

PolyBléd :

Quelles nouvelles polyploïdisations réaliser pour une meilleure adaptation du blé tendre aux contraintes à venir ?

Annaig BOUGUENNEC*, Rémi PERRONNE², Bernard ROLLAND², Alison BENTLEY³, Keith GARDNER³, Tally WRIGTH³, Dario FOSSATI⁴, Laure DUCHALAIS⁵, Sylvain CHOMBART⁶, Constance LAVERGNE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Alexis OGER⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Meriem BANOUH¹, Peter CIVAN¹, Jérôme SALSE¹

1 - INRAE, UCA, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, IGEPP, 35653 Le Rheu, FRANCE

3 - NIAB, CB3 Cambridge OLE, ROYAUME-UNI

4 - Agroscope, 1260 Nyon 1, SUISSE

5 - Agri-Obtentions, 78660 Orsonville, FRANCE

6 - Florimond-Desprez, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

7 - Limagrain Europe, 77390 Verneuil L'Etang, FRANCE

8 - RAGT, 28150 Louville-La-Chenard, FRANCE

9 - Syngenta, 28000 Chartre, FRANCE

10 - Unisigma, 60480 Froissy, FRANCE

*Coordinateur : Annaig BOUGUENNEC, annaig.bouguennec@inrae.fr

1 Introduction

Alors que les besoins sont croissants pour cette céréale de première importance économique, nous assistons, depuis deux décennies, à la stagnation des rendements du blé tendre dans plusieurs pays européens : le progrès génétique peine à contrecarrer les effets négatifs des changements climatiques (Brisson *et al.* 2010). Ceux-ci induisent en effet des stress thermiques et/ou hydriques, des phénomènes de précipitations et vents plus violents, à des stades variés et parfois inhabituels du développement de la plante. Les changements climatiques s'accompagnent aussi d'évolutions des populations de pathogènes entraînant l'émergence de nouvelles maladies (par exemple, *Microdochium* en 2016). Tout ceci a de fortes répercussions sur les plantes. Depuis l'après-guerre, les pratiques agricoles ont beaucoup évolué pour permettre l'augmentation de la production alimentaire. Les techniques mises en œuvre ont permis de pallier de nombreux aléas biotiques et abiotiques par une artificialisation croissante du milieu. Cependant, il ne sera pas possible de faire face aux nouvelles contraintes par les mêmes méthodes qui ont aussi montré leur impact très négatif sur l'environnement et la santé (pollutions, gaz à effet de serre). S'ajoute donc la nécessité de modifier profondément les pratiques agricoles pour limiter la dégradation de l'environnement. Ceci implique une diminution drastique de l'ensemble des produits phytosanitaires, raccourcisseurs, fertilisants chimiques et un tournant vers l'agro-écologie. Enfin, les habitudes alimentaires de nos sociétés et les sensibilités individuelles évoluent aussi beaucoup, entraînant des exigences de qualités différentes et très variées. En réponse à tous ces changements, les sélectionneurs doivent faire appel à une nouvelle diversité génétique, au-delà de celle habituellement utilisée en sélection variétale.

Cependant, chez le blé tendre, plusieurs événements ont contribué à une certaine diminution de la diversité au fil du temps. En sont responsables : la sélection (Roussel *et al.* 2004) ou du moins jusque dans les années 1990 (Reif *et al.* 2005), la domestication (Haudry

et al. 2007) et surtout l'origine allopolyploïde de cette espèce hexaploïde. Le blé est issu, dans son histoire ancienne, de deux polyploïdisations successives. Or la dernière, dans le croissant fertile aux débuts de l'agriculture, a probablement impliqué peu d'événements de polyploïdisation initiaux (Dvorak *et al.* 1998, Pont *et al.* 2011) entre des blés tétraploïdes (génomes A et B) et des *Aegilops tauschii* (Ae.t) (génomme D). Ce goulot d'étranglement est particulièrement sensible pour le génome D qui demeure le moins polymorphe dans le blé tendre (Jordan *et al.* 2015). Cependant, les *Aegilops tauschii* sauvages actuels s'étendent sur une large zone géographique (de la Turquie à la Chine) ayant des conditions pédoclimatiques extrêmement variées. Ils possèdent une très grande diversité génétique et des caractères intéressants pour des stress biotiques et abiotiques (van Slageren 1994, Naghavi *et al.* 2010, cités par Sohail *et al.* 2011). Cette diversité n'est pas encore suffisamment exploitée et disponible au sein des blés modernes. C'est donc très logiquement que l'idée est venue de repartir aux sources pour pallier la faible diversité initiale du génome D du blé tendre. Des programmes de croisements entre blés tétraploïdes et Ae.t ont été réalisés, notamment par le CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maize Y Trigo), principalement pour les blés de printemps, depuis 1980 (Mujeeb-Kazi *et al.* 1996), permettant l'obtention de blés dits « blés synthétiques ». Ces travaux connaissent un regain d'intérêt depuis 2006 et la tenue du 1^{er} Synthetic Wheat Symposium en Australie. De plus, les connaissances et les outils disponibles sur les différentes espèces d'*Aegilops*, et en particulier Ae.t, progressent rapidement. De nouvelles études de diversités ont été publiées (Sohail *et al.* 2012, Jones *et al.* 2013), le génome d'*Aegilops* A178/8 a été séquencé (Luo *et al.* 2017) et dans le cadre d'un consortium international (Open Wild Wheat Consortium <http://www.openwildwheat.org>), 46 *Aegilops* choisis sont en cours de séquençage par « Whole Genome shotgun » (WGS) avec une couverture de 7,5 à 10, afin de définir le pangénomme de l'espèce. Cependant, l'intégration de la diversité génétique des Ae.t dans du matériel blé tendre actuel élite se heurte à de nombreuses difficultés.



Premièrement, il est difficile de faire un choix pertinent des Ae.t à croiser. En effet, la plupart des caractères d'intérêt recherchés pour le blé tendre, et notamment les caractères complexes comme le rendement et la qualité du grain, ne sont pas directement évaluables dans les Ae.t (Tsujiimoto *et al.* 2015), ni même facilement dans les blés synthétiques qui conservent des caractéristiques marquées de l'ancêtre sauvage (Okamoto *et al.* 2012). Il convient donc d'utiliser d'autres approches (géographiques et moléculaires notamment), comme l'ont fait Gosman *et al.* (2012), Jones *et al.* (2013) pour choisir les Ae.t intéressants, ou du moins les plus diversifiés possibles, et différents de ceux déjà exploités ou proches de la diversité génétique du sous-génome D des blés modernes. Les études sur les Ae.t distinguent 4 groupes correspondant à 2 sous-espèces *Aegilops tauschii ssp. tauschii* (elle-même divisée en 3 formes : *anathera*, *meyeri* et *typica*) et *Aegilops tauschii ssp. strangulata*. C'est cette dernière qui serait à l'origine du blé tendre (Feldman and Levy, 2012). Diverses collections d'Ae.t sont conservées et utilisées dans le monde (par les organismes suivants AXIOM™: AAFC, CIMMYT, CSIRO, JIC, KSU, NIAB, USDA, ...). Les marqueurs utilisés pour les décrire sont en général des microsatellites (ou SSR Simple Repeat Sequence) (Naghavi *et al.* 2008), des DArTseq (Elbashir *et al.* 2017), des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) spécifiques du génome D (Winfield *et al.* 2016) ou séquençage (Whole Genome shotgun) (Gaurav *et al.* 2021).

De plus, le blé tétraploïde choisi pour la création de blés synthétiques a aussi son importance. Dans l'étude de Mestiri *et al.* (2010), deux types de tétraploïdes (un blé dur, Joyau et un tétraploïde dérivé du blé tendre, Courtot) ont été croisés avec 33 Ae.t pour obtenir des blés synthétiques. L'observation et l'utilisation de ce matériel montre un intérêt accru des synthétiques issus du tétraploïde dérivé du blé tendre, plus stables et plus fertiles du fait d'un meilleur appariement chromosomique en méiose. Ceci semble en accord avec des travaux plus anciens de Kerber (Sisodia and McGinnis, 1970). Il faudrait cependant confirmer ceci dans d'autres contextes génétiques. Cet intérêt pourrait venir du cytoplasme (hypothèse de Sisodia and McGinnis 1970) et/ou de l'origine des génomes A et B. Une autre façon d'introduire une part de diversité du génome D dans un fond génétique blé tendre consiste à croiser directement l'Ae.t au blé tendre (Mujeeb-Kazi *et al.* 1996).

Deuxièmement, un caractère phénotypique mesuré chez un Ae.t (ou le parent tétraploïde) ne se retrouve pas forcément exprimé dans le blé synthétique qui en découle (Sohail *et al.* 2011). En effet, la polyploïdisation peut engendrer des réarrangements structuraux (Feldman *et al.* 1997, Yu *et al.* 2017). La taille des différents génomes parentaux mis en présence lors de la polyploïdisation pourrait jouer un rôle, via des différences de temps de divisions cellulaires notamment (Bento *et al.* 2011). Cependant, ces réarrangements ne sont pas toujours mis en évidence (Mestiri *et al.* 2010, citant aussi He *et al.* 2003). Mais la polyploïdisation est surtout susceptible d'engendrer des réarrangements fonctionnels. La redondance d'information génétique résultant de la polyploïdisation va évoluer au fil du temps vers une diploïdisation par sous/sur-expression, voire une perte ou une néo-fonctionnalisation des

gènes homéologues. Même si la part d'additivité peut être importante dans certains cas (Chagué *et al.* 2010), la polyploïdisation induit une reprogrammation génétique de telle sorte qu'il n'y a pas additivité stricte des potentiels génétiques des parents au sein du polyploïde synthétique néoformé (Li *et al.* 2015). Il a ainsi été démontré que par cette reprogrammation génétique, les polyploïdes synthétiques peuvent se développer dans des environnements contraints pour lesquels le développement des parents diploïdes et tétraploïdes apparaît plus limité (Yang *et al.* 2014). Les polyploïdes synthétiques développent ainsi des capacités génétiques et phénotypiques nouvelles non héritées des parents diploïdes et tétraploïdes mais générées par le processus de polyploïdisation, qui peut ainsi être considéré comme un choc génomique. Ces nouvelles potentialités génétiques ne viennent donc pas uniquement de la séquence génomique. Il a récemment été montré que l'expression des gènes jouait un rôle majeur dans les potentialités génétiques nouvelles des polyploïdes synthétiques. En effet, de nouveaux gènes peuvent être exprimés dans les polyploïdes synthétiques par rapports aux parents diploïdes et tétraploïdes (Li *et al.* 2014). Cela constitue un autre niveau de variabilité à exploiter. Cette reprogrammation semble dépendre des relations entre sous génomes et notamment de l'appartenance à un sous-génome dit dominant ou à un sous-génome dit sensible (Pont and Salse, 2017). Des modifications de méthylations semblent impliquées (Qiu *et al.* 2017).

Troisièmement, la plupart des travaux réalisés utilisent des croisements, suivis de rétrocroisements incluant un nombre assez limité de blés synthétiques initiaux, du fait de la lourdeur du suivi de ce matériel en schéma généalogique (Populations 'Advanced Back-Cross') (Huang *et al.* 2003, Duchalais *et al.* 2017 FSOV-2012P). Bien qu'efficace, ceci limite l'utilisation rapide de toute la diversité des nombreux blés synthétiques disponibles et les combinaisons génétiques. Une possibilité de pallier ces difficultés consiste à introduire une diversité très large en mélange et à reporter l'évaluation du caractère recherché le plus tard possible dans le schéma de pre-breeding. Chez le blé tendre, Tsujiimoto *et al.* (2015) ont développé une population dérivée de multiples blés synthétiques (43 synthétiques provenant de Langdon x 43 Ae.t, croisés et rétro-croisés avec Norin 61). Cette population permet de révéler la variabilité de l'espèce sauvage dans contexte génétique cultivable. En l'utilisant, Elbashir *et al.* (2017) ont montré que la mise en condition de stress de cette population est efficace pour identifier des dérivés tolérants au stress thermique. Leur étude moléculaire par DArT-seq a ensuite permis de remonter aux *Aegilops* parents et de préciser les zones chromosomiques potentiellement impliquées. Ce matériel a aussi été utilisé ultérieurement par Gorafi *et al.* (2018) sur d'autres caractères pour rechercher des QTL (Quantitative Trait Loci) par génétique d'association (GWAS Genome-Wide Association Study).

Les blés synthétiques semblent particulièrement intéressants pour : la résistance à la sécheresse (Sohail *et al.* 2011), la résistance à certaines maladies (Ogbonnaya *et al.* 2008, Das *et al.* 2016), à la germination sur pied (Ginkel *et al.* 2007) et potentiellement aussi des caractères tels que les carences azotées.

Au-delà des difficultés de choix de géniteurs évoquées s'ajoutent les difficultés liées aux croisements interspécifiques et notamment le problème crucial des nécroses qui peuvent s'exprimer aux différentes étapes. Au stade tétraploïde x *Aegilops*, interagissent les gènes *Net1* (génome du tétraploïde AB) et *Net2* (2DS) (Sakaguchi *et al.* 2016). Lors des croisements « exotiques » intra-blé tendre, dont font partie les croisements blé adapté x blé synthétique, ce sont les gènes *Ne1* (chromosome 5BL) et *Ne2* (2BS, lié au gène *Lr13* de résistance à la rouille brune Zhang *et al.* 2016) qui interviennent (Tsunewaki 1960, Chu *et al.* 2006).

Sur la base des connaissances et hypothèses précédentes, ce projet, décliné en 3 volets, vise à (i) caractériser la collection d'Ae.t dont nous disposons et notamment de la situer par rapport à d'autres collections et à la diversité blé tendre afin d'identifier les Ae.t les plus intéressants à croiser, (ii) étudier l'effet des parents blés tétraploïdes et Ae.t sur le blé synthétique résultant, (iii) intégrer cette diversité dans du matériel élite, via des populations soumises à contraintes biotiques et abiotiques. Les études sont menées à chaque fois aux niveaux phénotypique et génotypique (figure 1).

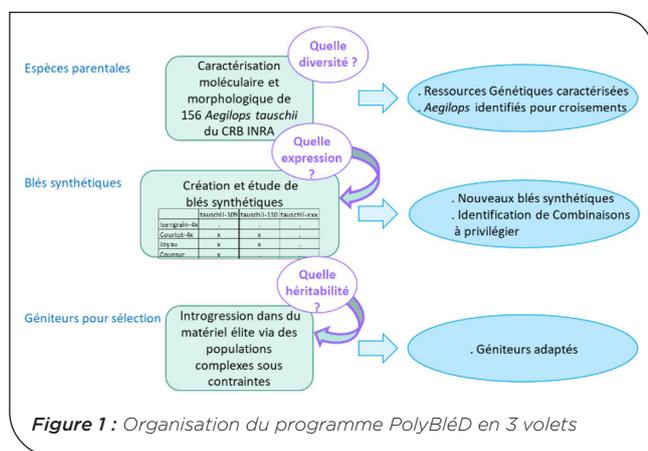


Figure 1 : Organisation du programme PolyBléD en 3 volets

2 Matériel et méthode

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

Le CRB INRAE (Centre de Ressources Biologiques de Clermont-Ferrand) dispose d'une collection de 154 Ae.t des sous-espèces *tauschii* et *strangulata*, dont certains ont déjà été utilisés par l'INRAE UMR IGEPP à Rennes (Mestiri *et al.* 2010) et inclus dans le programme de sélection blé tendre INRAE. Quatre autres Ae.t ont aussi été fournis par Agroscope.

Cette collection a été multipliée (par autofécondations) et observée en serre en 2019 (Plasse, 2019). Chaque génotype était représenté par deux plantes. Les caractères mesurés sont des caractères morphologiques et/ou agronomiques de base, en s'inspirant de la liste des descripteurs de l'IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) : forme d'épi, coloration, pilosité, hauteur, tallage, port, précocité à épiaison et floraison, et quelques caractères marquants (par exemple, sensibilité à l'oïdium). L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de feuilles coupées et congelées de ces plantes.

Pour le génotypage, nous avons utilisé un jeu de 192 marqueurs SNP, spécifiques du génome D

d'*Aegilops*, développé par le NIAB à partir de SNP identifiés chez *Aegilops* (Winfield *et al.* 2016, Jones *et al.* 2013 et Wang *et al.* 2014). Le marquage a été réalisé par la plateforme INRAE Gentyane sur une puce Standard Biotoools (anciennement Fluidigm) « 96*96 IFCs » (BMK_M.96.96). Afin de comparer la diversité des Ae.t à celle des blés, 32 blés tendres très diversifiés ont été ajoutés à la collection de 158 Ae.t. Ces blés sont des génotypes représentatifs de la diversité mondiale (un représentant de chacun des 11 groupes identifiés dans la diversité mondiale par Balfourier *et al.* (2019) et 5 représentants des 8 groupes de variétés locales, réduits à ceux de la zone géographique des Ae.t), des variétés de blés actuels marquantes de la sélection française, des lignées séquencées ou en cours, des géniteurs issus de blés synthétiques. Des Analyses en Coordonnées Principales ont été conduites par le NIAB en comparaison avec d'autres collections d'Ae.t.

► Volet 2 - Blés synthétiques

Afin d'identifier l'impact des parents blés tétraploïdes et Ae.t sur le blé synthétique résultant, nous avons essayé d'obtenir toutes les combinaisons de croisements entre 3 Ae.t et 5 blés tétraploïdes. Les 3 Ae.t sont 2 Ae.t *ssp. tauschii* (Tauschii-87 Tauschii-110) et 1 Ae.t *ssp. strangulata* (Tauschii-109). Les 5 blés tétraploïdes sont d'une part 3 *Triticum durum* : Coussur (CUR), Joyau (JOY) et Langdon (LAN) et d'autre part 2 blés tétraploïdes issus de blé tendre, obtenus par l'INRAE IGEPP (Courtot-4x : SYN et Isengrain-4x : ISE). Les croisements ont été réalisés dans les 2 sens (Ae.t utilisés en femelle ou en mâle).

Nous avons aussi croisé des blés tétraploïdes avec des Ae.t identifiés comme intéressants du volet 1. Les critères pour retenir les Ae.t étaient les suivants : ne pas avoir déjà été croisés par INRAE IGEPP, être plutôt classés dans le lignage 1, être originaux d'un point de vue moléculaire et/ou morphologique. Côté blé tétraploïdes, nous avons utilisés des variétés témoins CTPS actuelles et aussi des blés issus de croisements blé tendre x blé dur (et réciproques), partant de l'hypothèse que des sous-génomes A et B, voire le cytoplasme, de *T. aestivum* sont peut-être plus favorables que du A et B de *T. durum*.

Les croisements ont été réalisés en serre, avec des décalages de semis afin de faire coïncider les floraisons. Environ 3 semaines après anthèse, nous avons procédé à du sauvetage d'embryon sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Les plantules obtenues ont été traitées à la colchicine (solution à 2g/l pendant 4h à 22°C) à l'apparition de leur 2^e talle. Les plantes obtenues sont ensuite autofécondées.

Les blés synthétiques obtenus ont été observés et multipliés en pépinière par INRAE GDEC au fil des années du projet. En 2023, 43 blés synthétiques ont aussi pu être observés en commun chez tous les partenaires.

Au-delà de l'aspect phénotypique, nous avons aussi étudié quelques cas pour l'expression du transcriptome. Ceci a fait l'objet de la publication de Banouh *et al.* (2023). L'étude comparative de l'expression transcriptomique a été réalisée sur cinq blés synthétiques issus de quatre schémas de croisements distincts. Ces croisements (femelle indiquée en premier) comprennent deux générations du croisement Tauschii-109/Langdon (109xL), désignées C2 et C4 pour les grains, et C1 et C3 pour les feuilles, le croisement réciproque Langdon/

Tauschii-109 (Lx109) à la première génération C2 et C1 pour les grains et les feuilles respectivement, ainsi que les croisements Joyau/Tauschii-109 (Jx109) et Joyau/Tauschii-87 (Jx87) uniquement analysés sur grains.

► Volet 3 - Lignées dérivées

En 2008, une population hétérogène a été initiée par l'IGEPP à partir de 31 des blés synthétiques décrits par Mestiri *et al.* (2010) (33 *Aegilops* croisés avec le blé dur Joyau et le tétraploïde issu du blé tendre Courtot). Ces blés synthétiques ont pollinisés la variété de blé tendre Isengrain, largement cultivée, dans laquelle un gène de stérilité mâle avait été introduit (Isengrain-ms). Cette population a été cultivée à Rennes et Clermont-Ferrand et en 2011, de même, 700 plantes ont été choisies dans cette population pour polliniser la variété Charger avec gène de stérilité mâle (Charger-ms). La figure 2 illustre ces premières étapes.

En 2018, une fraction représentative de cette population nommée CIS (Charger Isengrain Synthétiques) a été distribuée à chaque partenaire du programme PolyBléd. Chacun a appliqué une contrainte abiotique et/ou biotique sur cette population en 2019, 2020 et 2021 (tableau 1).

Partenaire	Code	Contrainte appliquée	Adaptation visée
INRAE GDEC	CF	Déficit hydrique (Plateforme Phéno3C de l'UE PHACC)	Tolérance à la sécheresse
Agroscope	AG	Sous aspersion	Résistance à la germination sur pied (GSP)
Agri-Obtentions	AO	Faibles intrants (FI) (faible densité, azote et pesticides)	Rusticité
Limagrain	LG	Carences azotées	Valorisation de l'azote et efficacité de la plante
Florimond-Desprez	FD	Contamination septoriose	Résistance à la septoriose
Syngenta	SY	Contamination septoriose	Résistance à la septoriose
Unisigma	UN	Contamination rouille jaune	Résistance à la rouille jaune
RAGT 2n	RA	Multi-maladies (rouilles et septorioses)	Résistance aux maladies
IGEPP (Rennes)	IG	Pression naturelle de maladies	Résistance aux maladies

Tableau 1 : Contrainte(s) appliquée(s) par chaque partenaire sur sa sous-population CIS.

En 2021, chaque partenaire a choisi dans sa sous-population : une vingtaine de lignées ayant un bon comportement sous stress et une dizaine ayant au contraire un mauvais comportement pour contraste. Ceci a permis de constituer plusieurs panels spécifiques des différentes contraintes appliquées. De plus, un panel « agronomique » de 196 lignées intéressantes d'un point de vue agronomique global a aussi été extrait de ses sous-populations. Ces panels, multipliés et observés en 2022, ont été étudiés en 2023, soit en pépinières dans tous les lieux des partenaires (panel « agro »), soit selon leur spécificité dans les conditions adaptées. Certaines lignées figurent dans plusieurs panels. Le tableau 2 récapitule les différents panels et leur lieu d'observation en 2023.

Panel	Effectif	Lieux d'expérimentation
«agro»	196	AG+AO+CF+FD+IG+LG+RA+SY+UN
septo	159	FD+SY+RA+IG+AO
rouille jaune	120	UN+RA+IG+AO
rouille brune	90	RA+IG+AO
azote	60	LG+AO
germination sur pied	30	AG
sécheresse	30	CF

Tableau 2 : Constitution et observation des différents panels.

L'ensemble des 288 lignées ainsi obtenues a été génotypé par la plateforme INRAE Gentyane, d'une part avec la puce Axiom Affymetrix TaBW35K de 34 746 SNP (en même temps que les 31 blés synthétiques parents) et d'autre part avec les 192 marqueurs SNP utilisés sur la collection d'Ae.t (Volet 1). L'objectif est d'étudier la diversité des lignées issues de la population CIS et son éventuelle structuration, de faire une recherche de QTL par génétique d'association (GWAS Genome Wide Association Study) et d'identifier les fragments de génome D d'Ae.t intégrés dans ces lignées.

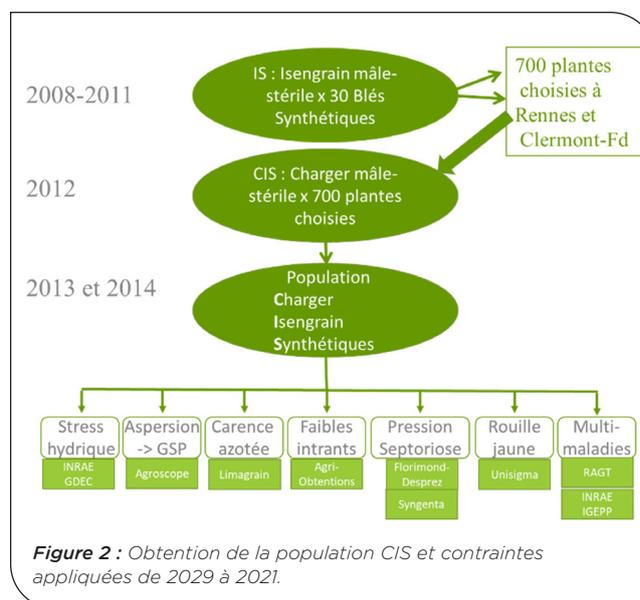


Figure 2 : Obtention de la population CIS et contraintes appliquées de 2019 à 2021.

3 Résultats

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

La compilation de divers documents (anciens cahiers INRA de Versailles et Rennes) ont permis de compléter les informations disponibles sur cette collection. L'origine géographique (pays) est disponible pour 98 Ae.t. Les plus gros effectifs viennent d'Azerbaïdjan (32), d'Iran (21) et d'Afghanistan (19). Dans quelques cas, on dispose même de latitude et longitude. La sous-espèce, *ssp. strangulata* ou *ssp. tauschii*, n'était disponible que pour 47% des Ae.t.

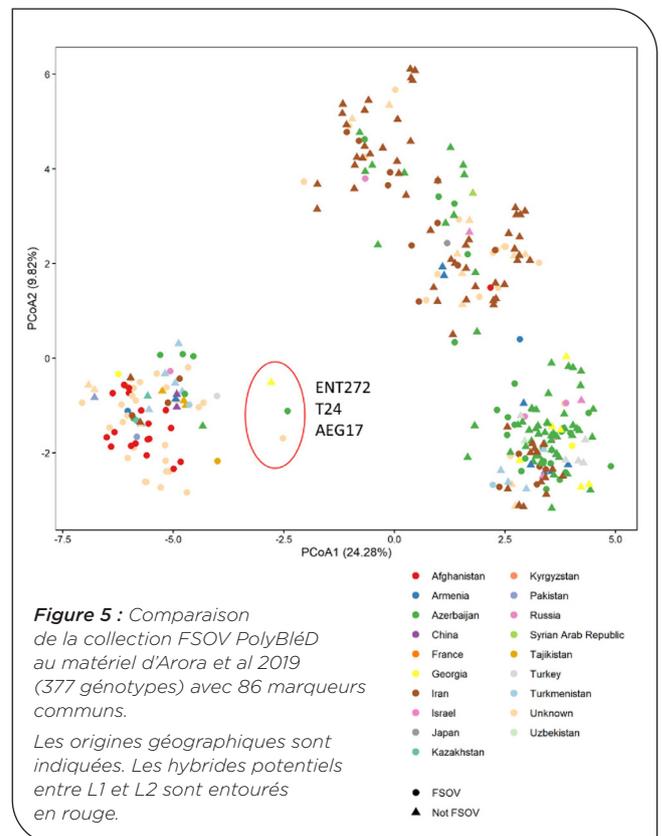
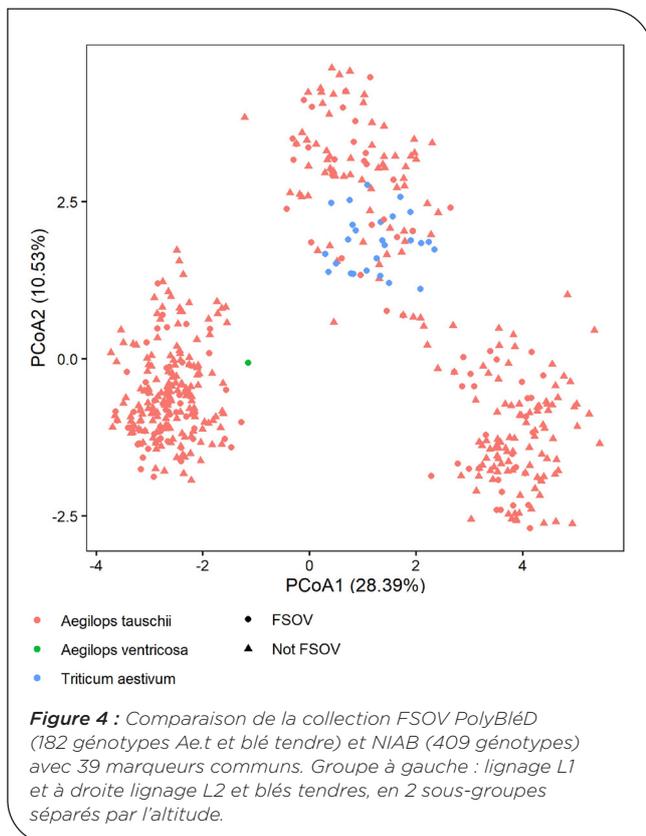
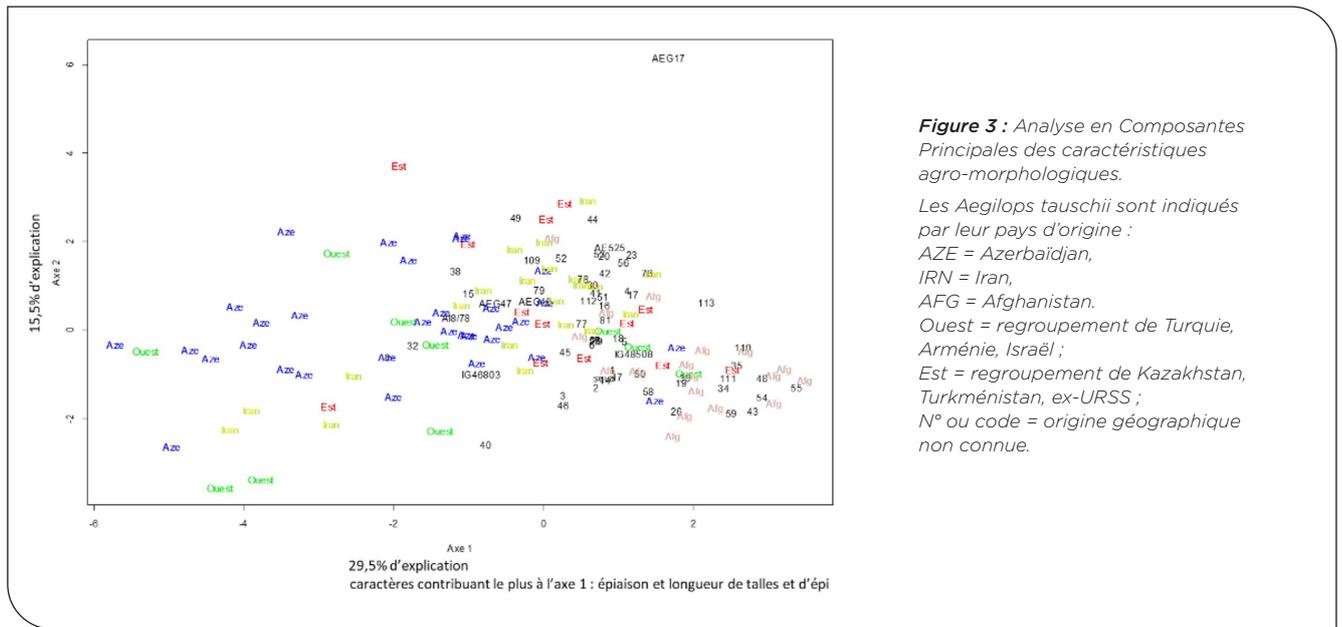
Sur les 158 accessions, deux n'ont pas germé : Tauschii-151 et AEG52. Les observations morphologiques ont permis d'émettre des hypothèses quant à leur sous-espèces (*ssp. strangulata*, *ssp. tauschii*), voire forme (*anathera*, *typica*, *meyeri*). De plus, 2 génotypes de morphologies suspectes ont été soumis à comptage chromosomique

ultérieur et se révèlent être tétraploïdes : AEG17 (très forte pilosité des glumes, espèce à déterminer) et *Aegilops tauschii* d'Arménie (dénomination erronée) qui serait en fait un *Aegilops cylindrica* (génomes D et C).

Une Analyse en Composantes Principales a été réalisée sur les caractéristiques agro-morphologiques (figure 3). Un gradient Ouest-Est apparaît sur le premier axe (qui explique 29,5% de la diversité) et auquel contribuent principalement la précocité, la longueur des talles et des épis ainsi que le nombre d'épilletts.

Notre collection a été comparée par le NIAB aux Ae.t de diverses collections (Agriculture and AgriFood

Canada (AAFC), Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO Australie), John Innes Center (JIC, Royaume-Uni), Kansas State University (KSU Etats-Unis d'Amérique et National Institut of Agricultural Botany (NIAB, Royaume-Uni), dont celle utilisée par Arora *et al.* 2019. Notre collection est assez représentative de la diversité globale des Ae.t avec des représentants dans tous les groupes décrits dans la littérature (Wang *et al.* 2013, Singh *et al.* 2019) : les marqueurs permettent de bien distinguer les lignages 1 et 2 (L1 sur une zone étendue de la Turquie à la Chine et L2 Caucase-Iran), ainsi que 2 génotypes potentiellement hybrides entre L1 et L2 ou appartenant



au lignage 3 décrit par Gaurav *et al.* (2021) et Mahjoob *et al.* (2021). L2 est considéré comme le groupe donneur du génome D du blé tendre et est séparé en 2 sous-groupes selon l'altitude. Ceci est illustré par les 2 figures 4 et 5 ci-contre.

De plus, nous avons identifié certains marqueurs polymorphes chez les Ae.t alors qu'ils sont totalement monomorphes sur les blés tendres présents, qui représentent pourtant une très large diversité.

► Volet 2 - Blés synthétiques

Le tableau 3 présente les blés synthétiques que nous avons réussi à obtenir dans le tableau de combinaisons. Tauschii-110 est le parent avec lequel nous avons eu le plus d'échecs : seul 4 combinaisons sont disponibles sur les 10 et elles ne concernent que 3 des 5 blés tétraploïdes. Le sens de croisement impliquant l'Ae.t en femelle est aussi le plus difficile : sur les 11 combinaisons manquantes 9 le sont avec Ae.t en femelle. Au final, 19 combinaisons sont obtenues sur les 30 espérées. Cependant, nous avons obtenu suffisamment de matériel végétal pour pouvoir faire de multiples

comparaisons : sens de croisements (6 cas possibles, impliquant les 3 Ae.t et les 5 blés tétraploïdes), comparaison d'un même Ae.t avec 5 blés différents (possible pour 2 Ae.t *ssp. tauschii* et *ssp. strangulata* : Tauschii-87 et Tauschii-109) et comparaison d'un blé avec 3 Ae.t différents (possible pour 3 blés, *T. durum* ou issus de *T.aestivum* : Isengrain-4x, Courtot-4x et Joyau). Pour obtenir de nouveaux blés synthétiques originaux, nous avons retenu les Ae.t et les blés présentés dans les tableaux 4 et 5.

Les 5 premiers Ae.t du tableau 4 ont été croisés uniquement avec Isengrain-4x en 2020. En l'absence de sauvetage d'embryons possible une partie de l'année (crise sanitaire covid), seuls les croisements Isengrain-4x/Tauschii-42 et AEG17/Isengrains-4x ont été fructueux (1 et 5 blés synthétiques obtenus respectivement). En 2022, les blés synthétiques suivants ont été obtenus, mais seront à confirmer : (F5 Soissons/Orlu)/Tauschii-66, (F5 Sculptur/Soissons)/Tauschii-24 et Tauschii-28/(F5 Soissons/Orlu). Suite aux croisements de 2023, Miradoux/Tauschii-28 est encore en cours de croissance.

	Tauschii-87 (<i>ssp. tauschii</i>)		Tauschii-109 (<i>ssp. strangulata</i>)		Tauschii-110 (<i>ssp. tauschii</i>)	
	Code	État d'obtention	Code	État d'obtention	Code	État d'obtention
Isengrain_4x	ISE87	Obtenu 2020 : 20DA1 x2	ISE109 (ISE)109	Obtenu 2019: 19DA5 x4 19DA5 x2	ISE110 (ISE) 110	Obtenu 2020: 20DA2 19DA6
	87ISE	Obtenu 2021: 21AD1 x1	109ISE	Obtenu 2021: 21AD5 x1	110ISE	MANQUANT
Courtot_4x	SYN87 (SYN)87	Obtenu 2019: 19DA1 19DA1	SYN109	Obtenu RE	SYN110	Obtenu RE
	87SYN	MANQUANT	109SYN 109(SYN)	MANQUANT 19AD6 x2	110SYN	Obtenu 2021: 21AD9 x1
Joyau	JOY87	Obtenu RE	JOY109	Obtenu RE	JOY110	Obtenu RE
	87JOY	MANQUANT	109JOY	Obtenu 2019 : 19AD9 x4	110JOY	MANQUANT
Coussur	CUR87	Obtenu 2021 : 21DA1 x5	CUR109	Obtenu CF : 11DA3	CUR110	MANQUANT
	87CUR	Obtenu 2019: 19AD2	109CUR	MANQUANT	110CUR	MANQUANT
Langdon	LAN87	Obtenu 2021 : 21DA3 x6	LAN109	Obtenu CF: 15DA1 x3 Obtenu 2019: 19DA5	LAN110	MANQUANT
	87LAN	MANQUANT	109LAN	Obtenu CF : 06AD1 x2 Obtenu 2019: 19AD10 x2	110LAN	MANQUANT

Fond jaune : sens de croisement Aegilops x Blé 4x
Fond gris : sens de croisement Blé 4x x Aegilops

en noir : Disponibles initialement (obtenus par INRA-IGEPP Rennes)
en violet : Disponibles initialement (obtenus par INRAE-GDEC Clermont-Ferrand)
en vert : Obtenus par PolyBléD 2019-2022 (en gris : à partir de SYN et ISE issus de FL)
en rouge : Manquants

Tableau 3 : Blés synthétiques disponibles.

Aegilops tauschii		
Géotype	Pays	Lignage
AEG17	-	L3 ou hybride
Tauschii-7	Iran	L2 haut
Tauschii-42	-	L2 bas
Tauschii-82	-	L2 haut
Tauschii-101	Iran	L2 bas
Tauschii-24	Azerbaïdjan	L3 ou hybride
Tauschii-28	-	L1
Tauschii-66	Afghanistan	L1

Tableau 4 : Aegilops tauschii utilisés pour de nouveaux croisements.

Blé tétraploïdes	
Géotype	Type
Anvergur	variété
Miradoux	variété
RGT Voilur	variété
Isengrain-4x	tétraploïde issu de blé tendre
F5 Soissons/Orlu	blé tendre x blé dur
F5 Sculptur/Soissons	blé dur x blé tendre

Tableau 5 : Blés tétraploïdes utilisés pour de nouveaux croisements.



Les blés synthétiques (tableau 6) présentant suffisamment de semences ont été observés en pépinière dans les différents sites.

	AEG17	Tauschii 42	Tauschii 87	Tauschii 109	Tauschii 110	
ISE femelle		1	2	4	1	8
ISE mâle	5		1	1		7
SYN femelle			1	1	1	3
SYN mâle					1	1
JOY femelle			1	1	1	3
JOY mâle					1	1
CUR femelle			5	1		6
CUR mâle				1		1
LAN femelle			6	3		9
LAN mâle				4		4
	43	5	1	17	16	4
			15	10	3	29
				2	6	1

Tableau 6 : Effectifs et origine généalogique des blés synthétiques observés en pépinière en 2023 (sommés en bout de lignes et colonnes).

Les blés synthétiques issus d'un même croisement ne montrent pas de différences phénotypiques marquantes. De même, le sens du croisement ne semble pas avoir d'influence sur le phénotype des blés synthétiques dans les 6 cas observés. En revanche, les croisements se distinguent nettement les uns des autres par leur aspect et colorations de feuillage et d'épi. Certains parents impriment fortement leurs caractéristiques sur les blés synthétiques. Notamment,

le blé Langdon, en mâle ou femelle, avec Tauschii-109 ou Tauschii-87, apporte sa hauteur, sa sensibilité à la verse et sa sensibilité à la rouille jaune. De même, le Ae.t Tauschii-87 apporte sa précocité lorsqu'il est croisé à Coussur, indépendamment du sens du croisement.

L'analyse transcriptomique des blés synthétiques révèle une faible proportion de modifications d'expression des gènes, soit environ 1% des gènes ayant modifié leur expression par rapport à celle de leurs parents. Le sous-génome D est particulièrement touché par ces modifications, comparativement aux deux sous-génomes A et B (figure 6). L'ontologie des gènes d'expression significativement modifiée par rapport à leurs parents, révèle cependant des caractères importants tels que des résistances à des stress biotiques et abiotiques.

Les résultats suggèrent que certaines modifications d'expression des gènes peuvent être héréditaires et reproductibles après la polyploïdisation, que ce soit dans des génotypes génétiquement similaires ou non (figure 7). Cependant, le sens de ces changements (sous-exprimés ou sur-exprimés) ne montre pas de cohérence lorsque l'on considère des génotypes génétiquement distincts (figure 7) ; certains gènes différenciellement exprimés (DEGs) sont sur-exprimés dans un génotype et sous-exprimés dans un autre, et vice versa. De plus, ces modifications d'expression sont spécifiques aux tissus, indiquant que les gènes affectés dans les feuilles diffèrent de ceux affectés dans les grains.

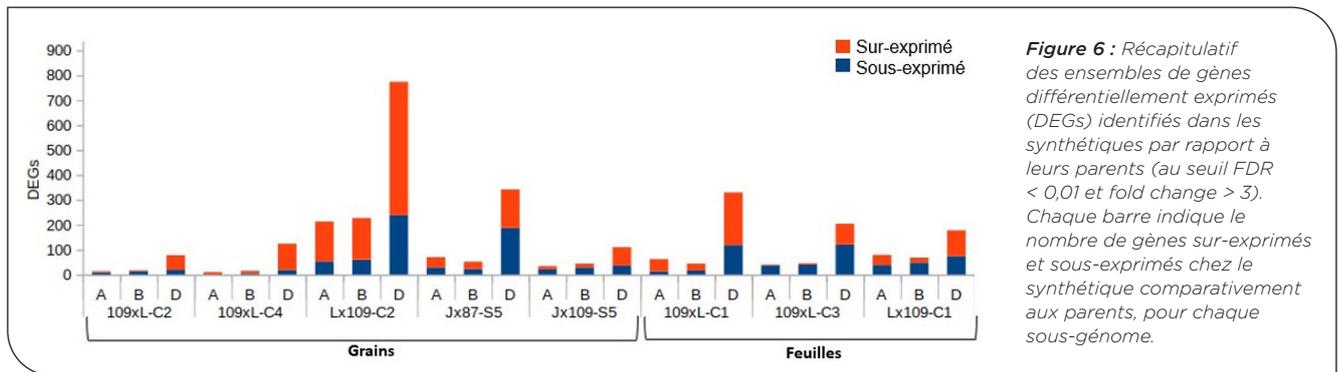


Figure 6 : Récapitulatif des ensembles de gènes différenciellement exprimés (DEGs) identifiés dans les synthétiques par rapport à leurs parents (au seuil FDR < 0,01 et fold change > 3). Chaque barre indique le nombre de gènes sur-exprimés et sous-exprimés chez le synthétique comparativement aux parents, pour chaque sous-génome.

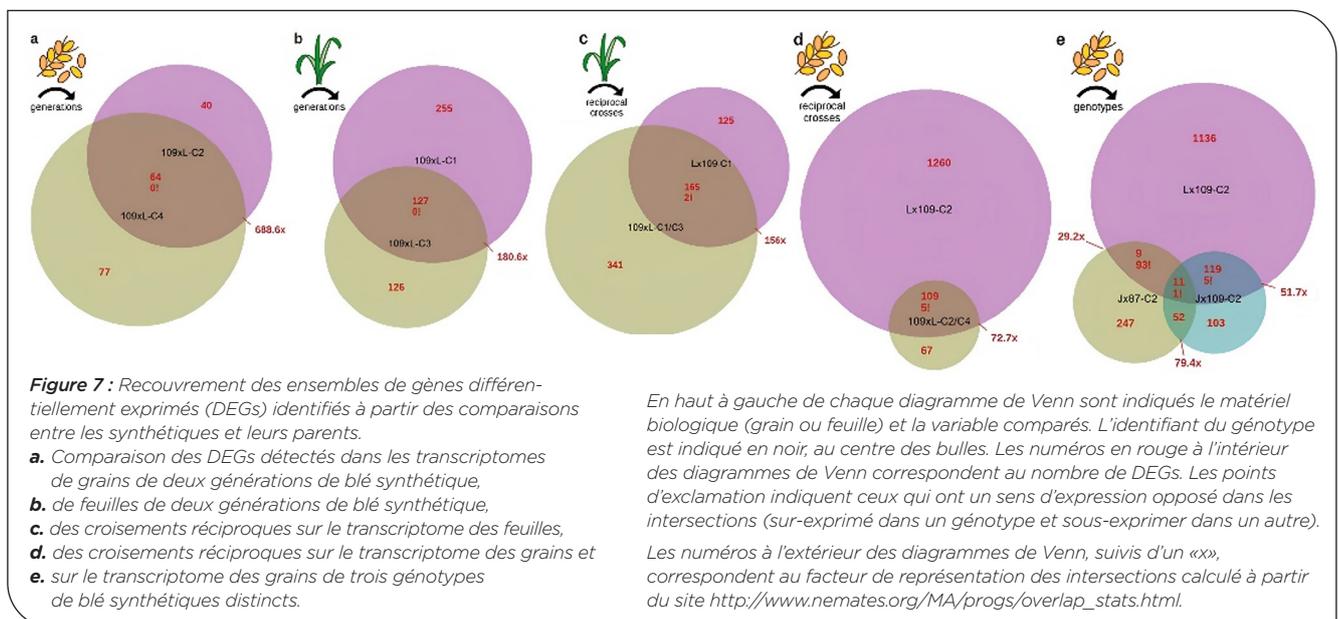


Figure 7 : Recouvrement des ensembles de gènes différenciellement exprimés (DEGs) identifiés à partir des comparaisons entre les synthétiques et leurs parents.

- a. Comparaison des DEGs détectés dans les transcriptomes de grains de deux générations de blé synthétique,
- b. de feuilles de deux générations de blé synthétique,
- c. des croisements réciproques sur le transcriptome des feuilles,
- d. des croisements réciproques sur le transcriptome des grains et
- e. sur le transcriptome des grains de trois génotypes de blé synthétiques distincts.

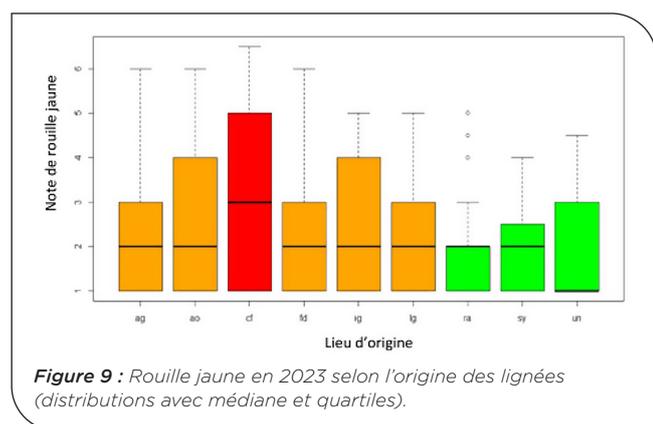
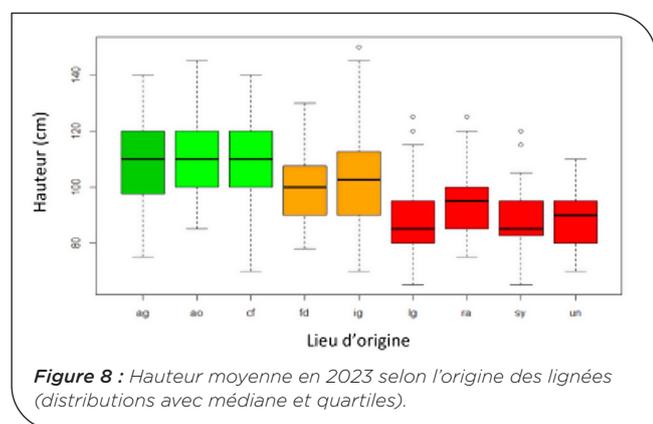
En haut à gauche de chaque diagramme de Venn sont indiqués le matériel biologique (grain ou feuille) et la variable comparés. L'identifiant du génotype est indiqué en noir, au centre des bulles. Les numéros en rouge à l'intérieur des diagrammes de Venn correspondent au nombre de DEGs. Les points d'exclamation indiquent ceux qui ont un sens d'expression opposé dans les intersections (sur-exprimé dans un génotype et sous-exprimer dans un autre).

Les numéros à l'extérieur des diagrammes de Venn, suivis d'un « x », correspondent au facteur de représentation des intersections calculé à partir du site http://www.nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html.

► Volet 3 - lignées dérivées

Le panel « agro », observé dans plusieurs lieux en 2023, a permis de caractériser et d'identifier des géniteurs potentiels (résistances aux maladies, précocité et hauteurs contrastées) (Albert, 2023). Ce dispositif nous a aussi permis d'étudier l'impact éventuel de la contrainte appliquée sur les groupes de lignées originaires de ces lieux. On ne distingue pas d'effet origine sur la précocité moyenne des lignées. Par contre, la figure 8 illustre les différences de hauteurs selon l'origine des lignées. Les lignées venant d'AG (aspersion pour GSP), AO (Faibles Intrants) et CF (sécheresse) sont plus hautes que celles venant de IG, RA, SY et UN (maladies). On constate pour la rouille jaune (figure 9), que ce sont les lignées venant de UN (pression rouille jaune) qui se révèlent en effet être les plus résistantes. Par contre, cela ne se retrouve pas pour la septoriose (lignées de IG et SY assez touchées). En revanche, les lignées de IG (pression naturelle de maladies) sont les plus résistantes à la rouille brune.

Au niveau moléculaire par contre, l'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) réalisée avec les 192 marqueurs du génome D ne met pas en évidence de structuration de la population.



Pour les panels « sécheresse », « GSP » et « azote », le faible effectif et une évaluation limitée à un lieu ne permet pas d'envisager de la GWAS. En effet, pour le panel « azote », l'expérimentation LG carencée a échoué et de même pour la conduite ordinaire de Phéno3c sur le panel « sécheresse ». Nous ne disposons donc que des conduites « non carencée » et « déficit hydrique ». Ceci ne permet plus les comparaisons espérées. Nous pouvons cependant repérer des lignées se comportant correctement en déficit hydrique et l'expérimentation

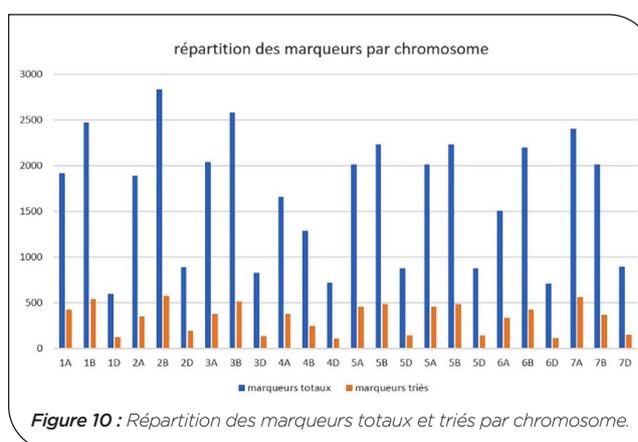
sous Phéno3C sera reconduite en 2024. Pour le panel GSP, la mesure des temps de chute de Hagberg entre les conditions stressées (aspersion) et non stressées indique que les bonnes lignées ont bien été identifiées en 2022 mais ces meilleures lignées issues de la population CIS n'atteignent pas des valeurs supérieures au-delà des bons témoins blés.

Par contre, pour les 3 panels et le panel « agro », la GWAS est en cours avec les données de 2023.

Le tri des marqueurs de la puce TaBW35k a conduit à une réduction drastique du nombre de marqueurs selon le tableau 7. Les OTV (Off-Target Variants) ont été assimilés à des données manquantes. La cause principale de cette perte de marqueurs est le monomorphisme. Au final, nous ne conserverons que 7055 marqueurs pour la GWAS. La répartition de ces marqueurs entre les 3 sous-génomes n'a pas été modifiée par cette réduction (figure 10). Comme attendu, le sous-génome D est celui pour lequel nous avons le moins de marqueurs (13,8% du total seulement) et le B le plus (45,1%). Pour cela, le complément des 192 marqueurs spécifiques du génome D d'Ae.t sera intéressant.

Cause	Nombre de marqueurs éliminés	Nombre de marqueurs restant	Pourcentage d'élimination
Nombre de SNP de TaBW35K		34 746	
Marqueurs non reproductibles (sur puce TaBW420K, en commun)	3 913	30 833	11,3
Marqueurs présentant plus de 10% de données manquantes ou OTV	710	30 123	2,3
Marqueurs présentant plus de 5% d'hétérozygotes	815	29 308	2,7
Marqueurs monomorphes	20 898	8 410	71,3
Marqueurs dont la fréquence de l'allèle minoritaire est inférieure à 1%	1 355	7 055	16,1
Au total	27 691	7 055	79,7

Tableau 7 : Effectif de marqueurs de la puce TaBW35k éliminés successivement et raison de leur retrait.



En ce qui concerne les 288 lignées, une (CIS21lg05) a dû être éliminée en raison d'un très fort nombre de données manquantes (probablement dû à un problème d'extraction d'ADN) et 12 autres lignées sont éliminées en raison d'une fréquence de données manquantes supérieure à 10% et/ou hétérozygotie supérieure à 5%.

On peut noter que les OTV sont présents en plus grand nombre sur les blés synthétiques ayant le blé dur JOY pour parent.

4 Discussion

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

Cette collection INRAE d'Ae.t, complétée par Agroscope, avait déjà été partiellement utilisée par INRAE-IGEPP (Mestiri *et al.*, 2010). Cependant, dans l'objectif de poursuivre son utilisation, elle manquait de documentation précise et notamment de comparaison avec la diversité mondiale (Ae.t, blés synthétiques et blés tendres). Le programme FSOV PolyBléD a permis de la caractériser de façon plus approfondie par collecte d'informations, caractérisation agro-morphologique et marquage moléculaire.

Afin de rechercher de la diversité moléculaire complémentaire du blé tendre dans les Ae.t, il faut veiller à utiliser des techniques adaptées à la question posée car par exemple les SNP développés pour le blé tendre à partir du polymorphisme présent à l'intérieur de l'espèce sont logiquement moins nombreux sur le génome D et passent probablement à côté de la nouvelle diversité qui nous intéresse (Winfield *et al.* 2016). Nous nous sommes pour cela appuyés sur les SNP mis au point par le NIAB spécialement sur *Aegilops*. Les génotypes ont ainsi pu être situés par rapport aux différents lignages (L1, L2 et même L3 ou hybride L1xL2, ce point sera à confirmer) et à certains Ae.t de 5 collections (AAFC, CSIRO, JIC, KSU et NIAB). Il en ressort que cette collection présente des génotypes très diversifiés et bien répartis dans tous les lignages. Nous avons pu identifier des synonymes et repérer quelques doublons et aussi repérer des Ae.t intéressants à croiser dans le volet 2. Quelques Ae.t qui semblent originaux pourraient être intéressants à proposer pour le projet européen Pro-Wild, voire dans le consortium Open Wild Wheat (OWWC).

La comparaison directe avec la diversité blé tendre reste limitée car nous n'avons génotypé simultanément que 32 blés tendres avec ces 192 SNP du génome D. Ces blés représentaient cependant une très grande diversité et peuvent ainsi donner des indications sur des zones chromosomiques qui pourraient être enrichies en diversité par ces Ae.t. De plus, via la puce TaBW35k, nous avons maintenant accès à la diversité de plus de 6500 blés tendres, dont la diversité sur le sous-génome D pourra être comparée à 31 de nos Ae.t grâce aux 31 blés synthétiques correspondants génotypés sur cette même puce. Des études bio-informatiques sur les zones enrichies en diversité par les Ae.t pourraient indiquer les caractères potentiellement touchés.

Le gradient agro-morphologique Est-Ouest constaté est probablement lié à la répartition géographique des lignages L1 et L2. La caractérisation agro-morphologique,

bien que succincte car réalisée seulement sur deux plantes en serre, permet néanmoins un choix plus aisé des génotypes Ae.t à croiser avec des blés tétraploïdes. Ce travail a d'ailleurs été commencé dans le volet 2.

► Volet 2- Blés synthétiques

Le choix des Ae.t à croiser en 2020 s'est fait essentiellement sur des caractéristiques morphologiques car nous ne disposions pas encore des données de génotypage. En revanche pour 2022 et 2023, nous avons choisi des Ae.t apportant semble-t-il un nouveau polymorphisme moléculaire a priori. Yvonnet (2022) a tenté par bio-informatique d'identifier les gènes présents dans ces zones et en a identifié 11 dont 7 pour lesquels le SNP est directement dans la séquence. Les effets de ces modifications restent cependant largement hypothétiques.

En ce qui concerne l'obtention des blés synthétiques, on constate, de même que le NIAB nous l'avait signalé, qu'il est bien plus difficile d'obtenir des blés synthétiques avec le lignage L1 que le L2, alors qu'il apporterait potentiellement le plus de diversité, étant plus éloigné des blés tendres (figure 4). Avec le lignage L1, dans le sens de croisement Ae.t/blé, nous obtenons suffisamment de grains mais peu d'embryons dans les grains formés alors que dans le sens opposé (Ae.t en mâle), nous obtenons très peu de grains mais avec plus souvent des embryons. L'étape qui nous pose le plus de difficulté reste la régénération de plantules à partir des embryons mis en culture, malgré des tests avec des milieux légèrement différents. Ce point serait à améliorer dans nos conditions de laboratoire.

Des travaux de la littérature suggèrent une plasticité génomique (forte modification de l'expression des gènes) du sous-génome D (issu d'*Aegilops*) chez le synthétique issu du croisement entre l'Ae.t (D) et le blé dur (AB) par rapport aux parents respectifs. En d'autres termes, le génome D chez le synthétique serait clairement remobilisé avec de fortes expressions de gènes par rapport au parent Ae.t. Nos résultats publiés en 2023 dans la revue scientifique BMC genomics, montrent que la plupart de ces différences sont probablement dues à des biais d'analyse des séquences produites dans le cadre d'études précédentes. La mise en œuvre d'une méthode précise et complexe d'analyse des données de séquence démontre que peu de gènes ont une expression différente chez les polyploïdes synthétiques par rapport à leurs parents. Néanmoins, malgré le faible effet de reprogrammation génomique post-polyploïdie, les gènes dont l'expression est modifiée chez le synthétique néoformé, sont principalement sur le sous-génome D, sont héréditaires (c'est-à-dire maintenu dans leur expression entre générations) et peuvent être reproduits dans différentes combinaisons parentales. Il est également important de noter que cette reprogrammation de l'expression des gènes peut se comporter de manière différente dans des synthétiques génétiquement différents (certains gènes sont sur-exprimés dans un génotype et sous-exprimés dans un autre). Cette observation est pertinente lorsqu'on considère la possibilité d'une variation de la reprogrammation génomique en fonction des caractéristiques génétiques des différents génotypes, offrant ainsi des opportunités pour exploiter une nouvelle diversité génétique pour l'amélioration du blé.

Cependant, L'observation de variations substantielles dans le changement d'expression des gènes entre différents tissus souligne la nature dynamique et non permanente de ces modifications, même au sein d'un même génotype, dépendant du type de tissu.

► Volet 3 - lignées dérivées

L'implantation de la population CIS, dérivée de 31 blés synthétiques croisés avec Isengrain-ms puis Charger-ms, sous diverses contraintes biotiques et abiotiques nous a permis d'extraire, de caractériser et d'identifier des lignées améliorées pour des caractéristiques ciblées.

L'impact de l'origine des lignées, selon la contrainte appliquée, est visible sur certains caractères (la hauteur, la rouille jaune) mais pas sur d'autres (épiaison, septoriose). Ils touchent des caractères visés ou non. La durée d'application du stress (3 ans) était relativement brève et ceci peut expliquer que l'impact ne soit pas visible sur la PcoA réalisé sur les 192 marqueurs du génome D. Le marquage par la puce TaBW35k, incluant aussi les sous-génomes A et B sera peut-être plus révélateur.

En vue de l'étude de génétique d'association (GWAS), un tri des marqueurs de la puce TaBW35K a été réalisé. Il révèle que le nombre de marqueurs monomorphes sur ce matériel est très important. Les sous-génomes A et B de cette population ne proviennent que de 4 génotypes : Charger-ms, Isengrain-ms, Courtot-4x et Joyau (blé dur). La présence d'OTV plus importante sur les lignées venant de Joyau pourrait s'expliquer par le fait que ces marqueurs ont été mis au point sur blé tendre et non blé dur. De même, sur cette puce, contrairement aux 192 SNP spécifiques d'*Aegilops*, les

marqueurs du sous-génome D blé tendre peuvent être moins adaptés à celui d'Ae.t.

La GWAS est encore en cours et devrait permettre d'identifier de nouveaux QTL sur le génome D, en particulier pour les maladies.

Les résultats de génotypage SNP des lignées intéressantes pour les contraintes abiotiques seront aussi étudiés de près, pour identifier l'apport éventuel de ce génome D diversifié.

Plusieurs lignées, dérivées de cette population et potentiellement intéressantes, ont déjà été intégrées notamment dans le programme de sélection blé tendre INRAE (en essais en 2024) ou seront utilisées en croisements dans ce programme et ceux des partenaires, attestant de l'intérêt agronomique des livrables du programme PolyBléD.

Remerciements

Merci au personnel de Gentyane pour les données fournies et de Végépole et l'UE PHACC pour leur aide.

Toutes les personnes (stagiaires, CDD, post-doctorants et techniciens) qui sont intervenues ponctuellement ou plus longuement dans ce programme depuis 2018 sont ici chaleureusement remerciées pour leur travail :

INRAE GDEC : ALBERT Amandine, BAS Honorine, DUCHEMIN Wandrille, EXBRAYAT-VINSON Florence, GATEAU Isabelle, PLASSE Pauline, PUREUR Emma, TÉNART Axelle, YVONNET Célestine ;

AGROSCOPE : BERNARD Pauline, BROQUET Camille.

Références bibliographiques

Albert A. (2023) Le potentiel agronomique de lignées issues de blés synthétiques face aux enjeux actuels. Rapport BUT2 Génie biologique option Agronomie Univ. Lyon-1. 20 p.

Arora S., Steuernagel B., Gaurav K., Chandramohan S., Long Y., Matny O., Johnson R., Enk J., Periyannan S., Singh N., Asyraf Md Hatta M., Athiyannan N., Cheema J., Yu G., Kangara N., Ghosh S., Szabo L.J., Poland J., Bariana H., Jones J.D.G., Bentley A.R., Ayliffe M., Olson E., Xu S.S., Steffenson B.J. (2019) Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *Nature Biotechnology* www.nature.com/naturebiotechnology

Balfourier F., Bouchet S., Robert S., de Oliveira R., Rimbart H., Kitt J., Choulet F., International Wheat Genome Sequencing Consortium, BreedWheat Consortium, Paux E. (2019) Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Sci. Adv.* 5: eaav0536

Banouh M., Armisen D., Bouguennec A., Huneau C., Dia Sow M., Pont C., Salse J. et Civián P. (2023) Low impact of polyploidization on the transcriptome of synthetic allohexaploid wheat. *BMC Genomics* 24, 255. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09324-2>

Bento M., Gustafson J.P., Viegas V.W., Silva, M. (2011) Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome* 54(3): 175-183

Brisson N., Gate P., Gouache D., Charmet G., Oury F.X., Huard F. (2010) Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Res.* 119: 201-212.

Chagué V., Just J., Mestiri I., Balzergue S., Tanguy A.M., Huneau C., Huteau V., Belcram H., Coriton O., Jahier J., Chalhoub B. (2010) Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids *New Phytologist* 187: 1181-1194. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03339.x

Chu C.G., Faris J.D., Friesen T.L., Xu S.S. (2006) Molecular mapping of hybrid necrosis genes Ne1 and Ne2 in hexaploid wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 112:1374-1381

Das M., Bai K., Mujeeb-Kazi G., Sanjaya A.R. (2016) Genetic diversity among synthetic hexaploid wheat accessions (*Triticum aestivum*) with resistance to several fungal diseases. *Genetic Resources and crop evolution* 63(8): 1285-1296 DOI: 10.1007/s10722-015-0312-9

Duchalais L., Caiveau S., Beghin D., Duperrier B., Auzanneau J., Debiton C., Bouguennec A., Jahier J., Rolland B. (2017) Valorisation de nouveaux gènes de résistance et de qualité issus d'*Aegilops tauschii*. Colloque FSOV du 23 mars 2017 Synthèses des programmes de recherche FSOV 2012, 79-92.



- Dvorak J., Luo M. C., Yang Z.L., Zhang H.B.** (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 97: 657-670.
- Elbashir A.A.E., Gorafi Y.S.A., Tahir I.S.A., Kim J.S., Tsujimoto H.** (2017) Wheat multiple synthetic derivatives: a new source for heat stress tolerance adaptive traits. *Breeding Science Preview* doi:10.1270/jsbbs.16204
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A.A., Vega J.M.** (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381-1387.
- Feldman M. and Levy A.A.** (2012) Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192(3): 763-774
- Gaurav et al.** (2021) Population genomic analysis of *Aegilops tauschii* identifies targets for bread wheat improvement. *Nature Biotechnology* 40, 422-431
- Ginkel M. van, Ogonnaya F., Imtiaz M., Ramage C., Borgognone M. G., Dreccer F., Eder J., Emmerling M., Hearnden P., Lagudah E., Pellegrineschi A., Trethowan R., Wilson J., Spangenberg G.** (2007) Molecular breeding for salt tolerance, pre-harvest sprouting resistance and disease resistance using synthetic hexaploid wheats, genetic transformation, and associated molecular markers. Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, Mar del Plata, Argentina, 27 November - 2 December 2005 Pages: 383-385 Editors: Buck H. T., Nisi J. E., Salomon N.
- Gorafi Y.S.A., Kim J.S., Elbashir A.A.E., Tsujimoto H.** (2018) A population of wheat multiple synthetic derivatives: an effective platform to explore, harness and utilize genetic diversity of *Aegilops tauschii* for wheat improvement. *Theoretical and Applied Genetics* (2018) 131:1615-1626 - <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3102-x>
- Gosman N., Jones H., Hornsnell R., Kowalski A., Rose G., Everest L., Bentley A., Tha S., Uauy C. Novoselovic D., Simek R., Kobiljski B., Kondic-Spika A., Mitrofanova O., Chesnokov Y., Greenland A.** (2012) Exploitation of novel functional D-genome diversity in synthetic hexaploid wheat. 19th Eucarpia general congress. Plant breeding for future generation, p73-76. Budapest, Hungary. Ed Zoltan Bedö and Laszlo Lang.
- Haudry A., Cenci A., Ravel C., Bataillon T., Brunel D., Poncet C., Hochu I., Poirier S., Santoni S., Glemin S., David J.** (2007) Grinding up wheat: A mass loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1506-1517.
- He P., Friebe B.R., Gill B.S., Zhou J.M.** (2003). Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* 52: 401-414. Huang X.Q., Cöster H., Ganai M.W., Röder M.S. (2003) Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* (2003) 106(8): 1379-1389. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1179-7>
- Jones H., Gosman N., Hornsnell R., Rose G. A., Everest L. A., Bentley A. R., Tha, S. Uauy C., Kowalski A., Novoselovic D., Simek R., Kobiljski B., Kondic-Spika A., BrBaklic L., Mitrofanova O., Chesnokov Y., Bonnett D., Greenland A.** (2013) Strategy for exploiting exotic germplasm using genetic, morphological, and environmental diversity: the *Aegilops tauschii* Coss. Example. *Theor. Appl. Genet.* 126(7): 1793-1808.
- Jordan K.W., Wang S., Lun Y., Gardiner L.J., MacLachlan R., Hucl P., Wiebe K., Wong D., Forrest K.L., IWGS Consortium, Sharpe A.G., Sidebottom C.H., Hall N., Toomajian C., Close T., Dubcovsky J., Akhunova A., Talbert L., Bansal U.K., Bariana H.S., Hayden M.J., Pozniak C., Jeddelloh J.A., Hall A., Akhunov E.** (2015) A haplotype map of allohexaploid wheat reveals distinct patterns of selection on homoeologous genomes. *Genome Biol.* 2015 Feb 26;16:48. doi: 10.1186/s13059-015-0606-4.
- Kabbaj H., Sall A.T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F.M.** (2017) Genetic diversity within a global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. *Front Plant Sci.* 2017 Jul 18;8:1277. doi: 10.3389/fpls.2017.01277. eCollection 2017.
- Li A., Liu D., Wu J., Zhao X., Hao M., Geng S., Yan J., Jiang X., Zhang L., Wu J., Yin L., Zhang R., Wu L., Zheng Y., Mao L.** (2014) mRNA and small RNA transcriptomes reveal insights into dynamic homoeolog regulation of allopolyploid heterosis in nascent hexaploid wheat. *Plant Cell.* 26(5): 1878-1900.
- Li A.L., Geng S.F., Zhang L.Q., Liu D.C., Mao L.** (2015) Making the bread: insights from newly synthesized allohexaploid wheat. *Mol Plant.* 8(6): 847-59.
- Luo M.C., Gu Y.Q., Puiu D., Wang H., Twardziok S.O., Deal K.R., Huo N.X., Zhu T.T., Wang L., Wang Y., (...), Leroy P., (...), Dvorak J.** (2017) Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature* 551(7681): 498-+ DOI: 10.1038/nature24486
- Mahjoob et al.** (2021) Traits to differentiate lineages and subspecies of *Aegilops tauschii*, the D genome progenitor species of bread wheat. *Diversity* 2021, 13, 217. <https://doi.org/10.3390/d13050217>
- Mestiri, I., Chague V., Tanguy A. M., Huneau C., Huteau V., Belcram H., Coriton O., Chalhoub B., Jahier J.** (2010) Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytol* 186: 86-101.
- Mujeeb-Kazi A., Rosas V., Roldan S.** (1996) Conservation of the genetic variation of *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh. (*Aegilops squarrosa* auct. Non L.) in synthetic hexaploid wheats (*T. turgidum* L. s.lat. x *T. tauschii*; 2n = 6x = 42, AABBDD) and its potential utilization for wheat improvement. *Genetic Resources and crop evolution* 43: 129-134.
- Murashige T. and Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15 (3), 473-497
- Naghavi, M. R., Mardi, M., Pirseyedi, S. M., et al.** (2008) Evaluation of genetic diversity in the subspecies of *Aegilops tauschii* using microsatellite markers *Cereal Research Communications* 36(1): 21-31.
- Ogonnaya F. C., Imtiaz M., Bariana H. S., McLean M., Shankar M. M., Hollaway G. J., Trethowan R. M., Lagudah E. S., Ginkel M. van** (2008) Mining synthetic hexaploids for multiple disease resistance to improve bread wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 59(5): 421-431 DOI: 10.1071/AR07227
- Okamoto Y., Kajimura T., Ikeda T.M., Takumi S.** (2012) Evidence from principal component analysis for improvement of grain shape- and spikelet morphology-related traits after hexaploid wheat speciation *Genes & Genetic systems* 87(5): 299-310.

Plasse P. (2019) Suivi et description d'une collection d'*Aegilops tauschii* en vue de l'élargissement de la diversité génétique du blé tendre. Rapport DUT Génie biologique option Agronomie Univ. Clermont Auvergne. 20 p.

Pont C., Murat F., Confolent C., Balzergue S., Salse J. (2011) RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genome Biology* 2011, 12: R119

Pont C., Salse J. (2017) Wheat paleohistory created asymmetrical genomic evolution. *Curr Opin Plant Biol.* 2017 Apr., 36: 29-37.

Qiu T., Dong Y.Z., Yu X.M., Zhao N., Yang Y.F. (2017) Analysis of allopolyploidy-induced rapid genetic and epigenetic changes and their relationship in wheat. *Genet Mol Res.* 2017 Apr 5;16(2). doi: 10.4238/gmr16029303.

Reif J.C., Zhang P., Dreisigacker S. et al. (2005) Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 110(5): 859-864.

Roussel V., Koenig J., Beckert M., Balfourier F. (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* 108: 920-930.

Sakaguchi K., Nishijima R., Iehisa J. C. M., Takumi S. (2016) Fine mapping and genetic association analysis of Net2, the causative D-genome locus of low temperature-induced hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* *Genetica* 144(5): 523-533.

Singh N., Wu S., Tiwari V., Sehgal S., Raupp J., Wilson D., Abbasov M., Gill B., Poland J. (2019) Genomic analysis confirms population structure and identifies inter-lineage hybrids in *Aegilops tauschii*. *Front. Plant Sci.* 10:9. doi: 10.3389/fpls.2019.00009

Sisodia N.S. and McGinnis R.C. (1970) Importance of Hexaploid Wheat Germ Plasm in Hexaploid Triticale Breeding. *Crop Science* 10 :161-162

Sohail Q., Inoue T., Tanaka H., Eltayeb A.E., Matsuoka Y., Tsujimoto, H. (2011) Applicability of *Aegilops tauschii* drought tolerance traits to breeding of hexaploid wheat. *Breeding Science* 61(4): 347-357. DOI: 10.1270/jsbbs.61.347.

Sohail Q., Shehzad T., Kilian A., Eltayeb A.E., Tanaka H., Tsujimoto H. (2012) Development of diversity array technology (DArT) markers for assessment of population structure and diversity in *Aegilops tauschii*. *Breeding Science* 62(1): 38-45. DOI: 10.1270/jsbbs.62.38

Tsujimoto H., Sohail Q., Matusoka Y. (2015) Broadening the genetic diversity of common and durum wheat for abiotic stress tolerance breeding. In: Oginara Y., Takumi S. and Handa H. (eds.) *Advances in Wheat Genetics: From genome to field.* Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Springer, Yokohama, Japan, pp. 233-238.

Tsunewaki K. (1960) Monosomic and conventional gene analysis in common wheat. III. Lethality. *Jpn J Genet* 35: 594-601.

van Slageren M.W. (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach) Eig (Poaceae). ICARDA and Wageningen Agric. Univ. 94 p. 512.

Wang S. et al. (2014) Characterization of polyploidy wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array *Plant Biotechnology Journal* 12, 787-796

Winfield M.O., Allen A.M., Burrige A.J., Barker G.L.A., Benbow H.R., Wilkinson P.A., Coghill J., Waterfall C., Davassi A., Scopes G., Pirani A., Webster T., Brew F. C., Bloor C., King J., West C., Griffiths S., King I., Bentley A.R., Edwards K.J. (2016) High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool *Plant Biotechnology Journal* 14: 1195-1206.

Yang C., Zhao L., Zhang H., Yang Z., Wang H., Wen S., Zhang C., Rustgi S., von Wettstein D., Liu B. (2014) Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *PNAS USA.* 111(32): 11882-7.

Yu M., Guan L.L., Chen G.Y., Pu Z.E., Hou D.B. (2017) Allopolyploidy-induced rapid genomic changes in newly generated synthetic hexaploid wheat. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 31(2): 236-242. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1273797>

Yvonnet C. (2022) Analyse et exploitation du génome D d'*Aegilops tauschii* pour la production de blés tendres adaptés aux changements à venir. Master 1 Biologie des plantes pour l'agroenvironnement, Université de Montpellier

Zhang P., Hiebert C.W., McIntosh R.A., McCallum B.D., Thomas J.B., Hoxha S., Singh D., Bansal U. (2016) The relationship of leaf rust resistance gene Lr13 and hybrid necrosis gene Ne2m on wheat chromosome 2BS. *Theor Appl Genet* 129: 485-493.

PolyBléD : Quelles nouvelles polyploïdisations réaliser pour une meilleure adaptation du blé tendre aux contraintes à venir ?

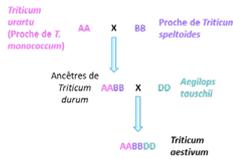
Annaig BOUGUENNEC¹, Rémi PERRONNE², Bernard ROLLAND², Alison BENTLEY³, Keith GARDNER³, Tally WRIGTH³, Dario FOSSATI⁴, Laure DUCHALAIS⁵, Sylvain CHOMBART⁶, Constance LAVERGNE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Alexis OGER⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Meriem BANOUH¹, Peter CIVÁŇ¹, Jérôme SALSE¹

1 - INRAE, UCA, GDEC, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE
 2 - INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, IGEPP, 35653 Le Rheu, FRANCE
 3 - NIAB, CB3 Cambridge OLE, ROYAUME-UNI
 4 - Agroscope, 1200 Nyon 1, SUISSE
 5 - Agri-Obtentions, 78660 Orsonville, FRANCE
 6 - Florimond-Desprez, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

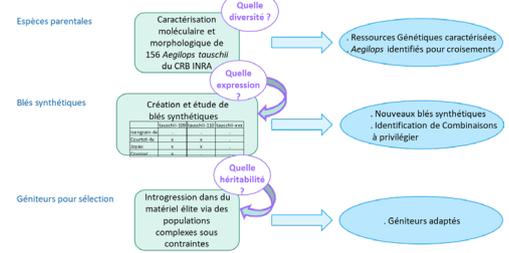
7 - Limagrain Europe, 77390 Verneuil L'Étang, FRANCE
 8 - RAGT, 28150 Louville-La-Chenard, FRANCE
 9 - Syngenta 28000 Chartre, FRANCE
 10 - Unisigma, 60480 Froissy, FRANCE

Contexte :

- nécessité d'élargir la diversité du blé tendre pour faire face aux enjeux à venir
 - en particulier sur le génome D
 ⇒ à partir d'*Aegilops tauschii*
 compte tenu de l'origine polyploïde du blé tendre



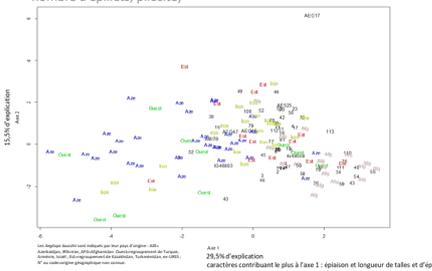
Programme en 3 parties :



1. Une collection de 156 *Aegilops tauschii* bien diversifiée et caractérisée

✓ Caractérisation agro-morphologique :

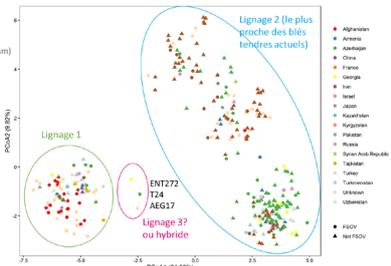
(épaisseur, nombre et longueur de talles, d'entre-nœuds, d'épi, nombre d'épillets, pilosité)



Analyse en Composantes Principales réalisée sur des mesures agro-morphologiques en serre
 ⇒ Gradient d'ouest en est selon l'origine des *Ae. tauschii* :
 Précocité croissante, Hauteur décroissante, Longueur d'épi décroissante
 Nombre d'épillets décroissant

✓ Caractérisation moléculaire : 192 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) du NIAB :

86 marqueurs communs avec d'autres collections d'*Ae. tauschii* de : AAFC, CSIRO, JIC, KSU et NIAB (348 *Ae. tauschii*)



Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) réalisée sur SNP
 ⇒ Collection FSOV bien répartie entre les lignages 1 et 2, et même quelques lignages 3 ou hybrides
 ⇒ Identification de doublons intra et inter-collections
 ⇒ Choix d'*Ae. tauschii* originaux à croiser

2. De nouveaux blés synthétiques obtenus et étudiés

Nouveaux blés synthétiques originaux ou faisant partie d'un tableau d'étude :

- ⇒ Obtention de : Isengrain-4x/Tauschii-42 AEG17/Isengrain-4x
- ⇒ Obtention à confirmer de : Tauschii-28/(F5 Soissons/Orlu) (F5 Sculptur/Soissons)/Tauschii-24 (F5 Soissons/Orlu)/Tauschii-66

5 blés 4x *T. Durum* ou issus de *T. aestivum*

- ⇒ Tableau d'étude complété
- ✓ Observations agronomiques : influence des parents marqués sur certains caractères
- ✓ Étude transcriptomique : peu de modifications d'expression chez les blés synthétiques par rapport à leurs parents (~1% des gènes) mais :
 - génome D plus touché
 - reproductibles et héréditaires pour certains, mais sens variable (sur ou sous-expression)

3 *Ae. tauschii* de différents lignages

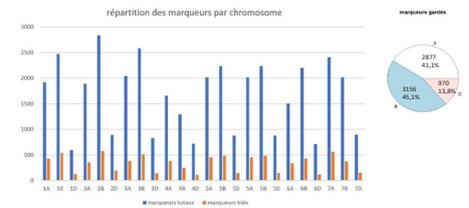
	Tauschii 87 (esp. rouennais)	Tauschii 109 (esp. strasbourgeois)	Tauschii 110 (esp. rouennais)
	code	code	code
benjamin_4x	87B17 Obtenu 2020 / 20DA1 42	109C19 Obtenu 2020 / 19DA5 41	110E13 Obtenu 2020 / 20DA2 110A4
	87B16 Obtenu 2021 / 21DA1 41	109B4 Obtenu 2021 / 21A05 41	110K4 MANQUANT
Courcot_4x	87N47 Obtenu 2019 / 19DA1 19B14	109N19 Obtenu 2019 / 19DA1 19B14	110N19 Obtenu 2021 / 21A05 41
	87N14 MANQUANT	109N14 MANQUANT	110N14 MANQUANT
Joveu	87J17 Obtenu 2021 / 21DA1 45	109J19 Obtenu 2021 / 21A05 41	110J19 Obtenu 2021 / 21A05 41
	87J09 MANQUANT	109J09 MANQUANT	110J09 MANQUANT
Cousser	87C17 Obtenu 2021 / 21DA1 45	109C19 Obtenu 2021 / 21A05 41	110C19 MANQUANT
	87C18 Obtenu 2019 / 19DA2 19C18	109C18 MANQUANT	110C18 MANQUANT
Langdon	87L17 Obtenu 2021 / 21DA1 46	109L19 Obtenu 2021 / 21A05 41	110L19 MANQUANT
	87L14 MANQUANT	109L14 MANQUANT	110L14 MANQUANT

fond jaune : sens de croisement Agriplus x Blé 4x en noir : Disponible uniquement (obtenus par INRA-GEPP Rennes)
 fond gris : sens de croisement Blé 4x x Agriplus en vert : Disponibles uniquement (obtenus par INRA-GEPP Clermont-Ferrand)
 en rouge : en vert : Obtenus par PolyBléD 2020-2022 par gén. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 (à l'exception de 110K4)

3. Des lignées dérivées de populations sous contraintes caractérisées pour être utilisées en géniteurs

Une population constituée à partir de 31 blés synthétiques pollinisateurs de Isengrain-ms (mâle stérile) et Charger-ms a été soumise à des contraintes biotiques ou abiotiques chez chaque partenaire pendant 3 ans : Sécheresse (« Phéno3C »), Germination sur pied (aspersion), Carence azotée, Bas Niveau d'intrants, Rouille jaune (contamination), septoriose (contamination), pression multi-maladies

- 288 lignées en ont été dérivées :
 - ✓ phénotypées en 2023 sur plusieurs sites
 - ✓ génotypées sur une puce Axiom 35k
- ⇒ Génétique d'association (Genome Wide Association Study) en cours avec 7 055 marqueurs triés
- ⇒ Géniteurs potentiels identifiés



Conclusions et perspectives

- ✓ Matériel végétal original obtenu et caractérisé, en cours de valorisation
- ✓ Meilleure compréhension des mécanismes en jeu
- ✓ Plusieurs stages d'étudiants réalisés (P. Plasse, H. Bas, C. Yvonne, A. Albert, A. Ténart)
- ✓ Publication : Banouh M., Armisen D., Bouguennec A., Huneau C., Dia Sow M., Pont C., Salse J. et Civaň P. (2023) Low impact of polyploidization on the transcriptome of synthetic allohexaploid wheat. BMC Genomics 24, 255. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09324-2>
- ✓ Nombreuses analyses encore à réaliser à partir des données collectées et autres publications envisageables

