

ÉTUDE DES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES ENTRE COLZA ET RAVENELLE : IMPLANTATION ET REPRODUCTION

INTERSPECIFIC HYBRIDS BETWEEN RAPESEED AND WILD RADISH: SETTING UP AND REPRODUCTION

G. GUERITAINE & H. DARMENCY

INRA, Unité de Malherbologie et Agronomie, BP 86510, 21065 Dijon cedex

A.M. CHEVRE

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

RESUME

En Europe, la commercialisation à grande échelle des premières variétés transgéniques soulève encore une série de questions, concernant notamment la possibilité de fuite des transgènes via les espèces sauvages apparentées. La formation d'hybrides spontanés entre du colza transgénique (*Brassica napus*, AACC, $2n = 38$) et de la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, $2n = 18$) a déjà été mise en évidence. Le succès et la persistance des gènes des cultivars dans les populations sauvages dépendent alors de la valeur adaptative de ces hybrides interspécifiques et de leur descendants. Notre travail s'est intéressé, dans un premier temps, à différents traits d'histoire de vie juvéniles d'hybrides interspécifiques F1 entre ces deux espèces. Nos résultats montrent que ces plantes ont peu de chance d'arriver au stade

de reproduction dans les conditions des champs et de leurs bordures. Néanmoins, ces hybrides sont capables de produire des descendants de plus en plus proches de l'espèce sauvage parente, au fur et à mesure des générations successives. Notre travail s'est donc attaché, dans un deuxième temps, à l'étude de différentes composantes de la fitness de générations avancées de rétrocroisements, depuis la levée des plantules jusqu'à la production de semences, sous différentes conditions de croissance. Même si leur fitness reste encore, pour certaines, moitié plus faible que celle de plantes "normales" à cause de chromosomes surnuméraires hérités du colza, il est apparu que ces descendants d'hybrides étaient tout à fait viables et productifs. Ils permettent donc le maintien du transgène dans l'agrosystème.

SUMMARY

The process of introgression between a transgenic crop modified for better agronomic characters and a wild relative could potentially lead to increased weediness and adaptation to the environment of the wild species. However,

the formation of hybrid and hybrid progeny could be associated with functional imbalance and low fitness, which reduces the risk of gene escape and establishment of the wild species in the field. Risk assessment studies of

transgenic crops have recently brought evidence of a low spontaneous hybridization frequency of Brassica napus with Raphanus raphanistrum. The fate of the first generation hybrids is crucial to determine the initial rate of spread of transgenes. In the first part of our work, we compare the fitness components of parents and F1 hybrids at the first step of the life cycle. The F1 hybrids show a lower seedling emergence, a significant delay of emergence, and a lower survival than for both parents. Rosette diameter and dry matter of hybrid plants are reduced relative to those of both parents, especially when they grow in the field and under competition conditions. Experiment in controlled growth conditions are unable to predict the differences observed in

the field. In the second part of our work, we compare the fitness components of parents and different types of backcross in the sixth generation of hybrids. The backcross with oilseed rape cytoplasm has a fitness value 100 times lower than that of the backcross with wild radish cytoplasm. The herbicide resistant BC6 has similar growth as the susceptible counterpart, but final male and female fitness values are two times lower. In turn, susceptible BC6 exhibit similar fitness as the control wild radishes. The consequence on fitness of the chromosome location of the transgene conferring resistance and the relevance of these results to the impact of gene flow on the environment are discussed.

INTRODUCTION

Les premières phases de mise sur le marché des colzas transgéniques en Europe sont en cours d'instruction. On s'accorde actuellement à mettre en place une meilleure définition du cahier des charges du Génie Génétique, de la sélection variétale et de l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) afin de leur assurer une efficacité maximale sans effets secondaires nuisibles. En effet, si les bénéfices liés à ces cultures transgéniques sont facilement envisageables, il reste de nombreuses incertitudes quant aux conséquences éventuelles à moyen et long terme, notamment, quant à la possibilité de fuite des transgènes *via* le compartiment sauvage. L'existence d'hybrides entre espèces cultivées et espèces sauvages est un phénomène dont les modalités sont encore peu connues et dont les conséquences n'ont pas encore été étudiées, en particulier l'apparition d'adventices plus difficiles à éliminer.

Dans le cas du colza (*Brassica napus*, AACC, $2n=38$), des croisements interspécifiques spontanés ont déjà été décrits avec plusieurs espèces apparentées (Boucherie, 1998). Parmi ceux étudiés en France, c'est avec la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, $2n=18$) que les risques semblent être les plus forts en raison de fréquences d'appariement chromosomique plus élevées (Kerlan *et al.*, 1993). Grâce à des dispositifs expérimentaux en rangs alternés et en utilisant des colzas mâles stériles, il est assez facile de produire un grand nombre d'hybrides interspécifiques chez le colza mâle stérile (Baranger *et al.*, 1995). Dans des conditions agronomiques normales, la quantité d'hybrides interspécifiques entre ces deux espèces est très faible, tout particulièrement chez la ravenelle (Darmency *et al.*, 1998 ; Chèvre *et al.* 2000). Le taux d'hybrides peut néanmoins être très différent selon la variété de colza utilisée (Baranger *et al.*, 1995). De même, nous avons montré que les barrières à l'hybridation interspécifique étaient plus ou moins fortes selon les individus à l'intérieur des populations sauvages, donc probablement entre populations. Pour 40 % des individus de la population étudiée, le pollen de colza ne germe pas sur les pistils de ravenelle. Pour 23 % de la population, le pollen de colza développe des tubes polliniques en grande quantité, mais très peu fécondent les ovules de ravenelle. Les 37 % restants montrent une grande quantité de tubes polliniques entrant dans le style et un taux de fécondation des ovules important (Guéritaine *et al.*, 2001).

Même si la probabilité d'apparition des hybrides est faible, elle demeure cependant inévitable à l'échelle du pays. Très peu d'études se sont intéressées à la persistance du transgène dans les populations sauvages après l'hybridation. En effet, une fois le transgène ainsi échappé, la probabilité, l'importance et la dangerosité du flux de gènes qui en découle, dépendent en grande partie de la valeur adaptative des individus dans lesquels il se trouve. Cette valeur est liée au coût du transgène lui-même, mais aussi à la capacité relative des individus hybrides à survivre et se reproduire par rapport à leurs parents.

Fitness des F1

Les hybrides interspécifiques F1 triploïdes (ACRr ; 28 chromosomes) produits par des colzas mâles stériles peuvent être des plantes vigoureuses, mais leur fertilité est faible et aucune évaluation de leur fitness n'a réellement été établie dans des conditions agronomiques. Une étude a donc été mise en

place avec pour objectif de comparer différents composants de la fitness d'hybrides interspécifiques F1 entre du colza mâle stérile Ogu-INRA de différentes variétés et de la ravenelle. De récents modèles suggèrent que les traits d'histoire de vie juvéniles de ces plantes pourraient être ce qu'il y a de plus déterminant dans la persistance potentielle des transgènes. Nous avons donc choisi d'examiner les tout premiers stades de développement de ces plantes, à savoir leur aptitude à lever, survivre et se développer en plantes adultes en conditions agronomiques, dans un champ de colza et sa bordure immédiate. Dans l'ensemble, il ressort de cette étude que, quelles que soient les conditions de croissance, en compétition ou non, le statut "hybride" affecte tous les caractères mesurés.

La fitness des hybrides F1 est considérablement réduite par rapport aux deux parents. Ils montrent des taux de levée très faible (17 % de celui des parents), un délai à la levée, ainsi qu'une mortalité deux fois plus importante que celle des deux parents. Ceci peut être expliqué par le fait qu'ils sont issus de petites graines d'un diamètre inférieur à 1.6 mm alors que colza et ravenelles ont en général des semences d'un diamètre supérieur à 2 mm (Baranger *et al.*, 1995). De ce fait, leur capacité germinative est réduite, mais également leur réserve pour développer une plantule. Ces résultats impliquent que les semences hybrides ont 6 fois moins de chance que les semences des espèces parentes de donner lieu à une plantule qui réussit à s'installer dans les agrosystèmes. De plus, on observe au cours du développement ultérieur des caractéristiques morphologiques (hauteur, largeur, poids sec) très réduites par rapport à celles des deux parents. Ceci laisse peu de chance à ces plantes d'arriver au stade de reproduction et constitue donc une barrière supplémentaire pour la propagation du transgène.

Fitness des descendants

La phase de reproduction n'a pas encore été étudiée car le matériel hybride disponible actuellement en quantité suffisante a hérité de la stérilité mâle du colza parent, ce qui interfère avec les désordres de la fertilité attendus de l'hybridation interspécifique proprement dite. Néanmoins, ces hybrides sont capables de produire des générations successives. À partir d'hybrides F1 sur différentes variétés de colza mâle-stérile Ogu-INRA résistant au glufosinate-ammonium (gène *bar*), tout au long des générations de rétrocroisements avec l'espèce sauvage, il a été observé une augmentation de la fertilité femelle et mâle due à l'apport de gènes de restauration de la fertilité par la ravenelle. Les hybrides F1 produisent, en moyenne : 1,1 graine par plante en BC¹, 11,9 graines par plante en BC2 et 229,3 graines par plante en BC3 (Chèvre *et al.*, 1999). De plus, on observe une diminution du taux de transmission du transgène (10 % de résistance à la cinquième génération) et une diminution du nombre de chromosomes (91 % des hybrides résistants ont moins de 23 chromosomes à cette même génération). Les descendants des hybrides interspécifiques étant de plus en plus proches de l'espèce sauvage parente, au fur et à mesure des générations successives, il a semblé opportun d'étudier la valeur sélective de ces plantes qui pourraient représenter un risque agronomique. Des croisements manuels entre des ravenelles et des plantes résistantes de la cinquième génération de rétrocroisement ont permis d'obtenir des descendants de sixième génération possédant soit le cytoplasme du colza Ogu-INRA, soit le cytoplasme de la ravenelle. À partir de ce matériel végétal, une étude a été mise en place afin de comparer les différentes composantes de la fitness sous deux conditions de croissance : dans un champ de colza et dans sa bordure immédiate. Nous avons étudié cette génération depuis la levée jusqu'à la production de semences.

Aucune différence n'est observée entre les plantes BC6 à cytoplasme ravenelle et les ravenelles témoins. Au contraire, le nombre de plantes BC6 à cytoplasme colza atteignant l'âge adulte est 6 fois moins important et leur biomasse 34 fois plus petite que ceux de plantes ayant un cytoplasme ravenelle. Le nombre de graines produites pour une graine semée est 100 fois plus petit chez les descendants à cytoplasme colza que chez ceux à cytoplasme ravenelle. Ceci est principalement dû à une forte déficience chlorophyllienne des plantes qui a déjà été observée à partir de la seconde génération de rétrocroisement. La déficience est expliquée par l'existence d'une incompatibilité entre le noyau de la ravenelle et le cytoplasme du colza (Pelletier *et al.*, 1983). Ces résultats impliquent que les descendants de sixième génération à cytoplasme colza ont moins de chance de s'établir en conditions agronomiques ou naturelles que leurs homologues réciproques. Cependant, malgré leur faible fitness, ils ne doivent pas être ignorés, car la littérature montre que ce sont ces hybrides qui ont le plus de chance de se produire en conditions naturelles. Par exemple, un hectare d'une variété composite (qui se compose de 80 % de plantes mâle stériles) ne produit pas plus d'une vingtaine d'hybrides dans des conditions d'infestation faible de ravenelles. Mais un seul pied de colza mâle stérile poussant à cinq mètres du même champ (c'est-à-dire une repousse dans la bordure) produit de

¹ BC : Back Cross (rétrocroisement)

1 à 6 hybrides ! (Chèvre *et al.*, 2000). Les descendants de ces hybrides peuvent, après récupération de gènes de restauration de fertilité, servir de pont pour le passage du transgène dans des plantes de ravenelles.

Parmi toutes les plantes testées, 9.8 % sont résistantes au glufosinate, ce qui est similaire à la génération précédente (Chèvre *et al.*, 1999). Les mesures de cytométrie de flux montrent que ces plantes résistantes ont en moyenne un chromosome de plus que les sensibles. Aucune plante contenant le transgène ne présente le même nombre de chromosomes que la ravenelle ($2n = 18$). Il est donc probable qu'il n'y ait pas eu introgression et que le transgène *bar* soit toujours porté par un chromosome surnuméraire de colza. Ce chromosome, marqué par la présence du gène *bar*, n'a que peu d'effet sur les caractéristiques morphologiques, mais il cause d'importants effets sur la reproduction. Il entraîne une réduction de la capacité des plantes à fleurir, une floraison plus tardive, une réduction de fertilité mâle de 10 % et une réduction de fertilité femelle de 50 %. Nos résultats sur la fitness des individus résistants/sensibles impliquent donc qu'en absence de pression de sélection par l'application de l'herbicide glufosinate, la fréquence de la résistance est amenée à diminuer. Cependant, dans notre étude, une graine résistante de BC6 à cytoplasme ravenelle pourra tout de même produire 23 graines résistantes dans le colza, et 142 dans sa bordure. Si on applique alors une pression de sélection continue avec l'herbicide, une telle production de graines mènera rapidement à l'infestation des champs par de la ravenelle résistante.

PERSPECTIVES

En conclusion, il apparaît que le transfert de gènes du colza vers la ravenelle est assez difficile. Le gène étudié, *bar*, n'a pas été introgressé dans l'espèce sauvage. Cependant, au fil des générations, il est apparu des descendants très proches des ravenelles, tout à fait viables et productifs, même si leur fitness reste plus faible que celle de plantes normales. Le maillon le plus faible de la chaîne d'événements conduisant à ces descendants sauvages transgéniques est l'hybride. S'il arrive à s'implanter dans un milieu sans compétition, il pourra donner des graines et être à l'origine de descendances portant le transgène. Reste à obtenir des hybrides en quantité suffisante sans faire intervenir un parent mâle stérile afin d'estimer leur reproduction réelle.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- Boucherie R., 1998. *Évaluation du risque de pollution par croisement interspécifique en production de colza semences*. Document ANAMSO, 28 p.
- Chèvre A.M., Eber F., Renard M., Darmency H., 1999. Gene flow from oilseed rape to weeds. Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops. Proc. of a symposium held at Keele, UK on 12-14 April 1999. British Crop Protection Council, Farnham, UK. 72, 125-130.
- 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.
- Guéritaine G., Darmency H., 2001. Polymorphism for interspecific hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and a population of wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Sex. Plant Reprod.*, 14, 169-172.
- 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.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chétrit P., Rémy R., Rousselle P., Renard M., 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, 191, 244-250.