

EFFET DE LA STRUCTURE GENOMIQUE DES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES COLZA-RAVENELLE SUR LA COMPOSITION CHROMOSOMIQUE DES GENERATIONS ULTERIEURES

EFFECT OF GENOMIC STRUCTURE OF THE OILSEED RAPE-WILD RADISH HYBRIDS ON THE CHROMOSOMIC COMPOSITION OF THE FOLLOWING GENERATIONS

A.M. CHEVRE, F. EBER, E. JENCZEWSKI, M. RENARD

UMR INRA/ENSAR, Amélioration des plantes et Biotechnologies végétales. INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex

RESUME

Le développement des variétés transgéniques de colza résistantes à certains herbicides (*Brassica napus*, AACC, $2n=38$) a conduit à s'interroger sur les possibilités de flux de gènes du colza vers ses adventices. Nos travaux antérieurs ont montré que la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, $2n=18$) était l'une des principales espèces à prendre en compte dans les conditions françaises de culture. L'ensemble des résultats acquis a montré que la production de gamètes réduits et non réduits pouvaient conduire aux différentes générations à une grande diversité de structures. Cette importante variabilité, combinée aux contraintes d'un suivi en conditions naturelles (recherche d'un événement rare, diversité des milieux et impossibilité d'identifier le pollinisateur), rend difficile la caractérisation du matériel produit.

Lors de la production des hybrides F1, 10 combinaisons génomiques (dont 5 déjà observées) sont possibles, en considérant les deux sens possibles de croisements. Aux générations ultérieures, sous l'hypothèse d'hybrides mis en présence de ravenelles, le nombre de chromosomes peut varier de 18 à 56. L'analyse des différents outils de caractérisation (observations morphologiques, présence du transgène, caractérisation cytogénétique, marquage moléculaire) révèle que seule la combinaison de différentes méthodes peut permettre d'identifier les différents hybrides. La diversité des structures génomiques et la lourdeur des méthodes de caractérisation à mettre en œuvre conduit à s'interroger sur les possibilités d'un suivi au champ dès les premières générations.

SUMMARY

*Because of the development of transgenic herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus*, AACC, $2n=38$) varieties, studies for assessing gene flow from this crop to its weeds have been performed. Our previous work showed that wild radish (*Raphanus**

raphanistrum, RrRr, $2n=18$) is one of the main weed which has to be considered under French cultivation conditions. At the first generation of interspecific hybridisation, viable reduced and unreduced gametes allow the production of F1 hybrids with different genomic

structures. Theoretically, 10 different structures can be obtained from reciprocal crosses and 5 have already been observed. The identified hybrids were grown in presence of wild radish as pollinator and the chromosome numbers of the plants in the following generations ranged from 18 to 56. So a large variability can be observed, taking into account that we are

looking for a rare event, the pollen donor remaining unknown at the harvest under natural conditions. Combination of different tools for characterisation i.e. morphology, transgene expression, cytogenetic analyses, molecular makers is needed for monitoring interspecific gene flow.

INTRODUCTION

Différentes variétés de colza transgéniques (*Brassica napus*, AACC, 2n=38), principalement résistantes à certains herbicides, sont largement cultivées au Canada et aux USA. Le caractère partiellement allogame de cette espèce et la présence de nombreuses adventices appartenant à des espèces voisines en conditions de culture a conduit à s'interroger sur les possibilités de flux de gènes entre espèces, *via* le pollen. Nous avons choisi de travailler sur les trois adventices les plus fréquentes, dans les conditions françaises, la roquette bâtarde (*Hirschfeldia incana*, AdAd, 2n=14), la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, 2n=18) et la moutarde des champs ou sanve (*Sinapis arvensis*, SarSar, 2n=18). Les résultats obtenus en conditions optimales de croisement au champ nous ont amenés à approfondir notre étude sur la ravenelle du fait des fréquences d'hybridation observées (Baranger *et al.*, 1995) et des possibilités d'échange entre les génomes (Kerlan *et al.*, 1993). Des essais ont été conduits en conditions agronomiques montrant que la fréquence d'hybridation interspécifique est faible (Chèvre *et al.*, 2000). Les générations ultérieures ont été étudiées en présence de ravenelle comme pollinisateur (Chèvre *et al.*, 1997).

Nous avons pu observer au cours de ces travaux que, même si la production de gamètes réduits est majoritaire, la présence de gamètes non réduits conduit à une grande diversité de structures génomiques. Pour chaque structure, nous avons étudié la morphologie des plantes et leurs fertilités, le taux de transmission du transgène, les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires. L'ensemble de ces observations nous permet d'analyser les conditions de détection et leurs limites pour un suivi en conditions naturelles.

Production d'hybrides f1 interspécifiques



La mise en présence de colza et de ravenelle, en conditions naturelles, peut conduire théoriquement à la production de 10 types de structures génomiques distinctes, du fait de la présence de gamètes réduits et non réduits (Tableau 1). Les travaux conduits en conditions de champ (Baranger *et al.*, 1995 ; Darmency *et al.*, 1998 ; Chèvre *et al.*, 2000 ; Rieger *et al.*, 2001) révèlent que la majorité des hybrides interspécifiques observés sont issus de gamètes réduits et présentent donc la structure attendue ACRr (2n = 28). Cependant, l'observation de plantes à 2n = 37 (ACRrRr) et à 2n = 56 (AACCRrRr) indique que des gamètes non réduits peuvent être produits.

Tableau 1 : Structures génomiques possibles lors de croisements réciproques entre le colza et la ravenelle

	Femelle	Colza		Ravenelle	
Male		AC*	AACC*	Rr	RrRr
Colza	AC*	AACC* 2n=38	AAACCC* 2n=57	RrAC* 2n=28	RrRrAC* 2n=37
	AACC*	AAACCC* 2n=57	AAAACCCC* 2n=76	RrAACC* 2n=47	RrRrAACC* 2n=56
Ravenelle	Rr	ACRr* 2n=28	RrAACC* 2n=47	RrRr 2n=18	RrRrRr 2n=27
	RrRr	ACRrRr* 2n=37	AACCRrRr* 2n=56	RrRrRr 2n=27	RrRrRrRr 2n=36

En gras : structures déjà décrites

* : plantes portant le transgène si la plante-mère de colza est homozygote.

 Morphologie de type colza  Morphologie intermédiaire  Morphologie de type ravenelle

Pour trier l'ensemble de ce matériel, deux critères applicables à grande échelle peuvent être retenus : l'observation morphologique qui ne permet de distinguer que trois types (*Tableau 1*) : (1) les plantes de type colza ; seules les plantes présentant un génome haploïde de ravenelle ont une floraison plus longue et une fertilité réduite, (2) les plantes présentant une morphologie intermédiaire et (3) les plantes ne contenant que le génome ravenelle, la présence du transgène révélée par traitement herbicide ; les plantes sensibles sont celles ne présentant que le génome ravenelle, si le colza est homozygote pour le transgène. Parmi les candidats hybrides retenus sur les précédents critères, une analyse plus précise peut être réalisée par : un tri par cytométrie en flux pour évaluer, à un ou deux chromosomes près, le nombre de plantes dans chacune des 5 classes: 28 / 37-38 / 47 / 56-57 / 76, une analyse du comportement méiotique pour préciser les relations d'homologie entre les génomes présents, une étude par hybridation *in situ* génomique qui permet de colorer différemment le génome Rr par rapport aux génomes A et C, en s'affranchissant de la variabilité du pollinisateur.

Étude des descendance

Sous l'hypothèse d'hybrides mis en présence de ravenelles, une très grande diversité de structures de $2n=18$ à 56 peut être observée (*Tableau 2*). Les hybrides ACRr majoritaires forment principalement des gamètes non réduits (ACRr). S'ils sont mâles fertiles, ils doivent pouvoir produire des hybrides AACCRrRr tels que décrits à la génération précédente et maintiennent la possibilité de formation de gamètes ACRr aux générations ultérieures. En revanche, si un hybride ACRr est pollinisé ou pollinise de la ravenelle, la structure ACRrRr qui en résulte donnera des gamètes de $n = 9$ (Rr) à $n = 28$ (ACRr) si tous les chromosomes de colza sont conservés. La fréquence des gamètes présentant les différents nombre de chromosomes devrait suivre une loi binomiale.

Tableau 2 : Structures génomiques possibles des descendants d'hybrides interspécifiques mis en présence de ravenelle

	Femelle	Hybrides		Ravenelle	
Mâle		ACRr*	Rr +0 à 19AC*	Rr	RrRr
Hybrides	ACRr*	AACCRrRr* 2n=56	RrRrAC + 0 à 19AC* 2n=37 à 56	RrRrAC* 2n=37	RrRrRrAC* 2n=46
	Rr +0 à 19AC*	ACRrRr+0à19AC* 2n=37 à 56	RrRr+0à 38AC* 2n=18 à 56	RrRr+0 à 19AC* 2n=18 à 28	RrRrRr + 0 à 19AC* 2n=27 à 46
Ravenelle	Rr	ACRrRr* 2n=37	RrRr+0 à 19AC* 2n=18 à 28	RrRr 2n=18	RrRrRr 2n=27
	RrRr	ACRrRrRr* 2n=46	RrRrRr + 0 à 19AC* 2n=27 à 46	RrRrRr 2n=27	RrRrRrRr 2n=36

En gras : structures déjà décrites * : plantes portant le transgène.



Morphologie de type colza



Morphologie ravenelle

À l'exception des plantes AACCRrRr et de celles ne portant que le génome de ravenelle, une importante variabilité morphologique a été observée. Cependant, les plantes ayant 18 à 23 chromosomes et un cytoplasme de colza, en dépit d'une morphologie proche de celle de la ravenelle, sont facilement identifiables car elles présentent une déficience chlorophyllienne due à une incompatibilité noyau-cytoplasme. La présence du transgène ne permet d'éliminer que les plantes ne portant que le génome de ravenelle sans transgène introgressé.

La cytométrie en flux révèle la variabilité des structures produites qui peuvent être précisées par l'analyse du comportement méiotique. L'hybridation *in situ* reste pertinente pour différencier les chromosomes des deux espèces.

Discussion

Etant donné la diversité des situations agronomiques, la détection d'un flux de gènes nécessite (1) de pouvoir détecter à grande échelle un événement rare, celui de l'hybridation interspécifique, (2) d'être capable d'identifier des structures génomiques diversifiées dans les descendants au sein d'une population d'adventices, sachant que, dans tous les cas, le pollinisateur reste inconnu.

L'analyse des différents outils utilisés pour caractériser les hybrides indique que :

les observations morphologiques réalisables à grande échelle sont peu discriminantes pour repérer les événements d'hybridation ; il faudrait pouvoir disposer d'un caractère sous contrôle génétique simple (exemple : couleur des fleurs), homogène chez un seul des parents et dominant chez l'hybride or, chez les crucifères, aucun marqueur de ce type n'a jusqu'à présent été identifié ;

un transgène conférant la résistance à un herbicide permet un tri rapide des événements d'hybridation sur l'adventice et un suivi des plantes portant le transgène mais ne permet pas de distinguer ce matériel de la variété transgénique de colza d'origine ;

l'analyse par cytométrie en flux est pertinente sur un sous-échantillon de quelques milliers de plantes pour évaluer le nombre de chromosomes mais son imprécision à 1 ou 2 chromosomes (Eber *et al.*, 1997) près ne permet pas de distinguer des structures proches (ex : parmi les hybrides F1, $2n = 56$ ou 57 , $2n = 37$ ou 38 ou, parmi les descendants les plantes à $2n = 18$, 19 ou 20) ;

l'estimation du taux d'appariement entre chromosomes, par l'établissement du comportement méiotique, donne une information sur l'homologie des génomes en présence, cet appariement étant la condition d'un passage d'information génétique d'un génome dans l'autre ; cependant, elle n'est réalisable que sur un effectif restreint de plantes et les génomes en présence ne sont pas identifiables ;

l'hybridation *in situ* génomique permet d'avoir une vision globale en colorant les génomes de chaque espèce de manière différente ; cependant s'il est possible de distinguer les chromosomes Rr de ceux des génomes A et C, ces deux derniers ne sont pas différenciables. Cette méthode lourde et coûteuse ne peut être appliquée que sur un nombre très limité de plantes ;

l'utilisation de marqueurs moléculaires peut permettre, selon les méthodes utilisées, d'étudier un grand nombre de gènes mais elle nécessite d'avoir fait une analyse exhaustive de la variabilité présente au sein de chaque espèce parentale afin d'identifier des marqueurs spécifiques d'espèce permettant de s'affranchir de la variabilité intraspécifique et de suivre les flux. Par ailleurs, les marqueurs ne permettent de tester que quelques points du génome dont la répartition n'est généralement pas connue.

L'ensemble de ces résultats indique que seule une combinaison de différentes méthodes, souvent lourdes et coûteuses, peut permettre de repérer et de caractériser les différents hybrides susceptibles d'apparaître en conditions naturelles.

Des approches complémentaires restent à développer pour poursuivre la caractérisation :

l'étude de la valeur adaptative des différents hybrides afin de préciser les probabilités de survie des différentes structures,

le développement de modèles pour identifier les structures attendues les plus probables dans les différentes situations,

l'amélioration des outils moléculaires ; la mise au point de marqueurs PCR, spécifiques d'espèce, bien répartis sur les génomes, permettrait d'analyser un grand nombre de plantes se développant dans des situations très contrastées vis-à-vis de la culture du colza.

Etant donné les fréquences d'hybridation mises en évidence et la diversité des structures observées, la question ayant trait à nos possibilités de réaliser un suivi en conditions naturelles reste ouverte.

REFERENCES

Baranger A., Chèvre A.M., Eber F., Renard M., 1995. Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species: an assessment of transgene dispersal. *Theor. appl. Gen.*, 91, 956-963.

Chèvre A.M., Eber F., Baranger A., Renard M., 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 389, 924.

Chèvre A.M., Eber F., Darmency H., Fleury A., Picault H., Letanneur J.C., Renard M., 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under agronomic conditions. *Theor. appl. Gen.*, 100, 1233-1239.

- Darmency H., Lefol E., Fleury A., 1998. Spontaneous hybridizations between oilseed rape and wild radish. *Mol. Ecol.*, 7, 1467-1473.
- Eber F., Letanneur J.C., Chèvre A.M., 1997. Chromosome number of oilseed rape (*Brassica napus*) - wild radish (*Raphanus raphanistrum*) spontaneous hybrids and of their progeny estimated by flow cytometry. *Cruciferae Newsletter*, 19, 17-18.
- Kerlan M.C., Chèvre A.M., Eber F., 1993. Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus*) and related species: cytological characterization and detection of the transgene. *Genome*, 36, 1099-1106.
- Rieger M.A., Potter T.D., Preston C., Powles S.B., 2001. Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor. appl. Gen.*, 103, 555-560.