien que de gènes affectant la structure de la chromatine. Il a été largement démontré que l'hybridation interspécifique induit des modifications (épi)génomiques/transcriptomiques importantes recueillies sous le terme de choc génomique/transcriptomique (Comai 2005 pour revue). Chez les *Brassica*, l'hybridation interspécifique entre un chou et un navet engendre la modification du niveau de transcription de 18 % des gènes (Rousseau-Gueutin et al. comm. pers.). Différents types d'évolution fonctionnelle existent, avec soit i) le niveau de transcription d'un gène est similaire à celui d'un parent (dominance parentale), ii) il peut correspondre à l'addition des niveaux d'expression des parents (additivité) ou iii) présenter un niveau d'expression différent des deux parents (transgressivité) (Grover et al. 2012).



Par ailleurs, il semble que les modifications transcriptomiques sont plus importantes dans le cas d'aneuploïdies, en lien avec les effets dosage et les relations stœchiométriques (Birchler et Veitia 2010). En effet, dans le cadre de complexes multiprotéiques, il existe un équilibre stœchiométrique entre les différentes protéines qui composent le complexe afin de permettre son fonctionnement. L'altération de l'équilibre stœchiométrique de ces différents partenaires protéiques peut affecter le fonctionnement du complexe. Ainsi pour certains phénotypes, le niveau d'expression de certains gènes doit être coordonné pour permettre cet équilibre. Ces gènes sont ainsi soumis à un effet dosage, la modification du dosage de ces gènes étant capable d'induire un phénotype différent.

Pour tenter d'élucider ces effets, nous avons initié une approche qui devrait permettre de répondre à ces questions (Figure 1). Nous avons cultivé sous les mêmes conditions environnementales les deux variétés parentales, *B. rapa* cv. Chiifu et *B. napus* cv. Darmor pour lesquelles nous disposons des génomes assemblés *de novo* (Zhang et al 2018 ; Rousseau-Gueutin et al. 2020) et des boutures des hybrides AAC et AACC qui nous ont permis de réaliser les travaux de cartographie génétique, l'ensemble étant réparti en trois blocs. Après une étude préliminaire de la relation entre taille des boutons et stade de la méiose, nous avons choisi une taille correspondant aux stades leptotène-pachytène par génotype. Les prélèvements ont eu lieu entre 9h et 12h sur les 5 génotypes sur environ 6000 boutons floraux au total. Un sous-échantillon par prélèvement a été conservé de manière à vérifier avant extraction le stade méiotique par cytologie (Figure 1D). Les ADN et ARN des échantillons validés ont été extraits par bloc. Nous avons dans un premier temps validé par RT-PCR et qRT-PCR qu'il était possible à partir de ce matériel d'analyser spécifiquement l'expression de gènes méiotiques (Figure 1E). Nous avons ainsi sélectionné des gènes méiotiques qui étaient exprimés spécifiquement dans les boutons et peu ou pas exprimés dans les tissus somatiques « feuilles » chez *Arabidopsis* (TAIR) et qui étaient présents à l'état de copie unique au sein des génomes de *B. napus* cv. Darmor-bzh v10 (Rousseau-Gueutin et al. 2020) et de *B. rapa* cv. Chiifu (Zhang et al. 2018). Cela nous a permis de sélectionner les gènes OSD1, RMI1 et SWI1. Ces trois gènes sont impliqués dans différents aspects de la méiose. Plus précisément, le gène SWI1 code pour une protéine impliquée dans le maintien de la cohésion des chromatides sœurs pendant la méiose (Yang et al. 2019), tandis que le gène OSD1 participe au contrôle de la transition prophase - méiose I et méiose I- méiose II (Cromer et al. 2012). Quant au gène RMI1, il code pour une topoisomérase impliquée dans la dissolution des intermédiaires de recombinaison (Chelysheva et al. 2008). Les extractions et séquençage d'ADN et d'ARN ont été réalisés afin d'étudier le



méthylome (séquençage bisulfite) et les niveaux de transcription, y compris des petits RNA. Les analyses bioinformatiques sont en cours (L. Maillet comm. pers.).

Evidemment, il aurait été intéressant de n'extraire que les méiocytes. Cependant, le nombre de génotypes et de blocs ont rendu ce travail impossible pour des raisons techniques. Les échantillons en cours d'analyse devraient cependant permettre une première évaluation des régulations en jeu, Walker et al. (2018) ayant montré que seulement 0,6% du génome présente des différences de taux de méthylation entre les feuilles et les méiocytes chez *Arabidopsis*.

### *I.C.1. Impact possible des gènes impliqués dans la méiose*

Des modifications transcriptionnelles de gènes régulateurs de la méiose pourraient aussi expliquer les modifications du profil de recombinaison observé chez les AAC. Par exemple, des modifications du niveau d'expression (ici transcription testée) de gènes pro-COs et sensibles au dosage tel que HEI10 (Ziolkowski et al. 2017), pourraient expliquer l'augmentation de la fréquence de COs de type I observé lors de la méiose mâle des hybrides AAC.

Par ailleurs, il est possible que l'étude de ces modifications transcriptionnelles aboutisse à la découverte de nouveaux facteurs régulant la recombinaison, soit spécifiques des plantes, soit des polyploïdes ou des Brassica.

Il est également possible qu'un mécanisme de compensation de dose soit mis en place pour le génome C qui est sous forme haploïde. Ainsi les hybrides AAC pourraient avoir un profil transcriptomique similaire à un colza AACC. Si c'est le cas, il est possible que pendant la méiose la machinerie de recombinaison soit transcrite pour permettre la recombinaison homologue entre les chromosomes AA et CC comme chez un allotétraploïde mais qui est mise à profit uniquement pour les chromosomes A qui sont les seuls à pouvoir s'apparier dans les hybrides AAC. Dans ce cas, le niveau de recombinaison global entre un colza et un allotriploïde AAC doit être similaire, bien que seulement dix chromosomes A soient capables de recombiner chez les AAC. Dans ce cas, la fréquence de recombinaison estimée par le nombre de foci HEI10, des allotétraploïdes AACC devrait être similaire au nombre de foci HEI10 chez un allotriploïde, au niveau global.

Dans le cas où une absence de modifications transcriptomiques est observée, il faudra tout de même vérifier la quantité de protéines de certains gènes clés de la méiose. En effet, le niveau transcriptionnel ne reflète pas toujours la quantité de protéines fonctionnelles d'un gène. Pour pouvoir tester cela, il serait intéressant de réaliser un dosage semi-quantitatif par western-blot sur des extractions de protéines totales de méiocytes, des approches protéomiques ayant été



déjà réalisées chez *Arabidopsis* et le chou (Sanchez-Moran et al. 2005, Osman et al. 2018) ou encore la navette (Yang et al. 2019).

Chez *Arabidopsis thaliana* la combinaison du KO des gènes anti-COs recQ4 à l'ajout d'une copie de HEI10 est capable d'induire une augmentation de la fréquence de recombinaison de 4,1 (Serra et al. 2018). Il serait donc intéressant de déterminer si la combinaison de la structure allotriploïde AAC avec des modifications de gènes clés peut permettre d'augmenter davantage la fréquence de recombinaison, ou s'il existe un plateau seuil. Il serait par exemple pertinent d'augmenter le nombre de copies HEI10 pour augmenter la fréquence de COs de classe I, et de combiner cela avec le KO des gènes anti-COs tels que FANCM, FIGL, FLIP pour augmenter les COs de classe II. De plus, ce système permettrait également de déterminer l'implication de chacun de ses facteurs dans le profil de recombinaison de hybrides AAC.

Un facteur qui pourrait jouer sur la fréquence de recombinaison chez les hybrides de seconde génération est la transmission ou non d'allèles de gènes de méiose favorables à la recombinaison avec des effets en trans. En effet, les hybrides B1F1 sont partiellement hétérozygotes le long du génome, ainsi pour ces régions ils présentent les allèles de *B. napus* et de *B. rapa*, tandis que, pour les régions homozygotes, ils possèdent l'allèle du parent *B. napus* en deux copies. Comme des variations alléliques de régulateur trans de la fréquence de recombinaison sont capables de moduler la fréquence globale de recombinaison (tel que HEI10 chez *Arabidopsis* (Ziolkowski et al. 2017)), il serait intéressant de déterminer quels sont les allèles des différents gènes impliqués dans la méiose au sein des hybrides B1F1.

### *I.C.2. Impact possible des modifications de la structure de la chromatine*

La méthylation de l'ADN est un facteur régulant la distribution de la recombinaison chez le colza, une corrélation négative existant entre le taux de méthylation et la fréquence de recombinaison. Ainsi, les régions proches des centromères présentent un fort taux de méthylation et un très faible taux de recombinaison comme nous l'avons montré chapitre IV. Nous avons pu montrer chez les AAC, indépendamment de la génération étudiée, qu'il y avait la formation de COs dans les régions proches des centromères, au contraire des hybrides allotétraploïdes AACC semi-synthétiques ou issus de colza cultivés. Il serait donc intéressant d'étudier le profil de méthylation de l'ADN de ces hybrides au sein des méiocytes. Cela permettrait de déterminer si le profil de méthylation de l'ADN est différent chez les hybrides AAC comparés aux allotétraploïdes AACC, et dans quelle mesure il peut expliquer la modification du profil de recombinaison des hybrides AAC.





Ce travail est actuellement en cours à partir des mêmes échantillons de boutons floraux présentés précédemment pour l'étude transcriptomique comparative (Figure 1). Des modifications transcriptionnelles de gènes régulateurs de la méthylation de l'ADN, tels que ceux responsables du maintien de la méthylation ou ceux responsables de la méthylation *de novo*, pourraient être responsables des modifications du profil de méthylation, comme cela a été observé pour les mutants KO de CMT3 et DDM1 chez *Arabidopsis* (Underwood et al. 2018, Melamed-Bessudo et al. 2012).

Par ailleurs, les régions proches des centromères ne sont pas définies uniquement par leur fort taux de méthylation de l'ADN, ce sont aussi des régions riches en la marque d'histone H3K9me2 et pauvre en marque H3K4me3. Un moyen de déterminer le profil en marques histones le long de chromosomes au stade pachytène est de réaliser de l'immunomarquage contre ces marques, combiné avec du BAC-FISH utilisant une sonde spécifique des centromères (telles que CentBr 1 & 2 chez les *Brassica*, Harrison & Heslop-Harrison 1994, Xiong & Pires, 2011), comme cela a pu être réalisé chez *Arabidopsis* et le maïs (Zhang et al. 2008). Des approches de ChIP-seq dirigées contre ces marques d'histones permettraient quant à elles d'établir le profil de ces marques de la chromatine le long du génome et de déterminer les corrélations entre ces profils et le profil de recombinaison.

## II. Modifications structurales

### II.A. Résultats

L'utilisation des mêmes génotypes A pour comparer les profils de recombinaison entre des hybrides AAC et AACC exclut que des variations structurales expliquent les différences observées. En revanche, nous avons démontré que des variations du taux de méthylation ou des variations structurales spécifiques à chaque génotype expliquent l'absence de recombinaison dans certaines régions, quel que soit le niveau de ploïdie. La situation est différente en seconde génération (B1F1). Dans ce cas, nous avons observé, de façon assez surprenante, une augmentation de la fréquence de recombinaison quel que soit le niveau de ploïdie, qui pourrait être liée au fait que chaque plante B1F1 est unique avec environ 50% de régions à l'état hétérozygote.

### II.B. Variations structurales

Nous avons pu montrer au travers de ce manuscrit que les variations structurales de type inversion chromosomique étaient capables de prévenir la formation de COs chez le colza et qu'elles sont également l'un des facteurs limitant des AAC.



L'utilisation d'une carte génétique de colza à très haute densité de marqueurs génétiques (comme par exemple le séquençage faible profondeur d'une population en ségrégation) permettrait d'étudier beaucoup plus finement l'impact des autres types de variations structurales, y compris celles de petites tailles sur le profil de recombinaison. Nous avons montré (Boutte et al. 2020) qu'une importante diversité structurale existe entre accessions de *B. rapa*. En effet, en comparant deux variétés assemblées *de novo*, cv. Chiifu et cv. Z1, on a pu observer de larges variations structurales sur les chromosomes A05, A06, A09 et A10. Par exemple sur le chromosome A06, une insertion de 55 à 29 Mb est suffisamment grande pour être détectable par FISH dans l'hybride F1 entre Chiifu et Z1, une différence de 17,6% de taille étant détectée entre les chromosomes A06 de chaque variété. Par ailleurs, la mesure de la quantité d'ADN par cytométrie en flux de 12 variétés de *B. rapa* de la core collection révèle 16% de variation de taille de génome entre variétés. Des observations similaires ont été réalisées par Song et al. (2020) par établissement d'un pangénome à partir de 8 génomes assemblés de variétés de colza. Ces auteurs montrent la présence de millions de petites variations qui couvrent 77,6 à 149,6 Mb, avec plus 9,4% des gènes contenant des mutations ou des variations structurales. L'existence de ces variations sont donc à prendre en compte lorsque l'on cherche à brasser la diversité génétique à chaque génération, y compris par la voie AAC.

### II.C. Augmentation de la recombinaison en seconde génération

Cette augmentation à la fois au niveau du taux de recombinaison dans les régions hétérozygotes et du nombre total de foci HEI10 pourrait avoir plusieurs origines. Nos résultats semblent exclure un effet de taille de la région hétérozygote, puisqu'il y a des résultats divergents entre AAC et AACC. La position de la région le long du chromosome, relativement à sa taille pourrait également jouer un rôle, étant donné que les régions proches des centromères sont contrastées pour la formation de COs entre les hybrides AAC et les hybrides AACC. L'analyse de ces données est en cours d'étude. Par ailleurs, Ziolkowski et al. (2015) ont rapporté que la juxtaposition de régions hétérozygotes et homozygotes tend à augmenter la fréquence de COs dans ces premières. Nous avons montré que la présence d'au moins une bordure à l'état homozygote pourrait affecter la recombinaison. Nous sommes en train de vérifier si l'interférence est modifiée au moins à partir du matériel AACC, étant donné que cette dernière est déjà très faible dans les hybrides AAC.



Le polymorphisme SNP semble également être un déterminant important de la distribution de la recombinaison à une échelle locale (Blackwell et al. 2020), mais ne semble pas avoir d'impact à l'échelle du mégabase (Lian et al. 2022). Ici, nous avons utilisé des génotypes parentaux identiques et séquencés pour produire les différents hybrides, ce qui permet de s'abstenir d'un quelconque effet différentiel lié à la séquence lorsque que nous comparons les mêmes régions chromosomiques entre les différents hybrides. Cependant, il est possible que le taux de polymorphisme SNP au sein des régions hétérozygotes des hybrides B1F1 ait un impact sur la fréquence de recombinaison de ses régions. Il sera donc important de prendre en compte cette variable dans l'étude des facteurs impactant la fréquence de recombinaison dans les régions hétérozygotes des hybrides B1F1.

Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si le polymorphisme SNP peut avoir un impact sur la fréquence de recombinaison. Ainsi, nous pourrions réaliser de l'immunomarquage de la protéine HEI10 sur des méiocytes au stade pachytène d'un hybride allotriploïde AAC homozygote tout le long du génome A, issus du croisement entre le colza *B. napus* cv. Darmor et d'une plante diploïde AA contenant le génome A extrait du colza cv. Darmor sous la forme diploïde (Pelé et al. 2017). Nous pourrions ainsi comparer ces résultats avec ceux obtenus chez l'hybride AAC F1 hétérozygote tout le long du génome. D'une manière similaire on pourra comparer la fréquence de recombinaison au sein de deux variétés de colza qui sont donc 100% homozygote, à un hybride F1 issu du croisement entre ces deux variétés qui sera donc 100% hétérozygote. Cela permettra de déterminer si présence de SNP est capable de moduler la fréquence de recombinaison à l'échelle du génome entier chez les allotétraploïdes AACC.

### **III. Maintien, réversibilité du phénotype et exploitation en amélioration des plantes**

#### III.A. Résultats

La possibilité de restaurer les contrôles méiotiques en retrouvant une structure AACC indique également que la voie AAC est un système dominant réversible. Cela met en évidence que les équilibres fonctionnels sont restaurés, ce que devrait nous révéler les expérimentations en cours (Figure 1) en précisant quels sont les gènes et/ou les modifications épigénétiques affectés. Par ailleurs, en guise de témoin, nous sommes en train de réaliser la cartographie du génome C à partir des plantes AACC de première et de seconde génération, cette dernière présentant ~50% d'hétérozygotie sur son génome C. Le fait que la voie AAC est dominante et réversible est intéressante dans le cadre de l'amélioration variétale du colza.



En effet, nous avons pu montrer qu'un hybride allotétraploïde AACCC issu d'un hybride F1 AAC présente une méiose relativement régulière avec une quantité de graines par silique comparable à celle de colzas cultivés (Yang et al. 2017).

### III.B. Perspectives pour l'utilisation de la voie triploïde grâce à la réversibilité du système

#### *III.B.1. Exploitation de la voie AAC*

La première exploitation envisageable est l'introduction d'une nouvelle diversité dans le colza à partir de son espèce progénitrice, la navette (*B. rapa*). La voie allotriploïde AAC a déjà été utilisée dans l'amélioration du colza par le passé. On peut citer par exemple le colza ZS11, qui est issu d'un croisement initial entre une variété de colza et une navette (Pan et al. 2019), et qui présente un très bon rendement et une très bonne qualité de l'huile (Sun et al. 2017). De même, des gènes majeurs de résistance à la Nécrose du collet due à *Leptosphaeria maculans* ont été introduits depuis la navette dans le colza (Leflon et al. 2007 ; Balesdent et al. 2013). Dans le cadre de projets conduits actuellement dans l'équipe, des sources de résistance à l'Orobanche et au *Verticillium* absentes du colza ont été identifiées chez des navettes et pourraient être introduites dans le colza. De même, des recherches sont initiées vis-à-vis de la résistance aux insectes en lien avec le métabolisme des plantes ou de l'adaptation aux contraintes climatiques, cette espèce diploïde étant présente du nord de l'Europe à la zone subsaharienne (Projet H2020 Prima, BrasExplor).

Nous avons montré que cette voie AAC permet d'augmenter le nombre de régions introduites dans le colza en réduisant leur taille (Boideau et al. 2021). Sur la base des données de cartographie génétique et via des modèles mathématiques, Tourrette et al. (2019) ont comparé les gains génétiques sur 20 générations en augmentant le taux de recombinaison comme dans le cas du modèle riz avec le KO de gènes anti-COs ou en modifiant la fréquence et la distribution des COs dans le cas du modèle AAC. Leurs résultats montrent que le gain génétique est plus important (34%) dans le cas du modèle AAC lorsque les gènes à introgresser se trouvent en régions froides pour la recombinaison et que cet effet n'est visible qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> à 5<sup>ème</sup> génération. Leurs analyses complémentaires (Tourrette et al. 2021) montrent que le système AAC permet une diminution du déséquilibre de liaison de 10% en deux générations lorsqu'il y a une sélection du fond génétique et que le QTL d'intérêt se trouve en région péricentromérique. En revanche, l'augmentation de la recombinaison dans des régions riches en COs devient préjudiciable, ne permettant pas de maintenir aisément les allèles favorables des différents





gènes dans un même génotype. Il restera à intégrer dans ce modèle l'augmentation de recombinaison que nous avons observé en seconde génération.

De façon réciproque, nous avons également montré (Boideau et al. 2021) que la stratégie AAC permet de réduire l'intervalle de confiance de QTL identifié dans le colza mais impossible à modifier du fait de l'absence de COs dans un contexte AACC. Au regard de nos résultats, nous pouvons imaginer qu'une approche de clonage de gènes par marche chromosomique peut être facilitée par la voie AAC soit (i) en étudiant de large populations (~300 plantes seraient suffisantes alors qu'il en faudrait plus de 1000 à partir d'un allotétraploïde AACC) à partir d'un hybride AAC contenant le gène d'intérêt, soit (ii) en sélectionnant sur plusieurs générations des plantes AAC présentant une réduction de la taille de l'intervalle dans la région portant le gène. La première stratégie est en cours d'application au sein de l'équipe pour identifier des marqueurs génétiques les plus proches possibles du gène *Rlm11*, conférant une résistance au pathogène *Leptosphaeria maculans*.

Par ailleurs, la fréquence importante de recombinaison des AAC présente un outil intéressant pour l'assemblage de génomes, les technologies de séquençage grande longueur nécessitant encore aujourd'hui les cartes génétiques pour parfaire et valider l'assemblage des scaffolds en pseudomolécules. Ainsi une cartographie génétique par séquençage d'une population de AAC permettrait d'améliorer encore davantage la qualité des génomes A de *B. napus* et de *B. rapa*, du fait de la présence de recombinaison dans les régions proches des centromères. En effet, une carte génétique issue de ces hybrides AAC permettrait d'augmenter la précision vis-à-vis de l'orientation des scaffolds dans ces régions peu recombinantes chez des euploïdes. Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée pour améliorer l'assemblage de la variété de colza Darmor (Rousseau-Gueutin et al. 2020).

### III.B.2. Exploitation de la voie allotriploïde avec d'autres espèces de Brassica

Si la modification des contrôles de la recombinaison est liée à la présence de chromosomes non appariés, le modèle devrait également être opérationnel en croisant le colza avec son autre espèce progénitrice, le chou (*B. oleracea*). Ces hybrides colza x chou (ACC,  $2n=3x=28$ ) possèdent une méiose qui semble davantage perturbée comparée aux hybrides AAC, avec la formation de quelques multivalents entre chromosomes A et C et la présence de « lagging chromosomes » en anaphase I et anaphase II (Yang et al. 2017). Cependant, au cours de mon stage de Master 1, j'ai pu observer que le comportement méiotique de ces hybrides était assez stable sans la présence de multivalents.

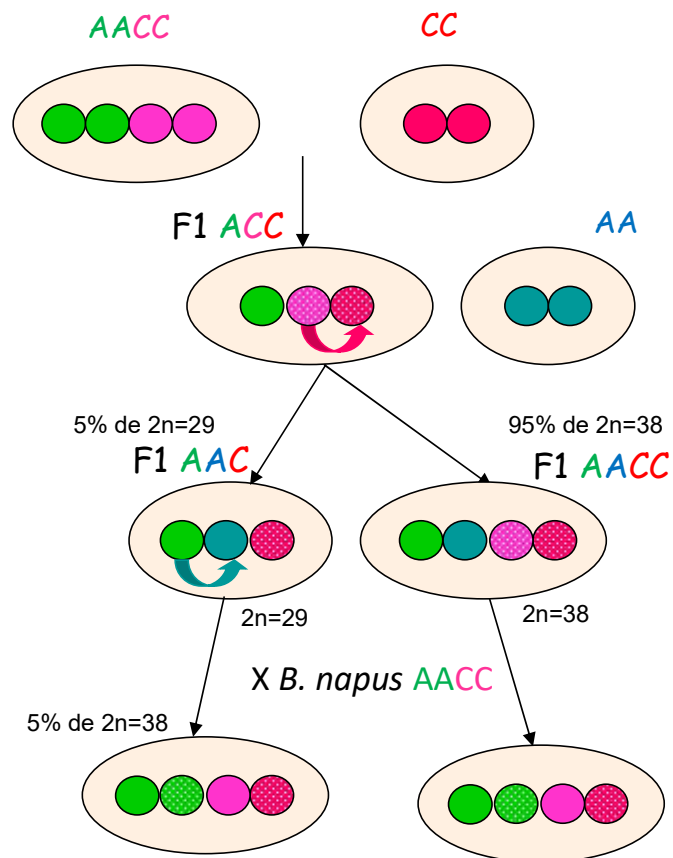


Figure 2 : Schéma d'exploitation de la recombinaison à partir des hybrides ACC et AAC

De plus, les premiers résultats de cartographie génétique semblent indiquer une augmentation de la fréquence de recombinaison homologe entre les chromosomes C, mais cette étude est actuellement reprise avec la production d'hybrides ACC issus du croisement entre les variétés ayant un génome séquencé et assemblé de *B. oleracea* cv. HDEM (Belser et al. 2018) et de *B. napus* cv. Darmor (Rousseau-Gueutin et al. 2020) (M. Rousseau-Gueutin et al. comm. pers.). De façon assez surprenante, ces hybrides ne présentent pas une ségrégation aléatoire des chromosomes A dans la descendance mais principalement deux types de gamètes, les gamètes réduits ( $\sim$ AC, minoritaires,  $\sim$ 5%) ou les gamètes non réduits (ACC, majoritaires,  $\sim$ 95%). Il est donc possible d'imaginer une double introduction de la diversité des deux progéniteurs en exploitant une optimisation de la recombinaison selon le schéma présenté Figure 2. A partir d'hybrides ACC, les gamètes de structure  $\sim$ AC permettent, après croisement par la navette *B. rapa* (AA), de sélectionner des hybrides AAC. L'enchaînement des deux voies triploïdes devrait permettre d'optimiser la recombinaison sur les deux sous-génomes. Par ailleurs, la sélection de plantes issues de gamètes ACC permettra elle de restaurer directement une structure AACC, après croisement par la navette AA. Cette stratégie est actuellement en cours d'étude dans le cadre d'un projet GIE (R. Delourme comm. pers.) pour introduire dans le colza des gènes de résistance à différentes maladies, portés par le chou et la navette.

Par ailleurs, les allotriploïdes AAC et CCA peuvent également permettre d'améliorer les variétés diploïdes. En effet, la voie allotriploïde CCA a déjà été utilisée avec succès dans l'amélioration du chou, notamment pour l'introgession du gène de restauration de la fertilité mâle (Rfo) depuis le colza via des backcross successifs de l'hybride CCA par du chou (Yu, 2020).

D'une manière similaire aux hybrides AAC et ACC, les hybrides issus des croisements interspécifiques entre les autres allotétraploïdes *Brassica* avec leurs progéniteurs diploïdes, c'est-à-dire les hybrides allotriploïdes AAB, BBC, BBA et CCB, doivent être possibles à produire. Il serait donc intéressant d'investiguer le profil de recombinaison chez ces hybrides afin de déterminer si la présence de chromosomes à l'état d'univalents provenant d'un génome plus ou moins divergent impacte différemment le profil de recombinaison homologe observé chez les allotriploïdes.



### III.B.3. Autotriploïdes *Brassica*

Chez les Brassica, il est possible de doubler artificiellement le génome des diploïdes, permettant ainsi de produire des autotétraploïdes qui sont relativement stables en méiose, présentant peu de multivalents et d'univalents (Chevre et al. 1989). Ainsi il est possible de générer des hybrides allotriploïdes AAA ou CCC en croisant les autotétraploïdes (certains ont déjà été créés dans l'équipe par doublement colchicine) avec des diploïdes issus de la même espèce (Howard, 1939). Le comportement méiotique de ces hybrides reste à déterminer. S'il y a une formation majoritaire de trivalents comme cela a été observé par Barbara McClintock chez des autotriploïdes de maïs (McClintock, 1929), il est possible qu'il n'y ait pas d'augmentation de la recombinaison homologe à proprement parler. Dans le cas où il y aura une majorité de bivalents et qu'un des jeux de chromosomes reste sous forme d'univalents et si la présence d'un sous-génome non apparié induit un retard de la prophase permettant une augmentation de la fréquence de recombinaison entre chromosomes appariés, alors on devrait pouvoir observer une augmentation de la fréquence de recombinaison.

### III.B.4. Triploïdes avec des génomes distants

Si le facteur influençant principalement le profil de recombinaison des AAC est la présence d'un sous-génome non apparié qui retarde la prophase, alors la présence d'un sous-génome même distant et n'appartenant pas au genre *Brassica* serait capable de modifier le profil de recombinaison. Il est possible de réaliser des hybridations interspécifiques entre le colza et la moutarde blanche *Sinapis alba* (Chevre et al. 1994). Il serait donc intéressant de réaliser des hybrides *B. rapa* x *S. alba* et de produire un hybride AASal en croisant l'hybride F1 obtenu avec une autre navette, permettant de réaliser de la cartographie génétique sur le génome A en présence du sous-génome de *S. alba*.

### III.B.5. Exploitation chez d'autres espèces

Ce modèle de niveau interploïde est possiblement transposable à d'autres modèles. Chez le blé il est possible de réaliser des hybrides allopolyploïdes (AABB $D$ ,  $2n=5x=35$ ) issus du croisement entre le blé tendre hexaploïde (AABB $DD$ ,  $2n=6x=42$ ) et le blé dur allotétraploïde (AABB,  $2n=4x=28$ ). Chez ces hybrides possédant un niveau intermédiaire de ploïdie comme les hybrides AAC, il semble que la recombinaison homologe soit augmentée par rapport aux hybrides euploïdes (données non publiées mais citées par Wan et al. 2021).



Chez le café, le croisement entre l'allotétraploïde *Coffea arabica* ( $2n=4x=44$ ) et des diploïdes ( $2n=2x=22$ ) permet de produire des hybrides allotriploïdes viables mais peu fertiles. Le nombre moyen de chiasmata chez les allotriploïdes est similaire à celui d'un diploïde, indiquant une absence de modification de la fréquence de recombinaison (Herrera et al. 2012). Néanmoins, la voie triploïde a été utilisée avec succès pour introgresser de la diversité du diploïde *C. canephora* au sein du tétraploïde *C. arabica* (Herrera et al. 2002).

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux ont permis d'en apprendre davantage sur le profil de recombinaison unique des allotriploïdes AAC *Brassica*. Ils ouvrent notamment de nouvelles perspectives dans l'équipe sur l'étude des processus biologiques ou acteurs moléculaires responsables de ce phénotype original. Par ailleurs, nous avons pu montrer que cette voie est particulièrement intéressante dans le cadre de l'amélioration variétale du colza et elle est actuellement exploitée dans ce sens au sein de notre équipe.





## **Annexes**



## Annexes

Au cours de ma thèse et en lien avec la richesse scientifique présente au sein de mon laboratoire d'accueil, j'ai eu la chance de pouvoir participer en tant que co-auteur à quatre articles scientifiques, en lien avec mon travail de thèse et qui ne sont présentés qu'en annexe au sein de ce manuscrit.

### 1) Une machine à recombinaison chez les *Brassica* (Chèvre et al. 2020)

L'objectif de cet article a été d'exposer les dernières avancées concernant les connaissances fondamentales et l'utilisation du modèle AAC pour l'amélioration variétale du colza auprès de l'Association des Sélectionneurs Français en 2020. J'ai ainsi participé à l'établissement du plan, à l'élaboration des figures et à l'amélioration du premier draft du manuscrit établi par Anne-Marie.

### 2) Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa* (Boutte et al. 2020)

Au travers de cet article, nous avons exploré la diversité génomique intraspécifique présente entre deux variétés séquencées de *B. rapa* et au sein d'une core collection. J'ai participé aux différentes discussions scientifiques, proposé et participé à différentes expériences (cytogénétique), puis contribuer à l'amélioration de la première version du manuscrit.

### 3) Long-read assembly of the Brassica napus reference genome Darmor-bzh (Rousseau-Gueutin et al. 2020)

Dans ce papier, notre équipe, en collaboration avec le Génoscope (Evry), a utilisé les dernières avancées technologiques en matière de séquençage ADN de grande longueur afin de réaliser une mise à jour du génome de référence colza *B. napus* cv. Darmor-bzh. Au sein de cet article, j'ai utilisé la carte génétique issue de l'hybride allotriploïde AAC 3x-F1 pour confirmer l'assemblage et l'orientation des scaffolds en pseudomolécules, notamment dans les régions génomiques présentant pas ou peu de recombinaison sur la carte colza disponible. J'ai également contribué à la détermination des bornes des régions centromériques.



4) Sequencing and Chromosome-Scale Assembly of Plant Genomes, *Brassica rapa* as a Use Case (Istace et al. 2021)

En collaboration avec le Génoscope, notre équipe a réalisé une mise à jour du génome de référence de la navette *B. rapa* cv. Z1 en utilisant et comparant différentes techniques d'assemblage de génome. Dans cet article j'ai réalisé la carte génétique F2 issue d'un hybride F1 entre *B. rapa* cv. Z1 et *B. rapa* cv. Chiifu, les deux variétés de navettes ayant un génome séquencé et assemblé *de novo* avec les technologies de séquençage grande longueur. Cette carte génétique a par la suite permis l'assemblage et l'orientation des scaffolds en pseudomolécules.

La première page de chacun de ces articles est présentée ci-après.



## UNE MACHINE A RECOMBINER CHEZ LES BRASSICA

Anne-Marie CHEVRE, Franz BOIDEAU, Alexandre PELE, Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN  
Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, INRAE, Agrocampus Ouest,  
Université de Rennes, BP35327, 35653 LE RHEU cedex  
[anne-marie.chevre@inrae.fr](mailto:anne-marie.chevre@inrae.fr) ; [Franz.Boideau@inrae.fr](mailto:Franz.Boideau@inrae.fr) ; [Alexandre.Pele@outlook.fr](mailto:Alexandre.Pele@outlook.fr) ;  
[mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr](mailto:mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr)

### RESUME

La recombinaison méiotique est le principal mécanisme permettant de brasser la diversité génétique à chaque génération. Il permet aux sélectionneurs de réunir dans une même variété les allèles favorables. Cependant, le nombre et la distribution des crossovers sont très régulés, limitant les échanges entre chromosomes homologues à chaque génération. Dans le cas du modèle *Brassica*, nous avons montré sur le chromosome A07 que la fréquence de crossovers est très significativement augmentée chez les hybrides AAC issus de l'hybridation entre le colza (*B. napus*, AAC,  $2n=38$ ) et l'un de ses progéniteurs, la navette (*B. rapa*, AA,  $2n=20$ ). En exploitant le récent séquençage des génomes de ces espèces, nous avons voulu comparer à l'échelle globale du génome le profil de recombinaison homologue sur l'ensemble du génome A chez un hybride allotriploïde (AAC) par rapport à un hybride diploïde (AA) présentant les mêmes génotypes A. Plus précisément, nous avons analysé (i) la fréquence et la distribution des crossovers, (ii) l'impact de la méiose mâle ou femelle, (iii) du fond génétique et (iv) enfin du niveau de ploïdie. L'ensemble de ses résultats ouvrent de nombreuses perspectives pour élucider les mécanismes de régulation de la méiose et élargir la diversité génétique du colza.

**Mots clefs :** Recombinaison, fréquence et distribution des crossovers, Brassica

### 1- INTRODUCTION

La recombinaison, qui permet le brassage de l'information génétique via les crossovers en méiose, est le principal outil pour générer de la diversité à chaque génération. Elle est strictement régulée (Voir article E. Jenczewski). Le nombre de crossovers est très restreint entre chaque paire de chromosomes homologues, un crossover obligatoire pour assurer la bonne ségrégation des chromosomes et rarement trois, quelle que soit la taille du chromosome (Mercier et al. 2015). Par ailleurs, la distribution des crossovers n'est pas homogène le long des chromosomes, un gradient décroissant étant observé du télomère à la région centromérique qui en est dépourvue. Ce contrôle complique la création variétale obligeant à travailler sur des populations de grande taille pour obtenir l'évènement rare qui va permettre de réunir dans une même plante certaines combinaisons alléliques souhaitées. Cependant, les régions génomiques péricentromériques sont impossibles à brasser, du fait de l'absence de recombinaison. Dans le cas du modèle *Brassica*, nous avons montré qu'il était possible de modifier ces règles. En croisant le colza allotétraploïde (*B. napus*, AAC,  $2n=38$ ) avec l'un de ses progéniteurs diploïdes, la navette (*B. rapa*,  $2n=20$ ), Leflon et al. (2010) ont observé que la fréquence de recombinaison homologue sur le chromosome A07 est multipliée par un facteur 2 chez un hybride allotétraploïde (AAC) par rapport à un hybride diploïde (AA), mais par un facteur 4 à 6 chez un hybride allotriploïde (AAC) par rapport au même hybride diploïde (AA). Il est à noter que ces trois individus de niveau de ploïdie différent présentent les mêmes génotypes AA, permettant une comparaison sans aucun biais de leurs profils de recombinaison. Nous avons tiré parti de l'assemblage *de novo* à la fois d'une variété de colza, Darmor (Chalhoub et al. 2014) et d'une variété de navette, Chiifu (Wang et al. 2011) pour comparer la fréquence et la distribution des







# Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*

Julien Boutte<sup>1\*</sup>, Loeiz Mailet<sup>1</sup>, Thomas Chaussepied<sup>1</sup>, Sébastien Letort<sup>2</sup>, Jean-Marc Aury<sup>3</sup>, Caroline Belsler<sup>3</sup>, Franz Boideau<sup>1</sup>, Anael Brunet<sup>1</sup>, Olivier Coriton<sup>1</sup>, Gwenaëlle Deniot<sup>1</sup>, Cyril Falentin<sup>1</sup>, Virginie Huteau<sup>1</sup>, Maryse Lodé-Taburel<sup>1</sup>, Jérôme Morice<sup>1</sup>, Gwenn Trotoux<sup>1</sup>, Anne-Marie Chèvre<sup>1</sup>, Mathieu Rousseau-Gueutin<sup>1</sup> and Julie Ferreira de Carvalho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, Le Rheu, France, <sup>2</sup> IRISA/INRIA, Campus de Beaulieu, Rennes, France, <sup>3</sup> Génomique Métabolique, Genoscope, Institut de biologie François-Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Ruslan Kalendar,  
University of Helsinki, Finland

### Reviewed by:

Ryo Fujimoto,  
Kobe University, Japan  
Xianhong Ge,  
Huazhong Agricultural University,  
China

### \*Correspondence:

Julien Boutte  
boutte.julien@gmail.com  
Julie Ferreira de Carvalho  
julie.ferreira-de-carvalho@inrae.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Systematics and Evolution,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

Received: 29 June 2020

Accepted: 24 September 2020

Published: 12 November 2020

### Citation:

Boutte J, Mailet L, Chaussepied T, Letort S, Aury J-M, Belsler C, Boideau F, Brunet A, Coriton O, Deniot G, Falentin C, Huteau V, Lodé-Taburel M, Morice J, Trotoux G, Chèvre A-M, Rousseau-Gueutin M and Ferreira de Carvalho J (2020) Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. *Front. Plant Sci.* 11:577536. doi: 10.3389/fpls.2020.577536

Traditionally, reference genomes in crop species rely on the assembly of one accession, thus occulting most of intraspecific diversity. However, rearrangements, gene duplications, and transposable element content may have a large impact on the genomic structure, which could generate new phenotypic traits. Comparing two *Brassica rapa* genomes recently sequenced and assembled using long-read technology and optical mapping, we investigated structural variants and repetitive content between the two accessions and genome size variation among a core collection. We explored the structural consequences of the presence of large repeated sequences in *B. rapa* 'Z1' genome vs. the *B. rapa* 'Chiifu' genome, using comparative genomics and cytogenetic approaches. First, we showed that large genomic variants on chromosomes A05, A06, A09, and A10 are due to large insertions and inversions when comparing *B. rapa* 'Z1' and *B. rapa* 'Chiifu' at the origin of important length differences in some chromosomes. For instance, lengths of 'Z1' and 'Chiifu' A06 chromosomes were estimated *in silico* to be 55 and 29 Mb, respectively. To validate these observations, we compared using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) the two A06 chromosomes present in an F1 hybrid produced by crossing these two varieties. We confirmed a length difference of 17.6% between the A06 chromosomes of 'Z1' compared to 'Chiifu.' Alternatively, using a copy number variation approach, we were able to quantify the presence of a higher number of rDNA and gypsy elements in 'Z1' genome compared to 'Chiifu' on different chromosomes including A06. Using flow cytometry, the total genome size of 12 *Brassica* accessions corresponding to a *B. rapa* available core collection was estimated and revealed a genome size variation of up to 16% between these accessions as well as some shared inversions. This study revealed the contribution of long-read sequencing of new accessions belonging to different cultigroups of *B. rapa* and highlighted the potential impact of differential insertion of repeat elements and inversions of large genomic regions in genome size intraspecific variability.

**Keywords:** *Brassica*, genome evolution, transposable elements, LTR Gypsy, intraspecific diversity, ribosomal DNA





## DATA NOTE

# Long-read assembly of the *Brassica napus* reference genome Darmor-bzh

Mathieu Rousseau-Gueutin <sup>1,\*†</sup>, Caroline Belser <sup>2,†</sup>, Corinne Da Silva <sup>2,†</sup>, Gautier Richard <sup>1</sup>, Benjamin Istace <sup>2</sup>, Corinne Cruaud<sup>3</sup>, Cyril Falentin <sup>1</sup>, Franz Boideau<sup>1</sup>, Julien Boutte<sup>1</sup>, Regine Delourme <sup>1</sup>, Gwenaëlle Deniot<sup>1</sup>, Stefan Engelen <sup>2</sup>, Julie Ferreira de Carvalho <sup>1</sup>, Arnaud Lemainque<sup>3</sup>, Loeiz Maillet <sup>1</sup>, Jérôme Morice<sup>1</sup>, Patrick Wincker <sup>2</sup>, France Denoëud <sup>2</sup>, Anne-Marie Chèvre <sup>1</sup> and Jean-Marc Aury <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>IGEPP, INRAE, Institut Agro, Université de Rennes, Domaine de la Motte, 35653 Le Rheu, France; <sup>2</sup>Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France and <sup>3</sup>Genoscope, Institut François Jacob, Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Université Paris-Saclay, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France

\*Correspondence address. Mathieu Rousseau-Gueutin, IGEPP, INRAE, Institut Agro, Université de Rennes, Domaine de la Motte, 35653 Le Rheu, France. E-mail: [mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr](mailto:mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr)  <http://orcid.org/0000-0002-1130-1090>; and Jean-Marc Aury, Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France. E-mail: [jmaury@genoscope.cns.fr](mailto:jmaury@genoscope.cns.fr)  <http://orcid.org/0000-0003-1718-3010>

†Equal contribution.

## Abstract

**Background:** The combination of long reads and long-range information to produce genome assemblies is now accepted as a common standard. This strategy not only allows access to the gene catalogue of a given species but also reveals the architecture and organization of chromosomes, including complex regions such as telomeres and centromeres. The *Brassica* genus is not exempt, and many assemblies based on long reads are now available. The reference genome for *Brassica napus*, Darmor-bzh, which was published in 2014, was produced using short reads and its contiguity was extremely low compared with current assemblies of the *Brassica* genus. **Findings:** Herein, we report the new long-read assembly of Darmor-bzh genome (*Brassica napus*) generated by combining long-read sequencing data and optical and genetic maps. Using the PromethION device and 6 flowcells, we generated ~16 million long reads representing 93× coverage and, more importantly, 6× with reads longer than 100 kb. This ultralong-read dataset allows us to generate one of the most contiguous and complete assemblies of a *Brassica* genome to date (contig N50 > 10 Mb). In addition, we exploited all the advantages of the nanopore technology to detect modified bases and sequence transcriptomic data using direct RNA to annotate the genome and focus on resistance genes. **Conclusion:** Using these cutting-edge technologies, and in particular by relying on all the advantages of the nanopore technology, we provide the most contiguous *Brassica napus* assembly, a resource that will be valuable to the *Brassica* community for crop improvement and will facilitate the rapid selection of agronomically important traits.





Received: 22 July 2020; Revised: 18 September 2020; Accepted: 9 November 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press GigaScience. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



## Article

# Sequencing and Chromosome-Scale Assembly of Plant Genomes, *Brassica rapa* as a Use Case

Benjamin Istace <sup>1,†</sup>, Caroline Belser <sup>1,†</sup>, Cyril Falentin <sup>2</sup>, Karine Labadie <sup>3</sup>, Franz Boideau <sup>2</sup>,  
Gwenaëlle Deniot <sup>2</sup>, Loeiz Maillat <sup>2</sup>, Corinne Cruaud <sup>3</sup>, Laurie Bertrand <sup>1</sup>, Anne-Marie Chèvre <sup>2</sup>, Patrick Wincker <sup>1</sup>,  
Mathieu Rousseau-Gueutin <sup>2</sup> and Jean-Marc Aury <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Univ Evry, Université Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France; bistace@genoscope.cns.fr (B.I.); cbelser@genoscope.cns.fr (C.B.); lbertrand@genoscope.cns.fr (L.B.); pwincker@genoscope.cns.fr (P.W.)

<sup>2</sup> IGEPP, INRAE, Institut Agro, Université de Rennes, Domaine de la Motte, 35653 Le Rheu, France; cyril.falentin@inrae.fr (C.F.); franz.boideau@inrae.fr (F.B.); gwenaelle.deniot@inrae.fr (G.D.); loeiz.maillat@inrae.fr (L.M.); anne-marie.chevre@inrae.fr (A.-M.C.); mathieu.rousseau-gueutin@inrae.fr (M.R.-G.)

<sup>3</sup> Genoscope, Institut François Jacob, Commissariat à l’Energie Atomique (CEA), Université Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Crémieux, 91057 Evry, France; klabadie@genoscope.cns.fr (K.L.); cruaud@genoscope.cns.fr (C.C.)

\* Correspondence: jmaury@genoscope.cns.fr

† These authors contributed equally.



**Citation:** Istace, B.; Belser, C.; Falentin, C.; Labadie, K.; Boideau, F.; Deniot, G.; Maillat, L.; Cruaud, C.; Bertrand, L.; Chèvre, A.-M.; et al. Sequencing and Chromosome-Scale Assembly of Plant Genomes, *Brassica rapa* as a Use Case. *Biology* **2021**, *10*, 732. <https://doi.org/10.3390/biology10080732>

Academic Editors: Pierre Devaux and Pierre Sourdille

Received: 12 July 2021

Accepted: 28 July 2021

Published: 30 July 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Reconstructing plant genomes is a difficult task due to their often large sizes, unusual ploidy, and large numbers of repeated elements. However, the field of sequencing is changing very rapidly, with new and improved methods released every year. The ultimate goal of this study is to provide readers with insights into techniques that currently exist for obtaining high-quality and chromosome-scale assemblies of plant genomes. In this work, we presented the advanced techniques already existing in the field and illustrated their application to reconstruct the genome of the yellow sarson, *Brassica rapa* cv. Z1.

**Abstract:** With the rise of long-read sequencers and long-range technologies, delivering high-quality plant genome assemblies is no longer reserved to large consortia. Not only sequencing techniques, but also computer algorithms have reached a point where the reconstruction of assemblies at the chromosome scale is now feasible at the laboratory scale. Current technologies, in particular long-range technologies, are numerous, and selecting the most promising one for the genome of interest is crucial to obtain optimal results. In this study, we resequenced the genome of the yellow sarson, *Brassica rapa* cv. Z1, using the Oxford Nanopore PromethION sequencer and assembled the sequenced data using current assemblers. To reconstruct complete chromosomes, we used and compared three long-range scaffolding techniques, optical mapping, Omni-C, and Pore-C sequencing libraries, commercialized by Bionano Genomics, Dovetail Genomics, and Oxford Nanopore Technologies, respectively, or a combination of the three, in order to evaluate the capability of each technology.

**Keywords:** genome; assembly; scaffolding; chromosome-scale; nanopore; optical map; bionano; omni-C; pore-C; plants

## 1. Introduction

Assembling plant genomes has always been one of the most complex tasks in bioinformatics applied to genomics. Indeed, they often contain many repeated elements, such as satellites or transposable elements. This leads to an increase in the size of the genome, which can then reach tens of gigabases, for example the loblolly pine genome, which is 22 Gb in size [1]. Moreover, the difficulty is further increased due to the high levels of heterozygosity and highly variable ploidy [2]. All these characteristics make reconstruction



## **Références bibliographiques**





## Références bibliographiques

- Acquaviva L, Székvölgyi L, Dichtl B, Dichtl BS, Saint André C de LR, Nicolas A, Géli V. 2013.** The COMPASS Subunit Spp1 Links Histone Methylation to Initiation of Meiotic Recombination. *Science* **339**: 215–218.
- Adams EE, He Q, Id BDM. 2020.** How noncrossover homologs are conjoined and segregated in *Drosophila* male meiosis I: Stable but reversible homolog linkers require a novel Separase target protein Background: Segregation of chiasmate versus achiasmate. *Plos Genetics*: 1–4.
- Aissiou F, Laperche A, Falentin C, Lodé M, Deniot G, Boutet G, Régnier F, Trotoux G, Huteau V, Coriton O, et al. 2018.** A novel *Brassica rapa* L. genetic diversity found in Algeria. *Euphytica* **214**: 241.
- Allender CJ, King GJ. 2010.** Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* **10**.
- Ananiev EV, Phillips RL, Rines HW. 1998.** A knob- associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: Are chromosome knobs megatransposons? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 10785–10790.
- Andersen SL, Sekelsky J. 2010.** Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **32**: 1058–1066.
- Anderson LK, Doyle GG, Brigham B, Carter J, Hooker KD, Lai A, Rice M, Stack SM. 2003.** High-Resolution Crossover Maps for Each Bivalent of *Zea mays* Using Recombination Nodules. *Genetics* **165**: 849–865.
- Anderson LK, Lohmiller LD, Tang X, Hammond DB, Javernick L, Shearer L, Basu-Roy S, Martin OC, Falque M. 2014.** Combined fluorescent and electron microscopic imaging unveils the specific properties of two classes of meiotic crossovers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 13415–13420.
- Anderson LK, Offenbergh HH, Verkuijlen WMHC, Heyting C. 1997.** RecA-like proteins are components of early meiotic nodules in lily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 6868–6873.
- Anderson LK, Stack SM. 2005.** Recombination nodules in plants. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 198–204.
- Aragón L. 2018.** The Smc5/6 Complex: New and Old Functions of the Enigmatic Long-Distance Relative. *Annual Review of Genetics* **52**: 89–107.
- Arias T, Beilstein MA, Tang M, McKain MR, Pires JC. 2014.** Diversification times among Brassica (Brassicaceae) crops suggest hybrid formation after 20 million years of divergence. *American Journal of Botany* **101**: 86–91.
- Armstrong SJ, Franklin FCH, Jones GH. 2003.** A meiotic time-course for *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reproduction* **16**: 141–149.
- Auxier B, Becker F, Nijland R, Debets AJM, van den Heuvel J, Snelders E. 2022.** Meiosis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus* has the highest known number of crossovers. *bioRxiv*: 2022.01.14.476329.

- Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, Christie D-M, Monell C, Arnheim N, Bradley A, et al. 1996.** Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* **13**: 336–342.
- Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A-M, Leflon M, Rouxel T. 2013.** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* **198**: 887–898.
- Barth S, Melchinger AE, Devezi-Savula B, Lübberstedt T. 2000.** A high-throughput system for genome-wide measurement of genetic recombination in *Arabidopsis thaliana* based on transgenic markers. *Functional & Integrative Genomics* **1**: 200–206.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, de Massy B. 2010.** PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science* **327**: 836–840.
- Bayer PE, Scheben A, Golicz AA, Yuan Y, Faure S, Lee H, Chawla HS, Anderson R, Bancroft I, Raman H, et al. 2021.** Modelling of gene loss propensity in the pangenomes of three Brassica species suggests different mechanisms between polyploids and diploids. : 2488–2500.
- Bayliss MW, Riley R. 1972.** An analysis of temperature-dependent asynapsis in *Triticum aestivum*. *Genetical Research* **20**: 193–200.
- Bennett MD. 1977.** The time and duration of meiosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **277**: 201–226.
- Bennett MD, Smith JB. 1972.** The effects of polyploidy on meiotic duration and pollen development in cereal anthers. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **181**: 81–107.
- Berchowitz LE, Copenhaver GP. 2008.** Fluorescent Arabidopsis tetrads: A visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets. *Nature Protocols* **3**: 41–50.
- Berchowitz LE, Francis KE, Bey AL, Copenhaver GP. 2007.** The Role of AtMUS81 in Interference-Insensitive Crossovers in *A. thaliana* (J Pritchard, Ed.). *PLoS Genetics* **3**: e132.
- Birchler JA, Veitia RA. 2010.** The gene balance hypothesis: implications for gene regulation, quantitative traits and evolution. *New Phytologist* **186**: 54–62.
- Blackwell AR, Dluzewska J, Szymanska-Lejman M, Desjardins S, Tock AJ, Kbiri N, Lambing C, Lawrence EJ, Bieluszewski T, Rowan B, et al. 2020.** MSH 2 shapes the meiotic crossover landscape in relation to interhomolog polymorphism in Arabidopsis. *The EMBO Journal* **39**: 1–22.
- Blary A, Gonzalo A, Eber F, Bérard A, Bergès H, Bessoltane N, Charif D, Charpentier C, Cromer L, Fourment J, et al. 2018.** FANCM Limits Meiotic Crossovers in Brassica Crops. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–13.
- Blary A, Jenczewski E. 2018.** Manipulation of crossover frequency and distribution for plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics*.
- de Boer E, Heyting C. 2006.** The diverse roles of transverse filaments of synaptonemal complexes in meiosis. *Chromosoma* **115**: 220–234.
- Bolaños-villegas P, De K, Pradillo M, Liu D, Bolaños-villegas P. 2017.** In Favor of Establishment : Regulation of Chromatid Cohesion in Plants. **8**: 1–12.
- Boutte J, Maillet L, Chaussepied T, Letort S, Aury J, Belser C, Boideau F, Brunet A, Coriton O, Deniot G, et al. 2020.** Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–13.
- Brown MS, Bishop DK. 2015.** DNA Strand Exchange and RecA Homologs in Meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan; 7(1): a016659.

- Brubaker CL, Paterson AH, Wendel JF. 1999.** Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *203*: 184–203.
- Burt A, Bell G, Harvey PH. 1991.** Sex differences in recombination. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 259–277.
- Cabral G, Marques A, Schubert V, Pedrosa-Harand A, Schlögelhofer P. 2014.** Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nature Communications* **5**: 5070.
- Cai C, Bucher J, Bakker FT, Bonnema G. 2022.** Evidence for two domestication lineages supporting a middle-eastern origin for *Brassica oleracea* crops from diversified kale populations. *Horticulture Research* **9**: uhac033.
- Cai X, Li J, Yang Q. 2011.** Gamma-irradiation increased meiotic crossovers in mouse spermatocytes. *Mutagenesis* **26**: 721–727.
- Capilla-pérez L, Durand S, Hurel A, Lian Q, Chambon A, Taochy C. 2021.** The synaptonemal complex imposes crossover interference and heterochiasmy in Arabidopsis. *PNAS* **118**: 1–11.
- Carlton PM, Farruggio AP, Dernburg AF. 2006.** A link between meiotic prophase progression and crossover control. *PLoS Genetics* **2**: 119–128.
- Carvalho CED, Zaaier S, Smolikov S, Gu Y, Schumacher JM, Colaiácovo MP. 2008.** LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. : 2869–2885.
- Cha RS, Weiner BM, Keeney S, Dekker J, Kleckner N. 2000.** Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes and Development* **14**: 493–503.
- Chakravarti A. 1991.** A graphical representation of genetic and physical maps: The Marey map. *Genomics* **11**: 219–222.
- Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, et al. 2014.** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**: 950–953.
- Chamberlain CJ. 1935.** Gymnosperms, structure and evolution. *Chicago Univ. Press*: 286–287.
- Chelysheva L, Grandont L, Vrielynck N, Le Guin S, Mercier R, Grelon M. 2010.** An Easy Protocol for Studying Chromatin and Recombination Protein Dynamics during *Arabidopsisthaliana* Meiosis: Immunodetection of Cohesins, Histones and MLH1. *Cytogenetic and Genome Research* **129**: 143–153.
- Chelysheva L, Vezon D, Belcram K, Gendrot G, Grelon M. 2008.** The Arabidopsis BLAP75/Rmi1 Homologue Plays Crucial Roles in Meiotic Double-Strand Break Repair. *PLOS Genetics* **4**: e1000309.
- Chelysheva L, Vezon D, Chambon A, Gendrot G, Pereira L, Lemhemdi A, Vrielynck N, Le Guin S, Novatchkova M, Grelon M. 2012.** The Arabidopsis HEI10 Is a New ZMM Protein Related to Zip3. *PLoS Genetics* **8**.
- Chen SY, Tsubouchi T, Rockmill B, Sandler JS, Daniel R, Vader G, Hochwagen A, Roeder GS, Jennifer C. 2008.** Global Analysis of the Meiotic Crossover Landscape. *Dev. Cell.* **15**: 401–415.
- Cheng Z, Dong F, Langdon T, Ouyang S, Buell CR, Gu M, Blattner FR, Jiang J. 2002.** Functional Rice Centromeres Are Marked by a Satellite Repeat and a Centromere-Specific Retrotransposon. *The Plant Cell* **14**: 1691–1704.
- Cheng F, Mandáková T, Wu J, Xie Q, Lysak MA, Wang X. 2013.** Deciphering the Diploid Ancestral Genome of the Mesoheptaploid *Brassica rapa*. *The Plant Cell* **25**: 1541–1554.
- Cheng F, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B, Lin K, Bonnema G, Wang X. 2012.** Biased Gene Fractionation and Dominant Gene Expression among the Subgenomes of *Brassica rapa*. *PLoS One* **7** (5):e36442.

- Cheng F, Wu J, Wang X. 2014.** Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. *Horticulture Research* 1: 14024.
- Chevre AM, Eber F, Margale E, Kerlan MC, Primard C, Vedel F, Delseny M, Pelletier G. 1994.** Comparison of somatic and sexual *Brassica napus* – *Sinapis alba* hybrids and their progeny by cytogenetic studies and molecular characterization. *Genome* 37: 367–374.
- Chèvre AM, Eber F, Thomas G, Baron F. 1989.** Etudes cytologiques de choux tetraploïdes (*Brassica oleracea* L. ssp *acephala*) obtenus à partir de lignées diploïdes après traitement à la colchicine. *Agronomie* 5: 521–525.
- Choi K, Henderson IR. 2015.** Meiotic recombination hotspots – a comparative view. *The Plant Journal* 83: 52–61.
- Choi K, Zhao X, Kelly KA, Venn O, Higgins JD, Yelina NE, Hardcastle TJ, Ziolkowski PA, Copenhaver GP, Franklin FCH, et al. 2013.** Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nature Genetics* 45: 1327–1338.
- Choi K, Zhao X, Tock AJ, Lambing C, Underwood CJ, Hardcastle TJ, Serra H, Kim J, Cho HS, Kim J, et al. 2018.** Nucleosomes and DNA methylation shape meiotic DSB frequency in *Arabidopsis thaliana* transposons and gene regulatory regions. *Genome Research* 28: 532–546.
- Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, Barbe V, Daron J, Pingault L, Sourdille P, Couloux A, Paux E, et al. 2014.** Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345: 1249721.
- Chowdhury MR, Singh A, Dubey S. 2020.** Role of cytogenetics and molecular genetics in human health and medicine. *Animal Biotechnology*. pp 451-472.
- Christophorou N, She W, Long J, Idir Y, Tagliaro-jahns M, Solier V, Vezon D, Grelon M, Feng X, Me C, et al. 2020.** AXR1 affects DNA methylation independently of its role in regulating meiotic crossover localization. *PLoS Genetics* 16(6): e1008894.
- Cole, F., Baudat, F., Grey, C. et al. 2014.** Mouse tetrad analysis provides insights into recombination mechanisms and hotspot evolutionary dynamics. *Nat Genet* 46, 1072–1080.
- Collins KA, Castillo AR, Tatsutani SY, Biggins S. 2005.** De Novo Kinetochores Assembly Requires the Centromeric Histone H3 Variant  $\gamma$ . *Molecular Biology of the Cell* 16: 12.
- Collins I, Newlon CS. 1994.** Meiosis-specific formation of joint DNA molecules containing sequences from homologous chromosomes. *Cell* 76: 65–75.
- Colomé-Tatché M, Cortijo S, Wardenaar R, Morgado L, Lahouz B, Sarazin A, Etcheverry M, Martin A, Feng S, Duvernois-Berthet E, et al. 2012.** Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 16240–16245.
- Comai L. 2005.** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6: 836–846.
- Copenhaver GP, Browne WE, Preuss D. 1998.** Assaying genome-wide recombination and centromere functions with *Arabidopsis* tetrads. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 247–252.
- Copenhaver GP, Keith KC, Preuss D. 2000.** Tetrad Analysis in Higher Plants. A Budding Technology. *Plant Physiol.* 124: 7–15.
- Copenhaver GP, Nickel K, Kuromori T, Benito M, Kaul S, Lin X, Bevan M, Murphy G, Harris B, Parnell LD, et al. 1999.** Genetic Definition and Sequence Analysis of Arabidopsis Centromeres. *Science* 286: 2468–2475.

- Coulton A, Przewieslik-Allen AM, Burridge AJ, Shaw DS, Edwards KJ, Barker GLA. 2020.** Segregation distortion: Utilizing simulated genotyping data to evaluate statistical methods. *PLoS ONE* **15**: 1–19.
- Creighton Harriet B., McClintock Barbara. 1931.** A Correlation of Cytological and Genetical Crossing-Over in *Zea Mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **17**: 492–497.
- Crismani W, Girard C, Froger N, Pradillo M, Santos JL, Chelysheva L, Copenhaver GP, Horlow C, Mercier R. 2012.** FANCM Limits Meiotic Crossovers. *Science* **336**: 1588–1590.
- Cromer L, Heyman J, Touati S, Harashima H, Araou E, Girard C, Horlow C, Wassmann K, Schnittger A, De Veylder L, et al. 2012.** OSD1 Promotes Meiotic Progression via APC/C Inhibition and Forms a Regulatory Network with TDM and CYCA1;2/TAM. *PLOS Genetics* **8**: e1002865.
- Cromie GA, Hyppa RW, Taylor AF, Zakharyevich K, Hunter N, Smith GR. 2006.** Single Holliday Junctions Are Intermediates of Meiotic Recombination. *Cell* **127**: 1167–1178.
- Crown KN, Miller DE, Sekelsky J, Hawley RS. 2018.** Local Inversion Heterozygosity Alters Recombination throughout the Genome. *Current Biology* **28**: 2984–2990.e3.
- Cuacos M, Franklin FCH, Heckmann S. 2015.** Atypical centromeres in plants — what they can tell us. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–15.
- Darlington CD, Dark SOS. 1932.** The Origin and Behaviour of Chiasmata, II *Stenobothrus parallelus*. *Cytologia* **3**: 169–185.
- De Storme N, Geelen D. 2013.** Sexual polyploidization in plants - cytological mechanisms and molecular regulation. *New Phytologist* **198**: 670–684.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. 1998.** Meiotic Recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis. *Cell* **94**: 387–398.
- Desai A, Chee PW, Rong J, May OL, Paterson AH. 2006.** Chromosome structural changes in diploid and tetraploid A genomes of *Gossypium*. *Genome* **49**: 336–345.
- Diezmann LV, Rog O. 2021.** Let's get physical – mechanisms of crossover interference. *Journal of Cell Science* **134**(10):jcs255745.
- Dooner HK, He L. 2008.** Maize genome structure variation: Interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination. *Plant Cell* **20**: 249–258.
- Dreissig S, Fuchs J, Cápál P, Kettles N, Byrne E, Houben A. 2015.** Measuring Meiotic Crossovers via Multi-Locus Genotyping of Single Pollen Grains in Barley (M Lichten, Ed.). *PLoS ONE* **10**: e0137677.
- Dreissig S, Fuchs J, Himmelbach A, Mascher M, Houben A. 2017.** Sequencing of single pollen nuclei reveals meiotic recombination events at megabase resolution and circumvents segregation distortion caused by postmeiotic processes. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Dreissig S, Mascher M, Heckmann S, Purugganan M. 2019.** Variation in Recombination Rate Is Shaped by Domestication and Environmental Conditions in Barley. *Molecular Biology and Evolution* **36**: 2029–2039.
- Dreissig S, Maurer A, Sharma R, Milne L, Flavell AJ, Schmutzer T, Pillen K. 2020.** Natural variation in meiotic recombination rate shapes introgression patterns in intraspecific hybrids between wild and domesticated barley. *New Phytologist* **228**: 1852–1863.
- Drouaud J, Khademian H, Giraut L, Zanni V, Bellalou S, Henderson IR, Falque M, Mézard C. 2013.** Contrasted Patterns of Crossover and Non-crossover at *Arabidopsis thaliana* Meiotic Recombination Hotspots (H Ma, Ed.). *PLoS Genetics* **9**: e1003922.

- Drouaud J, Mercier R, Chelysheva L, Bérard A, Falque M, Martin O, Zanni V, Brunel D, Mézard C. 2007.** Sex-specific crossover distributions and variations in interference level along *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *PLoS Genetics* **3**: 1096–1107.
- Duroc Y, Kumar R, Ranjha L, Adam C, Guérois R, Md Muntaz K, Marsolier-Kergoat M-C, Dingli F, Laureau R, Loew D, et al. 2017.** Concerted action of the MutL $\beta$  heterodimer and Mer3 helicase regulates the global extent of meiotic gene conversion (A Aguilera, Ed.). *eLife* **6**: e21900.
- Duroc Y, Lemhemdi A, Larchevêque C, Hurel A, Cuacos M, Cromer L, Horlow C, Armstrong SJ, Chelysheva L, Mercier R. 2014.** The Kinesin AtPSS1 Promotes Synapsis and is Required for Proper Crossover Distribution in Meiosis (I Henderson, Ed.). *PLoS Genetics* **10**: e1004674.
- Egel R, Penny D. 2008.** On the Origin of Meiosis in Eukaryotic Evolution: Coevolution of Meiosis and Mitosis from Feeble Beginnings. In: Egel R, Lankenau D-H, eds. *Genome Dynamics and Stability. Recombination and Meiosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 249–288.
- Egel-Mitani M, Olson LW, Egel R. 1982.** Meiosis in *Aspergillus nidulans*: another example for lacking synaptonemal complexes in the absence of crossover interference. *Hereditas* **97**: 179–187.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011.** A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species (L Orban, Ed.). *PLoS ONE* **6**: e19379.
- Emmanuel E, Yehuda E, Melamed-Bessudo C, Avivi-Ragolsky N, Levy AA. 2006.** The role of AtMSH2 in homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO reports* **7**: 100–105.
- Fang O, Wang L, Zhang Y, Yang J, Tao Q, Zhang F, Luo Z. 2021.** Genome Duplication Increases Meiotic Recombination Frequency: A *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Molecular Biology and Evolution* **38**: 777–787.
- FAO.** Site web, [https://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food\\_outlook\\_oilseeds/FO\\_Oilcrops.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food_outlook_oilseeds/FO_Oilcrops.pdf). (Consulté en 2022)
- Fayos I, Mieulet D, Petit J, Anne C, Christophe P, Guiderdoni E. 2019.** Engineering meiotic recombination pathways in rice. *Plant Biotechnol Journal* **17**(11):2062-2077.
- Fernandes JB, Séguéla-Arnaud M, Larchevêque C, Lloyd AH, Mercier R. 2018.** Unleashing meiotic crossovers in hybrid plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 2431–2436.
- Ferreira de Carvalho J, Stoeckel S, Eber F, Lodé-Taburel M, Gilet MM, Trotoux G, Morice J, Falentin C, Chèvre AM, Rousseau-Gueutin M. 2021.** Untangling structural factors driving genome stabilization in nascent *Brassica napus* allopolyploids. *New Phytologist* **230**: 2072–2084.
- Focke WO. 1881.** *Die pflanzen-mischlinge : ein beitrag zur biologie der gewächse*. Berlin: Gebrüder Bornträger.
- Foisset N, Delourme R, Lucas MO, Renard M. 1997.** In vitro androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: Spontaneous versus colchicine-doubled lines. *Plant Cell Reports* **16**: 464–468.
- Fowler KR, Sasaki M, Milman N, Keeney S, Smith GR. 2014.** Evolutionarily diverse determinants of meiotic DNA break and recombination landscapes across the genome. *Genome Research* **24**: 1650–1664.
- France MG, Enderle J, Röhrig S, Puchta H, Franklin FCH, Higgins JD. 2021.** ZYP1 is required for obligate cross-over formation and cross-over interference in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**: 1–11.
- Francis KE, Lam SY, Harrison BD, Bey AL, Berchowitz LE, Copenhaver GP. 2007.** Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in *Arabidopsis*. *PNAS* **104**: 3913–3918.

- Francki MG. 2001.** Identification of *Bilby*, a diverged centromeric Ty1-*copia* retrotransposon family from cereal rye (*Secale cereale* L.). *Genome* **44**: 266–274.
- Fransz P, Linc G, Lee CR, Aflitos SA, Lasky JR, Toomajian C, Ali H, Peters J, van Dam P, Ji X, et al. 2016.** Molecular, genetic and evolutionary analysis of a paracentric inversion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **88**: 159–178.
- Fu H, Zheng Z, Dooner HK. 2002.** Recombination rates between adjacent genic and retrotransposon regions in maize vary by 2 orders of magnitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 1082–1087.
- Fuchs LK, Jenkins G, Phillips DW. 2018.** Anthropogenic Impacts on Meiosis in Plants. *Frontiers in plant Science*. **9**: 1–14.
- Fuentes RR, Ridder DD, Dijk ADJV, Peters SA. 2021.** Domestication Shapes Recombination Patterns in Tomato. *Mol. Biol. Evol.* **39**(1): msab287.
- Gaeta RT, Pires JC, Iniguez-Luy F, Leon E, Osborn TC. 2007.** Genomic Changes in Resynthesized *Brassica napus* and Their Effect on Gene Expression and Phenotype. *The Plant Cell* **19**: 3403–3417.
- von Gärtner KF. 1849.** *Versuche und Beobachtungen über die Bastard-erzeugung in Pflanzenreiche*. Ed: K. F. Heiring. p790
- Gaskell LJ, Osman F, Gilbert RJC, Whitby MC. 2007.** Mus81 cleavage of Holliday junctions: a failsafe for processing meiotic recombination intermediates? *The EMBO Journal* **26**: 1891–1901.
- Gauthier F, Martin OC, Falque M. 2011.** CODA (crossover distribution analyzer): Quantitative characterization of crossover position patterns along chromosomes. *BMC Bioinformatics* **12**: 27.
- Gelei J. 1921.** Weitere Studien über die Oogenese des *Dendrocoelum lacteum*. Die Konjugation der Chromosomen in der Literatur und meine Befunde. *Archiv f Zellforsch.* **16**: 300–365.
- Girard C, Chelysheva L, Choinard S, Froger N, Macaisne N, Lehmemdi A, Mazel J, Crismani W, Mercier R. 2015.** AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genetics* **11**(7):e1005369
- Giraut L, Falque M, Drouaud J, Pereira L, Martin OC, Mézard C. 2011.** Genome-wide crossover distribution in *Arabidopsis thaliana* meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes. *PLoS Genetics* **7** (11):e1002354.
- Gómez-Campo C, Prakash S. 1999.** Biology of Brassica Coenospecies. *Developments in Plant Genetics and Breeding* **4**: 33–58.
- Gonzalo A. 2022.** All Ways Lead to Rome—Meiotic Stabilization Can Take Many Routes in Nascent Polyploid Plants. *Genes* **13** (1):147.
- Gonzalo A, Lucas MO, Charpentier C, Sandmann G, Lloyd A, Jenczewski E. 2019.** Reducing MSH4 copy number prevents meiotic crossovers between non-homologous chromosomes in *Brassica napus*. *Nature Communications* **10** (1):2354.
- Grant V. 1958.** The regulation of recombination in plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **23**: 337–363.
- Greer E, Martín AC, Pendle A, Colas I, Jones AME, Moore G, Shaw P. 2012.** The *Ph1* Locus Suppresses Cdk2-Type Activity during Premeiosis and Meiosis in Wheat. *The Plant Cell* **24**: 152–162.
- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G. 2001.** AtSPO11- 1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* **20**: 589–600.
- Griffing B, Langridge JR.** Factors affecting crossing overs in the tomato. *Australian Journal of Biological Sciences* **16**: 826–837.



- Grover CE, Gallagher JP, Szadkowski EP, Yoo MJ, Flagel LE, Wendel JF. 2012.** Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploids. *New Phytologist* **196**: 966–971.
- Haenel Q, Laurentino TG, Roesti M, Berner D. 2018.** Meta-analysis of chromosome-scale crossover rate variation in eukaryotes and its significance to evolutionary genomics. *Molecular Ecology* **27**: 2477–2497.
- Haldane. 1919.** The probable errors of calculated linkage values, and the most accurate method of determining gametic from certain zygotic series. *Journal of Genetics* **8**: 291–297.
- Haldane JBS. 1922.** Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* **12**: 101–109.
- Hamoir G. 1992.** The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity. *International Journal of Developmental Biology* **36**: 9–15.
- Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ. 2004.** A bouquet of chromosomes. *Journal of Cell Science* **117**: 4025–4032.
- Harper J, Phillips D, Thomas A, Gasior D, Evans C, Powell W, King J, King I, Jenkins G, Armstead I. 2018.** B chromosomes are associated with redistribution of genetic recombination towards lower recombination chromosomal regions in perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany* **69**: 1861–1871.
- Harrison GE, Heslop-Harrison JS. 1995.** Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics* **90**: 157–165.
- Hartung F, Wurz-Wildersinn R, Fuchs J, Schubert I, Suer S, Puchta H. 2007.** The Catalytically Active Tyrosine Residues of Both SPO11-1 and SPO11-2 Are Required for Meiotic Double-Strand Break Induction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 3090–3099.
- He L, Dooner HK. 2009.** Haplotype structure strongly affects recombination in a maize genetic interval polymorphic for Helitron and retrotransposon insertions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 8410–8416.
- He Y, Wang M, Dukowic-Schulze S, Zhou A, Tiang CL, Shilo S, Sidhu GK, Eichten S, Bradbury P, Springer NM, et al. 2017.** Genomic features shaping the landscape of meiotic double-strand-break hotspots in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: 12231–12236.
- Heckmann S, Jankowska M, Schubert V, Kumke K, Ma W, Houben A. 2014.** Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nature Communications* **5**: 4979.
- Heichinger C, Penkett CJ, Bähler J, Nurse P. 2006.** Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *The EMBO Journal* **25**: 5171–5179.
- Herrera JC, Combes MC, Anthony F, Charrier A, Lashermes P. 2002.** Introgression into the allotetraploid coffee (*Coffea arabica* L.): segregation and recombination of the *C. canephora* genome in the tetraploid interspecific hybrid (*C. arabica* × *C. canephora*). *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 661–668.
- Herrera J-C, Romero J-V, Camayo G-C, Caetano C-M, Cortina H-A. 2012.** Evidence of Intergenomic Relationships in Triploid Hybrids of Coffee (*Coffea* sp.) as Revealed by Meiotic Behavior and Genomic in Situ Hybridization. *Tropical Plant Biology* **5**: 207–217.
- Higgins EE, Howell EC, Armstrong SJ, Parkin IAP. 2021.** A major quantitative trait locus on chromosome A9, BnaPh1, controls homoeologous recombination in *Brassica napus*. *New Phytologist* **229**: 3281–3293.

- Higgins JD, Perry RM, Barakate A, Ramsay L, Waugh R, Halpin C, Armstrong SJ, Franklin FCH. 2012.** Spatiotemporal Asymmetry of the Meiotic Program Underlies the Predominantly Distal Distribution of Meiotic Crossovers in Barley. *Plant Cell* **24**: 4096–4109.
- Hofstatter PG, Thangavel G, Castellani M, Marques A. 2021.** Meiosis Progression and Recombination in Holocentric Plants : What Is Known? *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–11.
- Howard HW. 1939.** The Cytology of autotetraploid kale, *Brassica oleracea*. *Cytologia*. **10**: 77-87
- Huang K, Andrew RL, Owens GL, Ostevik KL, Rieseberg LH. 2020.** Multiple chromosomal inversions contribute to adaptive divergence of a dune sunflower ecotype. *Molecular Ecology* **29**: 2535–2549.
- Huang K, Rieseberg LH. 2020.** Frequency, Origins, and Evolutionary Role of Chromosomal Inversions in Plants. *Frontiers in Plant Science* **11**: 296.
- Hurel A, Phillips D, Vrielynck N, Mézard C, Grelon M, Christophorou N. 2018.** A cytological approach to studying meiotic recombination and chromosome dynamics in *Arabidopsis thaliana* male meiocytes in three dimensions. *Plant Journal* **95**: 385–396.
- da Ines O, Abe K, Goubely C, Gallego ME, White CI. 2012.** Differing requirements for RAD51 and DMC1 in meiotic pairing of centromeres and chromosome arms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* **8**(4).1002636.
- INPN, Site web, [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/144396/tab/taxo](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/144396/tab/taxo). (Consulté en 2022)
- Jahns MT, Vezon D, Chambon A, Pereira L, Falque M, Martin OC, Chelysheva L, Grelon M. 2014.** Crossover Localisation Is Regulated by the Neddylation Posttranslational Regulatory Pathway (M Lichten, Ed.). *PLoS Biology* **12**: e1001930.
- Jenczewski E, Eber F, Grimaud A, Huet S, Lucas MO, Monod H, Chèvre AM. 2003.** PrBn, a Major Gene Controlling Homeologous Pairing in Oilseed Rape (*Brassica napus*) Haploids. *Genetics* **164**: 645–653.
- Ji X. 2014.** Numerical and structural chromosome aberrations in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis) and *Arabidopsis thaliana*. *PhD thesis*, The Netherlands.
- Jing J-L, Zhang T, Wang Y-Z, He Y. 2019.** Advances Towards How Meiotic Recombination Is Initiated: A Comparative View and Perspectives for Plant Meiosis Research. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 4718.
- Kar FM & Hochwagen A. 2021.** Phospho-Regulation of Meiotic Prophase. *Front Cell Dev Biol.* **9**:667073.
- Karpechenko GD. 1928.** Polyploid hybrids of *Raphanus sativus* L. and *Brassica oleracea* L. *Zeits. ind. Abst. u. Vererb.* **48**: 1–85.
- Kaur H, De Muyt A, Lichten M. 2015.** Top3-Rmi1 DNA Single-Strand Decatenase Is Integral to the Formation and Resolution of Meiotic Recombination Intermediates. *Molecular Cell* **57**: 583–594.
- Kelly AL, Sharpe AG, Nixon JH, Lydiate DJ, Evans EJ. 1997.** Indistinguishable patterns of recombination resulting from male and female meioses in *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* **40**: 49–56.
- Kent TV, Uzunović J, Wright SI. 2017.** Coevolution between transposable elements and recombination. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**: 20160458.
- Kianian PMA, Wang M, Simons K, Ghavami F, He Y, Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Sun Q, Pillardy J, Mudge J, et al. 2018.** High-resolution crossover mapping reveals similarities and differences of male and female recombination in maize. *Nature Communications* **9**: 2370.

- Kilian A, Stiff C, Kleinhofs A. 1995.** Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 9555–9559.
- Kittipol V, He Z, Wang L, Doheny-Adams T, Langer S, Bancroft I. 2019.** Genetic architecture of glucosinolate variation in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* **240**: 152988.
- Kleckner N. 2006.** Chiasma formation : chromatin / axis interplay and the role (s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma*. **115**(3): 175–194.
- Kleckner N, Storlazzi A, Zickler D. 2003.** Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover / chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends in Genetics* **19**(11): 623–628.
- Kleckner N, Zickler D, Jones GH, Dekker J, Padmore R, Henle J, Hutchinson J. 2004.** A mechanical basis for chromosome function. *PNAS*. 101(34). 12592-12597.
- Kong A, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Masson G, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Walters GB, Jonasdottir A, Gylfason A, Kristinsson KTh, et al. 2010.** Fine-scale recombination rate differences between sexes, populations and individuals. *Nature* **467**: 1099–1103.
- Kosambi DD. 1943.** The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* **12**: 172–175.
- Koul KK, Nagpal R, Nain K. 2020.** Male and female meiosis evince differential patterns in chiasma formation: a case study of ornamental plant, *Delphinium ajacis* L. *Journal of Genetics* **99**.
- Krzymanski J. 1966.** Skład olejow w nasionach krajowych roslin oleistych. *Hodowla Roslin Aklimatyzacja i Nasiennictwo* **10**: 535–546.
- Ku J-C, Ronceret A, Golubovskaya I, Lee DH, Wang C, Timofejeva L, Kao Y-H, Gomez Angoa AK, Kremling K, Williams-Carrier R, et al. 2020.** Dynamic localization of SPO11-1 and conformational changes of meiotic axial elements during recombination initiation of maize meiosis (GS Barsh, Ed.). *PLOS Genetics* **16**: e1007881.
- Kunkel TA, Erie DA. 2005.** DNA MISMATCH REPAIR. *Annual Review of Biochemistry* **74**: 681–710.
- Lagercrantz U. 1998.** Comparative Mapping Between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* Indicates That *Brassica* Genomes Have Evolved Through Extensive Genome Replication. *Genetics*. **150**(3). 1217-1228.
- Lagercrantz U, Lydiate DJ. 1996.** Comparative genome mapping in *Brassica*. *Genetics* **144**: 1903–1910.
- Lake CM, Hawley RS. 2012.** The Molecular Control of Meiotic Chromosomal Behavior: Events in Early Meiotic Prophase in *Drosophila* Oocytes. *Annual Review of Physiology* **74**: 425–451.
- Lam I, Keeney S. 2015.** Nonparadoxical evolutionary stability of the recombination initiation landscape in yeast. *Science* **350**: 932–937.
- Lamb N, Sherman S, Hassold TJ. 2005.** Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenetic and Genome Research* **111**: 250–255.
- Lange J, Yamada S, Tischfield SE, Pan J, Kim S, Zhu X, Socci ND, Jasin M, Keeney S. 2016.** The Landscape of Mouse Meiotic Double-Strand Break Formation, Processing, and Repair. *Cell* **167**: 695-708.e16.
- Lauretti E, Praticò D. 2017.** Effect of canola oil consumption on memory, synapse and neuropathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Scientific Reports* **7**: 17134.

- Leflon M, Eber F, Letanneur JC, Chelysheva L, Coriton O, Huteau V, Ryder CD, Barker G, Jenczewski E, Chèvre AM. 2006.** Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) × *Brassica napus* (AACC) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 1467–1480.
- Leflon M, Grandont L, Eber F, Huteau V, Coriton O, Chelysheva L, Jenczewski E, Chevre A-M. 2010.** Crossovers Get a Boost in Brassica Allotriploid and Allotetraploid Hybrids. *The Plant Cell Online* **22**: 2253–2264.
- Leitch A. R., Leitch I. J. 2008.** Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. *Science* **320**: 481–483.
- Lenormand T, Dutheil J. 2005.** Recombination Difference between Sexes: A Role for Haploid Selection. *PLoS Biology*. **3**.e63
- Lenormand T, Engelstädter J, Johnston SE, Wijnker E, Haag CR. 2016.** Evolutionary mysteries in meiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**: 20160001.
- Lhuissier FGP, Offenberg HH, Wittich PE, Vischer NOE, Heyting C. 2007.** The Mismatch Repair Protein MLH1 Marks a Subset of Strongly Interfering Crossovers in Tomato. *The Plant Cell Online* **19**: 862–876.
- Li X, Li L, Yan J. 2015.** Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nature Communications* **6**: 1–9.
- Li F, Storme ND, Geelen D. 2017.** Dynamics of male meiotic recombination frequency during plant development using Fluorescent Tagged Lines in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Publishing Group*: 1–9.
- Lian Q, Solier V, Walkemeier B, Durand S, Huettel B, Schneeberger K, Mercier R. 2022.** The megabase-scale crossover landscape is largely independent of sequence divergence. *Nat Communications* **13**(1):3828.
- Lin L, Allemekinders H, Dansby A, Campbell L, Durance-Tod S, Berger A, Jones PJ. 2013.** Evidence of health benefits of canola oil. *Nutrition Reviews* **71**: 370–385.
- Lipkin SM, Moens PB, Wang V, Lenzi M, Shanmugarajah D, Gilgeous A, Thomas J, Cheng J, Touchman JW, Green ED, et al. 2002.** Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics* **31**: 385–390.
- Liu Z, Adamczyk K, Manzanares-Dauleux M, Eber F, Lucas M-O, Delourme R, Chèvre AM, Jenczewski E. 2006.** Mapping PrBn and Other Quantitative Trait Loci Responsible for the Control of Homeologous Chromosome Pairing in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Haploids. *Genetics* **174**: 1583–1596.
- Liu C, Cao Y, Hua Y, Du G, Liu Q, Wei X, Sun T, Lin J, Wu M, Cheng Z, et al. 2021.** Concurrent Disruption of Genetic Interference and Increase of Genetic Recombination Frequency in Hybrid Rice Using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science* **12**.
- Liu Y, Du H, Li P, Shen Y, Peng H, Liu S, Zhou GA, Zhang H, Liu Z, Shi M, et al. 2020.** Pan-Genome of Wild and Cultivated Soybeans. *Cell* **182**: 162-176.e13.
- Lloyd A, Blary A, Charif D, Charpentier C, Tran J, Balzergue S, Delannoy E, Rigail G, Jenczewski E. 2018.** Homoeologous exchanges cause extensive dosage-dependent gene expression changes in an allopolyploid crop. *New Phytologist* **217**: 367–377.
- Lloyd A, Bomblies K. 2016.** Meiosis in autopolyploid and allopolyploid Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **30**: 116–122.
- Lloyd AH, Ranoux M, Vautrin S, Glover N, Fourment J, Charif D, Choulet F, Lassalle G, Marande W, Tran J, et al. 2014.** Meiotic Gene Evolution: Can You Teach a New Dog New Tricks? *Molecular Biology and Evolution* **31**: 1724–1727.

- Loidl J. 1989.** Effects of elevated temperature on meiotic chromosome synapsis in *Allium ursinum*. *Chromosoma* **97**: 449–458.
- Lukaszewski AJ, Curtis CA. 1993.** Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **86**:121–127.
- Lynn A, Soucek R, Börner GV. 2007.** ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. *Chromosome Research* **15**: 591–605.
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006.** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5224–5229.
- Lysak MA, Cheung K, Kitschke M, Bureš P. 2007.** Ancestral chromosomal blocks are triplicated in brassicaceae species with varying chromosome number and genome size. *Plant Physiology* **145**: 402–410.
- Lysak MA, Koch MA, Pecinka A, Schubert I. 2005.** Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Research* **15**: 516–525.
- Ma L, O’Connell JR, VanRaden PM, Shen B, Padhi A, Sun C, Bickhart DM, Cole JB, Null DJ, Liu GE, et al. 2015.** Cattle Sex-Specific Recombination and Genetic Control from a Large Pedigree Analysis (AJ Auton, Ed.). *PLOS Genetics* **11**: e1005387.
- de Maagd RA, Loonen A, Chouaref J, Pelé A, Meijer-Dekens F, Fransz P, Bai Y. 2020.** CRISPR/Cas inactivation of RECQ4 increases homeologous crossovers in an interspecific tomato hybrid. *Plant Biotechnology Journal* **18**: 805–813.
- Mabry ME, Turner-hissong SD, Gallagher EY, Mcalvay AC, An H, Edger PP, Moore JD, Pink DAC, Teakle GR, Stevens CJ, et al. 2021.** The Evolutionary History of Wild , Domesticated , and Feral *Brassica oleracea* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **38**: 4419–4434.
- Malinovskaya LP, Tishakova K, Shnaider EP, Borodin PM, Torgasheva AA. 2020.** Heterochiasmy and Sexual Dimorphism: The Case of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*, Hirundinidae, Aves). *Genes* **11**: 1119.
- Marand AP, Jansky SH, Zhao H, Leisner CP, Zhu X, Zeng Z, Crisovan E, Newton L, Hamernik AJ, Veilleux RE, et al. 2017.** Meiotic crossovers are associated with open chromatin and enriched with Stowaway transposons in potato. *Genome Biology* **18**: 1–16.
- Marey E-J. 1885.** La méthode graphique dans les sciences expérimentales et principalement en physiologie et en médecine. G. Masson Ed. Paris.
- Martín AC, Rey M-D, Shaw P, Moore G. 2017.** Dual effect of the wheat Ph1 locus on chromosome synapsis and crossover. *Chromosoma* **126**: 669–680.
- Martín AC, Shaw P, Phillips D, Reader S, Moore G. 2014.** Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. *Nature Communications* **5**: 4580.
- Martini E, Diaz RL, Hunter N, Keeney S. 2006.** Crossover Homeostasis in Yeast Meiosis. *Cell* **126**: 285–295.
- Mazina OM, Mazin AV, Nakagawa T, Kolodner RD, Kowalczykowski SC. 2004.** *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 Helicase Stimulates 3 ~ 5 Heteroduplex Extension by Rad51 : Implications for Crossover Control in Meiotic Recombination of Medicine. *Cell* **117**: 47–56.
- Mcalvay AC, Ragsdale AP, Mabry ME, Qi X, Bird KA, Velasco P, An H, Pires JC, Emshwiller E. 2021.** Brassica rapa Domestication : Untangling Wild and Feral Forms and Convergence of Crop Morphotypes. *Molecular Biology and Evolution* **38**: 3358–3372.
- McCutcheon JS, Umermura T, Bhatnagar MK, Walker BL. 1976.** Cardiopathogenicity of rapeseed oils and oil blends differing in erucic, linoleic, and linolenic acid content. *Lipids* **11**: 545–552.

- McKim Kim S., Green-Marroquin Becky L., Sekelsky Jeff J., Chin Gregory, Steinberg Carrie, Khodosh Rita, Hawley R. Scott. 1998.** Meiotic Synapsis in the Absence of Recombination. *Science* **279**: 876–878.
- McNaughton IH. 1973.** Synthesis and sterility of raphanobrassica. *Euphytica* **22**: 70–88.
- Melamed-bessudo C, Levy AA. 2012.** Deficiency in DNA methylation increases meiotic crossover rates in euchromatic but not in heterochromatic regions in Arabidopsis. *PNAS* **109**(16): e981-e988.
- Melamed-Bessudo C, Yehuda E, Stuitje AR, Levy AA. 2005.** A new seed-based assay for meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **43**: 458–466.
- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL. 2012.** Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* **20**: 579–593.
- Mercier R, Jolivet S, Vezon D, Huppe E, Chelysheva L, Giovanni M, Nogué F, Doutriaux MP, Horlow C, Grelon M, et al. 2005.** Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: One is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Current Biology* **15**: 692–701.
- Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, Macaisne N, Grelon M. 2015.** The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 297–327.
- Meunissier, A. 1928.** Sur la génétique des Brassica cultivés. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale* **7**: 602–607.
- Mézard C. 2006.** Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* **34**: 531–534.
- Mieulet D, Aubert G, Bres C, Klein A, Droc G, Vieille E, Rond-coissieux C, Sanchez M, Dalmais M, Mauxion J, et al. 2018.** Unleashing meiotic crossovers in crops. *Nature Plants* **4**.
- Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, Schimenti JC, Forejt J. 2009.** A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase. *Science* **323**: 373–375.
- Miller DE, Smith CB, Kazemi NY, Cockrell AJ, Arvanitakis AV, Blumenstiel JP, Jaspersen SL, Hawley RS. 2016.** Whole-Genome Analysis of Individual Meiotic Events in *Drosophila melanogaster* Reveals That Noncrossover Gene Conversions Are Insensitive to Interference and the Centromere Effect. *Genetics* **203**: 159–171.
- Mirouze M, Lieberman-Lazarovich M, Aversano R, Bucher E, Nicolet J, Reinders J, Paszkowski J. 2012.** Loss of DNA methylation affects the recombination landscape in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 5880–5885.
- Modliszewski JL, Copenhaver GP. 2017.** Meiotic recombination gets stressed out: CO frequency is plastic under pressure. *Current Opinion in Plant Biology* **36**: 95–102.
- Montgomery EA, Huang SM, Langley CH, Judd BH. 1991.** Chromosome rearrangement by ectopic recombination in *Drosophila melanogaster*: genome structure and evolution. *Genetics* **129**: 1085–1098.
- Morgan C, Fozard JA, Hartley M, Henderson IR, Bomblies K, Howard M. 2021a.** Diffusion-mediated HEI10 coarsening can explain meiotic crossover positioning in Arabidopsis. *Nature Communications* **12**.
- Morgan C, White MA, Franklin FCH, Zickler D, Kleckner N, Bomblies K. 2021b.** Evolution of crossover interference enables stable autopolyploidy by ensuring pairwise partner connections in *Arabidopsis arenosa*. *Current Biology* **31**: 4713-4726.e4.
- Morinaga T. 1929.** Interspecific Hybridization in Brassica. The Cytology of F1 Hybrids of *B. napella* and Various Other Species with 10 Chromosomes. *Cytologia* **1**: 16–27.

- Moses MJ. 1956.** Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **2**: 215–218.
- Moses MJ. 1968.** Synaptonemal complex. *Annual review of Genetics* **2**: 363–412.
- Munz P, Wolf K, Kohli J, Leupold U. 1989.** Genetics overview. Molecular biology of the fission yeast. *Cell Biology*. **1**: 1-30.
- Murakami H, Borde V, Nicolas A, & Keeney S. 2009.** Gel electrophoresis assays for analyzing DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* at various spatial resolutions. In S. Keeney (Ed.), Meiosis: Volume 1, Molecular and Genetic Methods (pp. 117-142). (*Methods in Molecular Biology*; Vol. 557). Humana Press.
- Murat F, Louis A, Maumus F, Armero A, Cooke R, Quesneville H, Crollius HR, Salse J. 2015.** Understanding Brassicaceae evolution through ancestral genome reconstruction. *Genome Biology* **16**: 262.
- Myers S, Bottolo L, Freeman C, Mcvean G, Donnelly P. 2005.** A Fine-Scale Map of Recombination Rates and Hotspots Across the Human Genome. *Science* **310** (5746): 321–325.
- Myers S, Bowden R, Tumian A, Bontrop RE, Freeman C, MacFie TS, McVean G, Donnelly P. 2010.** Drive Against Hotspot Motifs in Primates Implicates the *PRDM9* Gene in Meiotic Recombination. *Science* **327**: 876–879.
- Nagaki K, Talbert PB, Zhong CX, Dawe RK, Henikoff S, Jiang J. 2003.** Chromatin Immunoprecipitation Reveals That the 180-bp Satellite Repeat Is the Key Functional DNA Element of *Arabidopsis thaliana* Centromeres. *Genetics* **1225**: 1221–1225.
- Naish M, Alonge M, Wlodzimierz P, Tock AJ, Abramson BW, Lambing C, Kuo P, Yelina N, Hartwick N, Colt K, et al. 2021.** The genetic and epigenetic landscape of the *Arabidopsis* centromeres. *Science*. **374**(6569): eabi7489.
- Nakagawa T, Flores-Rozas H, Kolodner RD. 2001.** The MER3 Helicase Involved in Meiotic Crossing Over Is Stimulated by Single-stranded DNA-binding Proteins and Unwinds DNA in the 3' to 5' Direction. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 31487–31493.
- Nambiar M, Smith GR. 2016.** Repression of harmful meiotic recombination in centromeric regions. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **54**: 188–197.
- Nambiar M, Smith GR. 2018.** Pericentromere-Specific Cohesin Complex Prevents Meiotic Pericentric DNA Double-Strand Breaks and Lethal Crossovers. *Molecular Cell* **71**: 540-553.e4.
- Oh SD, Jessop L, Lao JP, Allers T, Lichten M, Hunter N. 2009.** Stabilization and electrophoretic analysis of meiotic recombination intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*. **557**:209–234.
- Olin-fatih M. 1992.** C-banded karyotypes of *Brassica campestris*, *B. oleracea*, and *B. napus*. *Genome*. **35**: 583-589.
- Olson LW, Eden U, Egel-Mitani M, Egel R. 1978.** Asynaptic meiosis in fission yeast? *Hereditas* **89**: 189–199.
- Olsson G. 1960.** Species crosses within the genus *Brassica*. *Hereditas* **46**: 171–223.
- Osman K, Algopishi U, Higgins JD, Henderson IR, Edwards KJ, Franklin FCH, Sanchez-moran E. 2021.** Distal Bias of Meiotic Crossovers in Hexaploid Bread Wheat Reflects Spatio-Temporal Asymmetry of the Meiotic Program. *Frontiers in Plant Science* **12**: 1–20.
- Pan J, Sasaki M, Kniewel R, Murakami H, Blitzblau HG, Tischfield SE, Zhu X, Neale MJ, Jasin M, Succi ND, et al. 2011.** A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation. *Cell* **144**: 719–731.

- Pan Q, Zhu B, Zhang D, Tong C, Ge X, Liu S, Li Z. 2019.** Gene Expression Changes During the Allo-/Deallopolyploidization Process of *Brassica napus*. *Frontiers in Genetics* **10**: 1279.
- Park HR, Kang T, Yi G, Yu SH, Shin H, Kim GW, Park JE, Kim YS, Huh JH. 2019.** Genome divergence in *Brassica rapa* subspecies revealed by whole genome analysis on a doubled-haploid line of turnip. *Plant Biotechnology Reports* **13**: 677–687.
- Park HR, Park JE, Kim JH, Shin H, Yu SH, Son S, Yi G, Lee SS, Kim HH, Huh JH. 2020.** Meiotic Chromosome Stability and Suppression of Crossover Between Non-homologous Chromosomes in xBrassicoraphanus, an Intergeneric Allotetraploid Derived From a Cross Between *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–12.
- Parker JS. 1975.** Chromosome-specific control of chiasma formation. *Chromosoma* **49**.
- Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, et al. 2014.** Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* **15**: R77.
- Pazhayam NM, Turcotte CA, Sekelsky J. 2021.** Meiotic Crossover Patterning. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9**: 1–20.
- Peciña A, Smith KN, Mézard C, Murakami H, Ohta K, Nicolas A. 2002.** Targeted Stimulation of Meiotic Recombination. *Cell* **111**: 173–184.
- Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy AA, Scheid OM. 2011.** Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biology* **9**: 24.
- Pelé A, Falque M, Trotoux G, Eber F, Nègre S, Gilet M, Huteau V, Lodé M, Jousseume T, Dechaumet S, et al. 2017.** Amplifying recombination genome-wide and reshaping crossover landscapes in Brassicas. *PLOS Genetics* **13**: e1006794.
- Pelé A, Rousseau-Gueutin M, Chèvre A-M. 2018.** Speciation Success of Polyploid Plants Closely Relates to the Regulation of Meiotic Recombination. *Frontiers in Plant Science* **9**.
- Phillips D, Jenkins G, Macaulay M, Nibau C, Wnetrzak J, Fallding D, Colas I, Oakey H, Waugh R, Ramsay L. 2015.** The effect of temperature on the male and female recombination landscape of barley. *New Phytologist* **208**: 421–429.
- Prakash S, Hinata K. 1980.** Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Botanica* **55**: 1–57.
- Prusicki MA.** Live cell imaging of meiosis in anthers of *Arabidopsis thaliana*. *PhD thesis*, Hamburg, Germany.
- Prusicki MA, Keizer EM, van Rosmalen RP, Komaki S, Seifert F, Müller K, Wijnker E, Fleck C, Schnittger A. 2019.** Live cell imaging of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **8**: e42834.
- Pyatnitskaya A, Borde V, De Muyt A. 2019.** Crossing and zipping: molecular duties of the ZMM proteins in meiosis. *Chromosoma* **128**: 181–198.
- Raz A, Dahan-Meir T, Melamed-Bessudo C, Leshkowitz D, Levy AA. 2021a.** Redistribution of Meiotic Crossovers Along Wheat Chromosomes by Virus-Induced Gene Silencing. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1–13.
- Raz A, Dahan-Meir T, Melamed-Bessudo C, Leshkowitz D, Levy AA. 2021b.** Redistribution of Meiotic Crossovers Along Wheat Chromosomes by Virus-Induced Gene Silencing. *Frontiers in Plant Science* **11**: 635139.
- Renny-Byfield S, Gong L, Gallagher JP, Wendel JF. 2015.** Persistence of Subgenomes in Paleopolyploid Cotton after 60 My of Evolution. *Molecular Biology and Evolution* **32**: 1063–1071.



- Rey M, Calderón MC, Prieto P, Lanteri S, Vega JM. 2015.** The use of the *ph1b* mutant to induce recombination between the chromosomes of wheat and barley. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–9.
- Rey MD, Martín AC, Smedley M, Hayta S, Harwood W, Shaw P, Moore G. 2018.** Magnesium increases homoeologous crossover frequency during meiosis in ZIP4 (*Ph1* gene) mutant wheat-wild relative hybrids. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–12.
- Richards EJ, Ausubel FM. 1988.** Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136.
- Rieseberg LH. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 351–358.
- Riley R, Chapman V. 1958.** Genetic Control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *Nature* **182**: 713–715.
- Rockmill B, Voelkel-Meiman K, Roeder GS. 2006.** Centromere-Proximal Crossovers Are Associated With Precocious Separation of Sister Chromatids During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **174**: 1745–1754.
- Rog O, Dernburg AF. 2013.** Chromosome pairing and synapsis during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Current opinion in cell biology* **25**: 349–356.
- Ross-Ibarra J. 2004.** The evolution of recombination under domestication: a test of two hypotheses. *American Naturalist* **163**: 105–112.
- Rousseau-Guetin M, Belser C, Da Silva C, Richard G, Istace B, Cruaud C, Falentin C, Boideau F, Boutte J, Delourme R, et al. 2020.** Long-read assembly of the *Brassica napus* reference genome Darmor-bzh. *GigaScience* **9**: 1–16.
- Rousseau-Guetin M, Morice J, Coriton O, Huteau V, Trotoux G, Nègre S, Falentin C, Deniot G, Gilet M, Eber F, et al. 2016.** The Impact of Open Pollination on the Structural Evolutionary Dynamics, Meiotic Behavior, and Fertility of Resynthesized Allotetraploid *Brassica napus* L. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **7**: 705–717.
- Rowan BA, Heavens D, Feuerborn TR, Tock AJ, Henderson IR, Weigel D. 2019.** An Ultra High-Density *Arabidopsis thaliana* Crossover Map That Refines the Influences of Structural Variation and Epigenetic Features. *Genetics* **213**: 771–787.
- Saintenac C, Falque M, Martin OC, Paux E, Feuillet C, Sourdille P. 2009.** Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum*). *Genetics*. 181(2) : 393-403
- Sakaguchi K, Ishibashi T, Uchiyama Y, Iwabata K. 2009.** The multi-replication protein A (RPA) system – a new perspective. *The FEBS Journal* **276**: 943–963.
- Sanchez-Moran E, Santos J-L, Jones GH, Franklin FCH. 2007a.** ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes & development* **21**: 2220–2233.
- Sanchez-Moran E, Santos J-L, Jones GH, Franklin FCH. 2007b.** ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **21**: 2220–2233.
- Santos T de los, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J, Hollingsworth NM. 2003.** The Mus81/Mms4 Endonuclease Acts Independently of Double-Holliday Junction Resolution to Promote a Distinct Subset of Crossovers During Meiosis in Budding Yeast. *Genetics* **164**: 81–94.
- Saze H, Scheid OM, Paszkowski J. 2003.** Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature* **34**: 65–69.

- Schmidt C, Fransz P, Rönspies M, Dreissig S, Fuchs J, Heckmann S, Houben A, Puchta H. 2020.** Changing local recombination patterns in *Arabidopsis* by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* **11**: 1–8.
- Schnable JC, Springer NM, Freeling M. 2011.** Differentiation of the maize subgenomes by genome dominance and both ancient and ongoing gene loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 4069–4074.
- Schranz ME, Lysak MA, Mitchell-Olds T. 2006.** The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends in Plant Science* **11**: 535–542.
- Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L, Barone P, Llaca V, Fengler K, Svitashv S. 2020.** CRISPR–Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. *Nature Plants* **6**: 1427–1431.
- Sears ER. 1977.** Genetic society of Canada Award of excellence lecture. An Induced Mutant With Homoeologous Pairing in common wheat. *Canadian journals of Genetics and Cytology*. **19**(4).
- Sears ER, Okamoto M. 1958.** Intergenomic chromosome pairing in hexploid wheat. *Proc. 10th Intern. Congr Genet* **2**: 258–259.
- Séguéla-Arnaud M, Choinard S, Larchevêque C, Girard C, Froger N, Crismani W, Mercier R. 2016.** RMI1 and TOP3 $\alpha$  limit meiotic CO formation through their C-terminal domains. *Nucleic Acids Research*: gkw1210.
- Séguéla-Arnaud M, Crismani W, Larchevêque C, Mazel J, Froger N, Choinard S, Lemhemdi A, Macaisne N, Van Leene J, Gevaert K, et al. 2015.** Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 $\alpha$  and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 4713–4718.
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjioudjop MN. 2006.** Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* **5**: 2569–2587.
- Serra H, Da Ines O, Degroote F, Gallego ME, White CI. 2013.** Roles of XRCC2, RAD51B and RAD51D in RAD51-Independent SSA Recombination (H Puchta, Ed.). *PLoS Genetics* **9**: e1003971.
- Serra H, Lambing C, Griffin CH, Topp SD, Nageswaran DC, Underwood CJ, Ziolkowski PA, Séguéla-Arnaud M, Fernandes JB, Mercier R, et al. 2018.** Massive crossover elevation via combination of HEI10 and *recq4a recq4b* during *Arabidopsis* meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 2437–2442.
- Serra H, Svačina R, Baumann U, Whitford R, Sutton T, Bartoš J, Sourdille P. 2021.** Ph2 encodes the mismatch repair protein MSH7-3D that inhibits wheat homoeologous recombination. *Nature Communications* **12**: 803.
- Shen C, Li X, Zhang R, Lin Z. 2017.** Genome-wide recombination rate variation in a recombination map of cotton. *PLoS ONE* **12**: 1–15.
- Sherman JD, Stack SM. 1995.** Two-Dimensional Spreads of Synaptonemal Complexes from Solanaceous Plants. *Genetics*. **141**(2) :683-708.
- Shunmugam ASK, Bollina V, Dukowic-schulze S, Bhowmik PK, Ambrose C, Higgins JD, Pozniak C, Sharpe AG, Rozwadowski K, Kagale S. 2018.** MeioCapture : an efficient method for staging and isolation of meiocytes in the prophase I sub-stages of meiosis in wheat. *BMC Plant Biology* **18**.
- Sidhu GK, Fang C, Olson MA, Falque M, Martin OC, Pawlowski WP. 2015.** Recombination patterns in maize reveal limits to crossover homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 15982–15987.
- Sims J, Schlögelhofer P, Sims J, Sims J. 2021.** From Microscopy to Nanoscopy : Defining an *Arabidopsis thaliana* Meiotic Atlas at the Nanometer Scale. *Frontiers in Plant Science*. **12**.

- Sinskaia EN. 1927.** Geno-systematical investigations of cultivated Brassica. *Bull. Appl. Bot. Plant-breed.* **XVII**: 3–160.
- Snow R. 1979.** Comment Concerning Maximum Likelihood Estimation of Linkage and Interference From Tetrad Data. *Genetics* **93**: 285–285.
- Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R. 2004.** hMSH4-hMSH5 Recognizes Holliday Junctions and Forms a Meiosis-Specific Sliding Clamp that Embraces Homologous Chromosomes. *Molecular Cell* **15**: 437–451.
- Song J-M, Guan Z, Hu J, Guo C, Yang Z, Wang S, Liu D, Wang B, Lu S, Zhou R, et al. 2020.** Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nature Plants* **6**: 34–45.
- Sourdille P, Jenczewski E. 2021.** Homoeologous exchanges in allopolyploids: how *Brassica napus* established self-control! *New Phytologist* **229**: 3041–3043.
- Stack SM, Anderson LK. 1986.** Two dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. III. Recombination nodules and crossing over in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Chromosoma* **94**: 253–258
- Stack SM, Anderson LK, Sherman JD. 1989.** Chiasmata and recombination nodules in *Lilium longiflorum*. *Genome* **32**: 486–498.
- Stebbins GL. 1958.** Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **23**: 365–377.
- Stefansson BR, Hougen FW, Downey RK. 1961.** Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Canadian Journal of Plant Science*: 218–219.
- Stein A, Coriton O, Rousseau-Gueutin M, Samans B, Schiessl SV, Obermeier C, Parkin IAP, Chèvre A-M, Snowdon RJ. 2017.** Mapping of homoeologous chromosome exchanges influencing quantitative trait variation in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 1478–1489.
- Storlazzi A, Gargano S, Ruprich-robert G, Falque M, David M, Kleckner N, Zickler D. 2011** Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing. *Cell* **141**: 94–106.
- Storme ND, Geelen D. 2020.** High temperatures alter cross-over distribution and induce male meiotic restitution in *Arabidopsis thaliana*. *Communications Biology*: 1–15.
- Stronghill PE, Azimi W, Hasenkampf CA. 2014.** A novel method to follow meiotic progression in Arabidopsis using confocal microscopy and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labeling. *Plant Methods* **10**: 33.
- Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE. 2013.** Comprehensive Analysis of Silencing Mutants Reveals Complex Regulation of the Arabidopsis Methylome. *Cell* **152**: 352–364.
- Sturtevant AH. 1913.** The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology* **14**: 43–59.
- Sturtevant AH. 1921.** Genetic Studies on DROSOPHILA SIMULANS. III. Autosomal Genes. General Discussion. *Genetics* **6**: 179–207.
- Suay L, Zhang D, Eber F, Jouy H, Lodé M, Huteau V, Coriton O, Szadkowski E, Leflon M, Martin OC, et al. 2014.** Crossover rate between homologous chromosomes and interference are regulated by the addition of specific unpaired chromosomes in Brassica. *New Phytologist* **201**: 645–656.
- Subramanian V V & Hochwagen A. 2014.** The Meiotic Checkpoint Network: Step-by-Step through Meiotic Prophase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **6**:a016675

- Sun F, Fan G, Hu Q, Zhou Y, Guan M, Tong C, Li J, Du D, Qi C, Jiang L, et al. 2017.** The high-quality genome of *Brassica napus* cultivar ‘ZS11’ reveals the introgression history in semi-winter morphotype. *The Plant Journal* **92**: 452–468.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lodé M, Huneau C, Belcram H, Coriton O, Manzaneres-Dauleux MJ, Delourme R, King GJ, et al. 2010.** The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist* **186**: 102–112.
- Taagen E, Bogdanove AJ, Sorrells ME. 2020.** Counting on Crossovers: Controlled Recombination for Plant Breeding. *Trends in Plant Science* **25**: 455–465.
- Tang H, Woodhouse MR, Cheng F, Schnable JC, Pedersen BS, Conant G, Wang X, Freeling M, Pires JC. 2012.** Altered patterns of fractionation and exon deletions in *Brassica rapa* support a two-step model of paleohexaploidy. *Genetics* **190**: 1563–1574.
- Tease C, Jones GH. 1976.** Chromosome-specific control of chiasma formation in *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **57**: 33–49.
- Terasawa Y. 1932.** Konstante amphidiploide Brassico-Raphanus Bastarde. *Proceedings Imperial Academy* **8**: 312–314.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR),** on [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), [2022].
- The Brassica rapa Genome Sequencing Project Consortium, Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, Bai Y, Mun J-H, Bancroft I, et al. 2011.** The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics* **43**: 1035.
- Thomas SE, Soltani-bejnood M, Roth P, Dorn R, Logsdon JM, Mckee BD. 2005.** Identification of Two Proteins Required for Conjunction and Regular Segregation of Achiasmata Homologs in *Drosophila* Male Meiosis. *Cell*. **123**: 555–568.
- Tock AJ and Henderson IR. 2018.** Hotspots for Initiation of Meiotic Recombination. *Front. Genet.* **9**:521.
- Tourrette E, Bernardo R, Falque M, Martin OC. 2019.** Assessing by Modeling the Consequences of Increased Recombination in Recurrent Selection of *Oryza sativa* and *Brassica rapa*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **9**: 4169–4181.
- Tourrette E, Falque M, Martin OC. 2021.** Enhancing backcross programs through increased recombination. *Genetics Selection Evolution* **53**: 25.
- Tripathi MK, Mishra AS. 2007.** Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* **132**: 1–27.
- Tsubouchi T, Zhao H, Roeder GS. 2006.** The Meiosis-Specific Zip4 Protein Regulates Crossover Distribution by Promoting Synaptonemal Complex Formation Together with Zip2. *Developmental Cell* **10**: 809–819.
- Tsunoda S. 1980.** Eco-physiology of wild and cultivated forms in Brassica and allied genera. In: Brassica crops and wild allies, biology and breeding. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 109–120.
- U N. 1935.** Genome Analysis in Brassica with Special Reference to the Experimental Formation of *B. napus* and Peculiar Mode of Fertilization. *Japanese Journal of Botany* **7**: 389–452.
- Underwood CJ, Choi K, Lambing C, Zhao X, Serra H, Borges F, Simorowski J, Ernst E, Jacob Y, Henderson IR, et al. 2018.** Epigenetic activation of meiotic recombination near *Arabidopsis thaliana* centromeres via loss of H3K9me2 and non-CG DNA methylation. *Genome Research* **28**: 519–531.

- do Vale Martins L, Yu F, Zhao H, Dennison T, Lauter N, Wang H, Deng Z, Thompson A, Semrau K, Rouillard J-M, et al. 2019.** Meiotic crossovers characterized by haplotype-specific chromosome painting in maize. *Nature Communications* **10**: 4604.
- Van Beneden E. 1883.** Recherches sur la maturation de l'oeuf et la fécondation. *Ascaris megalocéphala*. In: *Arch. Biol.* 265–640.
- Van de Peer Y, Mizrachi E, Marchal K. 2017.** The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* **18**: 411–424.
- Varas J, Sánchez-Morán E, Copenhaver GP, Santos JL, Pradillo M. 2015.** Analysis of the Relationships between DNA Double-Strand Breaks, Synaptonemal Complex and Crossovers Using the *Atfas1-4* Mutant. *PLoS Genetics* **11**: 1–29.
- Villeneuve AM, Hillers KJ. 2001.** Whence Meiosis? *Cell* **106**: 647–650.
- Vrielynck N, Chambon A, Vezon D, Pereira L, Chelysheva L, De Muyt A, Mézard C, Mayer C, Grelon M. 2016.** A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* **351**: 939–943.
- Walker J, Gao H, Zhang J, Aldridge B, Vickers M, Higgins JD, Feng X. 2018.** Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in *Arabidopsis*. *Nature Genetics* **50**: 130–137.
- Wan H, Li J, Ma S, Yang F, Chai L, Liu Z, Wang Q, Pu Z, Yang W. 2021.** Allopolyploidization increases genetic recombination in the ancestral diploid D genome during wheat evolution. *Crop Journal*.
- Wang Y, Copenhaver GP. 2018.** Meiotic Recombination : Mixing It Up in Plants. *Annual Review of plant Biology* **29**(69): 577-609.
- Wang G, He Q, Liu F, Cheng Z, Talbert PB, Jin W. 2011.** Characterization of CENH3 proteins and centromere-associated DNA sequences in diploid and allotetraploid Brassica species. *Chromosoma* **120**: 353–365.
- Watanabe Y, Nurse P. 1999.** Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*. **400**(6743) : 461-464
- Wendel JF. 2015.** The wondrous cycles of polyploidy in plants 1. *American Journal of Botany* **102**(11): 1753–1756.
- Whal HA. 1940.** Chromosome number and meiosis in the genus *Carex*. *American Journal of Botany* **27**: 458–470.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, et al. 2007.** A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* **8**: 973–982.
- Wijnker E, Velikkakam James G, Ding J, Becker F, Klasen JR, Rawat V, Rowan BA, de Jong DF, de Snoo CB, Zapata L, et al. 2013.** The genomic landscape of meiotic crossovers and gene conversions in *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **2**: e01426.
- Williamson DH, Johnston LH, Fennell DJ, Simchen G. 1983.** The timing of the S phase and other nuclear events in yeast meiosis. *Experimental Cell Research* **145**: 209–217.
- Witherspoon DJ, Watkins WS, Zhang Y, Xing J, Tolpinrud WL, Hedges DJ, Batzer MA, Jorde LB. 2009.** Alu repeats increase local recombination rates. *BMC Genomics* **10**: 530.
- Würgler FE. 1991.** Effects of chemical and physical agents on recombination events in cells of the germ line of male and female *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **250**: 275–290.

- Xiao M, Wang H, Li X, Mason AS, Fu D. 2021.** Rapeseed as an Ornamental. *Horticulturae* **8**: 27.
- Xin Q, Shen Y, Li X, Lu W, Wang X, Han X, Dong F, Wan L, Yang G. 2016.** MS5 Mediates Early Meiotic Progression and Its Natural Variants May Have Applications for Hybrid Production in *Brassica napus*. *The Plant Cell* **28**(6).
- Xiong Z, Pires JC. 2011.** Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. *Genetics* **187**: 37–49.
- Xue M, Wang J, Jiang L, Wang M, Wolfe S, Pawlowski WP, Wang Y, He Y. 2018.** The number of meiotic double-strand breaks influence crossover distribution in Arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 2628–2638.
- Yadav VK & Claeys Bouuaert C. 2021.** Mechanism and Control of Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in *S. cerevisiae*. *Front Cell Dev Biol.* **9**:642737.
- Yandeau-Nelson MD, Zhou Q, Yao H, Xu X, Nikolau BJ, Schnable PS. 2005.** MuDR Transposase Increases the Frequency of Meiotic Crossovers in the Vicinity of a Mu Insertion in the Maize *a1* Gene. *Genetics* **169**: 917–929.
- Yang C, Hamamura Y, Sofroni K, Böwer F, Stolze SC, Nakagami H, Schnittger A. 2019.** SWITCH 1/DYAD is a WINGS APART-LIKE antagonist that maintains sister chromatid cohesion in meiosis. *Nature Communications* **10**: 1755.
- Yang Y, Wang Y, Zhan J, Shi J, Wang X, Liu G, Wang H. 2017.** Genetic and Cytological Analyses of the Natural Variation of Seed Number per Pod in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science* **8**: 1890.
- Yarnell. 1956.** Cytogenetics of the vegetable crops. II. Cruciferes. *The botanical review* **22**:81-166.
- Yefremova GI, Filippova LM. 1974.** Effect of caffeine on crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* **23**: 347–352.
- Yelagandula R, Stroud H, Holec S, Zhou K, Feng S, Zhong X, Muthurajan UM, Nie X, Kawashima T, Groth M, et al. 2015.** *Cell*. **158**(1): 98–109.
- Yelina NE, Choi K, Chelysheva L, Macaulay M, de Snoo B, Wijnker E, Miller N, Drouaud J, Grelon M, Copenhagen GP, et al. 2012.** Epigenetic Remodeling of Meiotic Crossover Frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA Methyltransferase Mutants. *PLoS Genetics* **8** :e1002844.
- Yelina NE, Holland D, Gonzalez-Jorge S, Hirsz D, Yang Z, Henderson IR. 2022.** Coexpression of MEIOTIC-TOPOISOMERASE VIB-dCas9 with guide RNAs specific to a recombination hotspot is insufficient to increase crossover frequency in Arabidopsis. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **12**(7):jkac105.
- Zemach A, Kim MY, Hsieh P-H, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D. 2013.** The Arabidopsis Nucleosome Remodeler DDM1 Allows DNA Methyltransferases to Access H1-Containing Heterochromatin. *Cell* **153**: 193–205.
- Zhang W, Lee HR, Koo DH, Jiang J. 2008.** Epigenetic modification of centromeric chromatin: Hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *Plant Cell* **20**: 25–34.
- Zhang L, Liang Z, Hutchinson J, Kleckner N. 2014.** Crossover Patterning by the Beam-Film Model: Analysis and Implications. *PLoS Genetics* **10**.
- Zhang L, Ma H. 2012.** Complex evolutionary history and diverse domain organization of SET proteins suggest divergent regulatory interactions. *New Phytologist* **195**: 248–263.
- Zhang T, Talbert PB, Zhang W, Wu Y, Yang Z, Henikoff JG, Henikoff S. 2013.** The CentO satellite confers translational and rotational phasing on cenH3 nucleosomes in rice centromeres. *PNAS* **110**(50):E4875-83.

- Zhao M, Ku J-C, Liu B, Yang D, Yin L, Ferrell TJ, Stoll CE, Guo W, Zhang X, Wang D, et al. 2021.** The mop1 mutation affects the recombination landscape in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2009475118.
- Zhu L, Fernández-Jiménez N, Szymanska-Lejman M, Pelé A, Underwood CJ, Serra H, Lambing C, Dluzewska J, Bieluszewski T, Pradillo M, et al. 2021.** Natural variation identifies SNI1, the SMC5/6 component, as a modifier of meiotic crossover in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**: e2021970118.
- Zickler D, Kleckner N. 1998.** The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annual Review of Genetics* **32**: 619–697.
- Zickler D, Kleckner N. 1999.** Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annual Review of Genetics* **33**: 603–754.
- Zickler D, Kleckner N. 2016.** A few of our favorite things: Pairing, the bouquet, crossover interference and evolution of meiosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **54**: 135–148.
- Ziolkowski PA, Berchowitz LE, Lambing C, Yelina NE, Zhao X, Kelly KA, Choi K, Ziolkowska L, June V, Sanchez-Moran E, et al. 2015.** Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during Arabidopsis meiosis (D Weigel, Ed.). *eLife* **4**: e03708.
- Ziolkowski PA, Henderson IR. 2017.** Interconnections between meiotic recombination and sequence polymorphism in plant genomes. *New Phytologist* **213**: 1022–1029.
- Ziolkowski PA, Underwood CJ, Lambing C, Martinez-Garcia M, Lawrence EJ, Ziolkowska L, Griffin C, Choi K, Franklin FCH, Martienssen RA, et al. 2017.** Natural variation and dosage of the HEI10 meiotic E3 ligase control Arabidopsis crossover recombination. *Genes & Development* **31**: 306–317.
- Zirkle C. 1951.** Gregor Mendel & His Precursors. *Isis* **42**: 97–104.





**Titre :** Les modifications des règles de la recombinaison homologue chez les *Brassica*

**Mots clés :** Brassica - Méiose – Recombinaison

**Résumé :** La recombinaison méiotique est un processus important en évolution, permettant la ségrégation correcte des chromosomes et le brassage des allèles à chaque génération, lors de la méiose. Ainsi, ce processus est très régulé. De manière intéressante, les allotriploïdes AAC de *Brassica* ( $2n=3x=29$ ), issus du croisement entre *Brassica napus* (AACC,  $2n=4x=38$ ) et *Brassica rapa* (AA,  $2n=2x=20$ ), présentent une augmentation de la fréquence de crossovers (COs) et une modification de leur distribution comparé à *B. rapa*. Cependant, les causes de ces modifications restent à déterminer. Via l'utilisation de cartes génétiques et d'outils cytogénétiques, nous avons pu démontrer que ces modifications sont directement liées à la structure allotriploïde AAC. En effet, ce dernier présente plus de COs tout le long du génome, comparé à un diploïde AA mais aussi à un allotétraploïde AACC. De plus, ce phénotype peut être conservé en seconde génération si

la structure AAC est maintenue ou au contraire réversée si une structure AACC est retrouvée. Cependant, certaines régions génomiques restent dépourvues de recombinaison chez les hybrides testés. Nous avons pu démontrer que la méthylation de l'ADN et les variations structurales sont des facteurs limitants de la recombinaison chez le colza *B. napus*. Les inversions chromosomiques étant capables d'empêcher la formation de COs, y compris chez les AAC L'étude fine de la recombinaison chez les allotriploïdes pourrait permettre d'identifier de nouveaux mécanismes régulant le profil de recombinaison. D'un point de vue appliqué, les AAC représentent un outil intéressant en sélection variétale, permettant par exemple d'accélérer les schémas de sélection ou l'introduction de caractères d'intérêts, y compris dans les régions péricentromériques.

**Title :** Modification of the homologous recombination rules in *Bassica*

**Keywords :** Brassica - Meiosis - Recombination

**Abstract :** Meiotic recombination is a key evolutionary process, allowing both the correct segregation of chromosomes and the reshuffling of alleles at each generation during meiosis. Therefore, this process is highly regulated. Interestingly, *Brassica* AAC allotriploid hybrids ( $2n=3x=29$ ), deriving from the natural cross between the allotetraploid *Brassica napus* (AACC,  $2n=4x=38$ ) and the diploid *Brassica rapa* (AA,  $2n=2x=20$ ), presents a modified recombination landscape, with more crossovers (COs) all along the genome compared to *B. rapa*. Additionally, they also present a modified distribution, with the presence of COS in the normally cold pericentromere regions. However, the underlying causes of this modified recombination landscape remain to be deciphered. Using a combination of genetic mapping and cytogenetic approaches, we demonstrated that the modified recombination landscape is directly linked to the AAC genomic structure compared to a AA diploid or a AACC allotetraploid.

This phenotype may either be conserved in the second generation by maintaining the AAC, whereas it is reversed when reverting to a AACC genomic structure. However, some genomic regions remain deprived of recombination. We demonstrated that DNA methylation and structural variations such as chromosomal inversions are limiting factors of recombination in *Brassica napus*. Chromosomal inversion prevent the formation of COs within these regions, even in the highly recombining AAC hybrids. Overall, the AAC allotriploid hybrids may enable to unravel novel mechanisms regulating COs landscape. They also are particularly interesting for breeders, as they will allow to speeding up breeding programs by facilitating the introduction of traits of interest or the access of some underexploited genomic regions such as pericentromeres.