

Transgénèse des plantes et estimation des risques

Impact de la transformation génétique du colza

Anne-Marie Chèvre, Frédérique Eber, Alain Baranger,
Patrick Vallée, Jacqueline Pierre, Michel Renard

La transgénèse est une méthode permettant d'élargir la variabilité présente au sein d'une espèce. Elle offre donc des possibilités d'amélioration génétique et de diversification. Cette méthode débouchant sur l'obtention de lignées transgéniques, isogéniques du matériel de départ, il est possible d'évaluer précisément l'impact potentiel des nouveaux gènes introduits sur la qualité alimentaire et l'environnement. Pour ce dernier, il doit être tenu compte de la biologie de l'espèce transformée, c'est-à-dire de ses aptitudes à la dissémination par le pollen ou les graines, et du caractère conféré par le transgène introduit. Le colza a fait partie des premières espèces de grande culture pour lesquelles la transgénèse a permis des améliorations génétiques telles que la mise au point d'un système d'hybridation (système Seedlink® de Plant Genetic Systems, PGS, Gent, Belgique), la résistance aux parasites, la tolérance à certains herbicides (glyphosate, glufosinate, oxynils) ainsi que la qualité de la graine (composition en acides gras d'huiles de colza à usages alimentaires ou non alimentaires, protéines de réserve du tourteau, peptides d'intérêt pharmaceutique) [1]. Ces travaux ont abouti aux premières commercialisations en Amérique du Nord en 1995. La production aux États-

Unis de colza riche en acide laurique a débuté en 1997. Les surfaces en colzas tolérants aux herbicides cultivées au Canada en 1997 ont été de plus de 700 000 hectares. En revanche, les premières mises sur le marché en Europe sont en cours d'instruction. La société Plant Genetic Systems a obtenu une autorisation partielle pour un colza hybride résistant au glufosinate. Dès l'obtention des premières lignées transgéniques de colza, des études portant sur l'impact environnemental ont été engagées. En effet cette espèce, partiellement allogame, présente une dissémination de son pollen par le vent et les insectes. Du fait du caractère mellifère du colza, l'étude de l'impact de différents transgènes sur la faune a été réalisée sur le modèle abeille [2]. Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux risques de flux de gènes et plus particulièrement aux aspects concernant, d'une part, la dispersion du pollen au sein de l'espèce et, d'autre part, l'introgession de transgènes dans le génome d'espèces adventices par hybridation interspécifique.

Dispersion du pollen

Le colza est une plante hermaphrodite dont le système de reproduction est mixte (20 à 30 % de fécondation croisée). De par sa forme, sa densité et son caractère collant, le pollen de colza est peu susceptible d'être transporté par le vent sur de longues distances. Cependant, des piégeages utilisant différents types de capteurs placés à quelques mètres de hauteur permettent de retrouver du pollen parfois viable jusqu'à au moins 1,5 km de distance de la source de pollen [3]. Il semble possible que le pollen

desséché de colza puisse être ainsi transporté par le vent sur de grandes distances quand les conditions climatiques sont favorables. Le colza très attractif est fréquenté par de nombreuses espèces d'insectes pollinisateurs appartenant à des ordres différents. Les inventaires pratiqués dans différentes conditions signalent principalement la présence d'hyménoptères, de diptères et plus rarement de lépidoptères. Les hyménoptères sont de très loin les plus représentés et plus particulièrement les abeilles domestiques qui constituent de 53 à 95 % des insectes pollinisateurs totaux. Ces insectes jouent un rôle important dans le transport du pollen de colza même si leur capacité à disséminer le pollen sur plusieurs kilomètres reste à établir.

L'action de ces différents vecteurs sur la dispersion du pollen de colza a été estimée à partir de dispositifs discontinus (parcelles pièges situées à différentes distances de la parcelle source) ou continus (parcelle piège entourant la parcelle source). Dans un dispositif discontinu constitué d'une parcelle source de 20 x 20 m située à 200 m ou 400 m de parcelles pièges de même surface, le taux de fécondation croisé a été estimé à 0,0156 % à 200 m et à 0,0038 % à 400 m [4]. Dans un dispositif continu circulaire, le taux de fécondation croisée a été évalué à 0,00033 % à 47 m de distance [5]. Afin de préciser la courbe de dispersion du pollen de colza, nous avons mis en place différents dispositifs :

- un dispositif circulaire composé d'une parcelle source de 3 ou 9 m de diamètre de colza résistant au glufosinate entourée d'une parcelle piège de colza mâle-fertile ou mâle-stérile sensible au glufosinate d'environ 100 m de diamètre ;

A.-M. Chèvre, F. Eber, A. Baranger, P. Vallée, M. Renard : INRA, Station d'amélioration des plantes, BP 29, 35653 Le Rheu, France. J. Pierre : INRA, Laboratoire de zoologie, BP 29, 35653 Le Rheu, France.

Tirés à part : A.-M. Chèvre

Transgénèse et estimation des risques

– un dispositif carré comprenant une parcelle source de colza résistant aux oxynils de 10 m de côté entourée d'une parcelle piège de colza sensible aux oxynils de 90 m de côté, des plantes mâles stériles étant disposés selon un maillage de 3 m de côté.

La distance de dispersion du pollen a été mesurée en estimant, parmi les plantes issues des graines récoltées à différentes distances de la parcelle centrale sur les colzas fertiles et mâles stériles, le nombre de plantes résistantes à l'herbicide.

Les résultats indiquent qu'environ la moitié du pollen produit par une plante individuelle est dispersée dans les trois premiers mètres et que la probabilité de pollinisation décroît rapidement en fonction de la distance. La comparaison avec la dispersion mesurée sur l'ensemble de la parcelle montre que celle-ci sous-estime la dispersion sur les distances moyennes et longues. Il apparaît clairement qu'il n'y a pas de discontinuité dans la dispersion du pollen de colza. Dans ces conditions, il n'y a pas de limite au-delà de laquelle on peut espérer obtenir un isolement complet de toute source de pollen de colza [6].

Flux de gènes entre crucifères

Au départ, les travaux d'hybridation interspécifique ont été développés par les sélectionneurs de colza pour tenter d'augmenter la variabilité du colza lorsque certains caractères agronomiques étaient absents de l'espèce (gènes de résistance aux maladies, restauration de la fertilité mâle, etc.). En revanche, aucune étude sur les flux spontanés de gènes entre le colza et les crucifères adventices endémiques n'avait jusqu'alors été réalisée du fait que :

- ces espèces présentent des structures génomiques distinctes : le colza (*Brassica napus*, AACCC, $2n = 38$) est un amphidiploïde issu de l'hybridation spontanée entre le chou (*B. oleracea*, CC, $2n = 18$) et la navette (*B. rapa* syn : *B. campestris*, AA, $2n = 20$) alors que les espèces adventices sont diploïdes, leur nombre chromosomique variant de $2n = 14$ à $2n = 24$;
- les hybrides interspécifiques triploïdes (ACX, X étant le génome haploïde de l'adventice) sont généralement très stériles, à moins que l'espèce diploïde ne soit l'un des progéniteurs du colza. En effet, il a été montré qu'il est possible en deux générations d'obtenir des introgressions de colza dans le génome de navette adventice [7], cette dernière espèce étant fréquente au Danemark mais rare en France.

Tableau 1

Nombre d'hybrides interspécifiques de colza pour 100 fleurs, produits soit par croisement manuel suivi de sauvetage d'embryons (A) à partir de la variété Westar transgénique, soit en conditions naturelles en utilisant la variété de colza Brutor mâle stérile comme parent femelle (B)

Croisements	A	B
<i>B. napus</i> x <i>B. oleracea</i>	20,1	–
<i>B. oleracea</i> x <i>B. napus</i>	1,1	–
<i>B. napus</i> x <i>H. incana</i>	11,6	1,9
<i>H. incana</i> x <i>B. napus</i>	2,5	–
<i>B. napus</i> x <i>B. nigra</i>	4,2	–
<i>B. nigra</i> x <i>B. napus</i>	0,0	–
<i>B. napus</i> x <i>Sinapis arvensis</i>	3,7	0,2
<i>Sinapis arvensis</i> x <i>B. napus</i>	0,0	–
<i>B. napus</i> x <i>Raphanus raphanistrum</i>	1,2	2,8-23,8
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>B. napus</i>	2,8	–

Number of interspecific hybrids of oilseed rapes per 100 flowers, obtained either after hand pollination followed by embryo rescue using the transgenic Westar variety (A) or under natural conditions using the male sterile Brutor variety as female parent (B)

Tableau 2

Analyse du nombre moyen de chromosomes appariés par cellule dans les hybrides interspécifiques triploïdes de colza issus de croisement manuel avec la variété Westar transgénique suivi de sauvetage d'embryons (A) ou en conditions naturelles en utilisant la variété de colza Brutor mâle stérile comme parent femelle (B)

Hybrides F1	Génomes	2n	A	B
<i>B. napus</i> - <i>B. oleracea</i>	ACC	28	18,1	–
<i>B. napus</i> - <i>H. incana</i>	ACAAd	26	7,7	13,0-6,7
<i>B. napus</i> - <i>B. nigra</i>	ACB	27	12,4	–
<i>B. napus</i> - <i>S. arvensis</i>	ACSar	28	11,5	19,1
<i>B. napus</i> - <i>R. raphanistrum</i>	ACRr	28	13,0	15,3
<i>B. napus</i> haploïdes	AC	19	7,4	12,6

Average number of paired chromosomes per cell in F1 interspecific hybrids of oilseed rapes obtained either after hand pollination followed by embryo rescue using the transgenic Westar variety (A) or under natural conditions using the male sterile Brutor variety as female parent (B)

L'absence d'informations scientifiques sur les flux de transgènes du colza vers ses adventices nous a conduit à mettre en place des expérimentations pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- la production d'hybrides interspécifiques est-elle possible ?
- des échanges entre les génomes en présence peuvent-ils se produire sachant qu'ils conditionnent la possibilité d'intégration stable du transgène dans le génome de l'adventice ?

– ces hybrides peuvent-ils produire une descendance dans laquelle le transgène est transmis et s'exprime après pollinisation par l'espèce diploïde ?

– est-il possible de produire des plantes ayant introgressé le transgène présent à l'origine dans le colza et ayant la même structure génomique, la même compétitivité que l'adventice ?

Les méthodologies choisies pour tenter d'apporter des réponses à ces questions ont

Tableau 3

Nombre de graines pour 100 fleurs obtenues à partir d'hybrides interspécifiques de colza soit après croisement manuel avec le parent sauvage diploïde et sauvetage d'embryons (A) soit en conditions naturelles en présence de l'espèce adventice diploïde (B)

Hybrides d'origine	A	B
<i>B. napus</i> - <i>B. oleracea</i>	0,8	-
<i>B. oleracea</i> - <i>B. napus</i>	0,3	-
<i>B. napus</i> - <i>H. incana</i>	0,3	0,2-0,3
<i>H. incana</i> - <i>B. napus</i>	0,0	-
<i>B. napus</i> - <i>B. nigra</i>	0,3	-
<i>B. napus</i> - <i>S. arvensis</i>	0,5	0,1
<i>B. napus</i> - <i>R. raphanistrum</i>	0,6	0,1-1,7
<i>R. raphanistrum</i> - <i>B. napus</i>	0,6	-

Seed number per 100 flowers obtained from F1 interspecific hybrids of oilseed rape either after hand pollination with the diploid wild species followed by embryo rescue (A), or under natural conditions using the diploid wild species as pollinator (B)

consisté à faire d'abord les croisements interspécifiques en serre puis au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique (c'est-à-dire en l'absence de pollen de colza en utilisant des plantes mâle-stériles) puis en situation agronomique normale.

Première étape

Dans un premier temps, l'étude a été réalisée en conditions contrôlées, par croisements manuels réciproques et sauvetage *in vitro* d'embryons.

La variété de colza transgénique utilisée a été produite par PGS. C'est une variété canadienne de printemps, Westar, contenant une copie à l'état homozygote du gène *bar* qui confère la résistance au glufosinate (nom commercial Basta®). Les espèces adventices étudiées ont été choisies sur la base des connaissances acquises sur leur proximité phylogénétique relative avec le colza et sur celle de leur importance en tant que mauvaises herbes dans les cultures :

- le chou (*B. oleracea*, CC, 2n = 18), une des espèces parentales du colza ;
- la moutarde des champs ou sanve (*Sinapis arvensis*, SarSar, 2n = 18) ;
- la ravenelle (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, 2n = 18) ;
- la moutarde noire (*B. nigra*, BB, 2n = 16) ;
- la roquette bâtarde (*B. adpressa*, syn : *Hirschfeldia incana* AdAd, 2n = 14).

Des hybrides interspécifiques ont été produits pour toutes les combinaisons étudiées [8] (tableau 1). Un plus grand nombre d'hybrides a cependant été obtenu en uti-

lisant le colza comme parent femelle, à l'exception de ceux impliquant la ravenelle. Aucun hybride ne s'est développé lorsque la moutarde noire ou la moutarde des champs était utilisée comme parent femelle.

Lorsque le gène *bar* est présent, il est exprimé, conférant ainsi aux hybrides interspécifiques la résistance au Basta®. Les hybrides ont généralement la structure génomique attendue (ACX), c'est-à-dire la combinaison des génomes haploïdes du colza (AC) et de l'espèce sauvage (X). Cependant, parmi les hybrides colza-chou, colza-moutarde des champs et colza-ravenelle, des amphidiploïdes (AACCXX) ont été observés lesquels présentent une méiose presque régulière. L'analyse du comportement méiotique des hybrides triploïdes (ACX), comparé à celui d'haploïdes (AC) issus des colzas ayant permis de les produire, révèle que les pourcentages d'appariement varient en fonction du génome X [9] (tableau 2). Ce sont les hybrides avec le chou, la ravenelle, la moutarde noire et la moutarde des champs qui présentent le plus fort taux d'appariement chromosomique, lequel permet des échanges intergénomiques. Les hybrides avec la roquette bâtarde présentent pour certains d'entre eux une inhibition de l'appariement chromosomique homéologue. Aucun effet cytoplasmique sur le taux d'appariement des chromosomes n'a été observé. La fertilité pollinique des hybrides varie de 0 à 30 %.

Les hybrides F1 interspécifiques étant peu fertiles, la production de graines est faible après croisements manuels et sauvetage d'embryons (tableau 3).

Deuxième étape

° Dans un deuxième temps, les résultats présentés ci-dessus nous ont conduits à réaliser des essais au champ en conditions favorables à l'hybridation interspécifique, c'est-à-dire en conditions d'isolement et en utilisant comme parent femelle des colzas mâles stériles (stérilité cytoplasmique *Ogu*-INRA). Deux facteurs ont été étudiés : l'espèce adventice et le génotype du colza.

Comparaison de différentes adventices

Les adventices étudiées sont parmi les plus fréquentes dans les conditions françaises de culture, à savoir la ravenelle, la roquette bâtarde et la moutarde des champs. Pour chacune de ces espèces, un isolement a été mis en place selon un dispositif en bandes alternées avec du colza de printemps mâle stérile et non transgénique, variété Brutor, selon un ratio 1/1. La production d'hybrides interspécifiques identifiés parmi les graines présentant un diamètre inférieur à 1,6 mm est présentée tableau 1 [10, 11].

Les hybrides interspécifiques produits sont vigoureux et ont une morphologie proche de celle du colza. L'observation du comportement méiotique (tableau 2) et des fertilités mâle et femelle a confirmé les premières observations réalisées en serre. Les hybrides F1 interspécifiques ont ensuite été cultivés en présence de l'espèce adventice selon un dispositif équivalent à celui utilisé pour produire la première génération. La production de graines supposées issues de rétrocroisement par l'espèce adventice (BC1) est faible [10, 11] (tableau 3).

Ces études ont permis d'identifier la ravenelle comme étant l'espèce sauvage, parmi celles analysées, présentant la plus forte aptitude à l'hybridation avec le colza et une fréquence élevée d'appariements chromosomiques intergénomiques [10, 11]. Cette espèce est de plus l'une des principales adventices du colza en France. Pour la poursuite de l'étude, le modèle colza-ravenelle a donc été retenu.

Effet du génotype de colza sur la production d'hybrides interspécifiques avec la ravenelle

Les colzas mâles stériles ont été cultivés en parcelles de trois lignes de 2 mètres alternées avec des parcelles de même taille de ravenelles sui-

Transgénèse et estimation des risques

Tableau 4

Génération successive de colza analysées au champ

Génération	Parent femelle		Parent mâle
G0	Colza mâle stérile AACC, 2n = 38 ↓	/	Ravenelle RrRr, 2n = 18
G1	Hybrides F1 interspécifiques ↓	/	Ravenelle
G2	Hybrides « BC1 » ↓	/	Ravenelle
G3	Hybrides « BC2 » ↓	/	Ravenelle
G4	Hybrides « BC3 »	/	Ravenelle

Successive generations of oilseed rapeseed analyzed under field conditions

vant un dispositif de 5 blocs complets randomisés. À chaque génération étudiée (tableau 4), les hybrides obtenus ont été cultivés en présence de ravenelles selon le même dispositif. Nous avons pu noter [12, 13] que :

– les 10 génotypes de colza analysés, dont 5 hybrides produits à partir de la variété Westar de colza contenant le gène *bar* de résistance au Basta®, présentent des aptitudes à l'hybridation interspécifique significativement différentes ; il est important de noter que la période de floraison de la ravenelle coïncide avec celle du colza et que les variétés de colza d'hiver, principalement cultivées en France sous forme de lignées ou d'hybrides, présentent la plus forte aptitude à l'hybridation interspécifique (26,4 à 100,4 graines/100 fleurs et 202,1 à 1 213,3 graines/plante en moyenne en fonction des génotypes sur 2 années d'expérimentation) ; les résultats obtenus à partir des

variétés étudiées sur l'ensemble des quatre générations sont présentés figure 1 ;

– les hybrides F1 interspécifiques de la génération G1 sont vigoureux, ont toujours une morphologie proche de celle du colza et sont résistants au Basta® lorsque le transgène est présent. Ce dernier a une transmission mendélienne, les plantes mères de colza étant hémizygotes (figure 1). Les hybrides interspécifiques ont généralement la structure génomique attendue (ACRr, 2n = 28) (figure 2), à l'exception des quelques amphidiploïdes (AACCRrRr, 2n = 56), et leur fertilité est fortement réduite (figure 1) ;

– les hybrides « BC1 » (génération G2), issus des graines récoltées sur des hybrides F1, sont généralement résistants au Basta® lorsque la plante-mère est résistante (figure 1) ; la plupart d'entre eux ont une morphologie proche de celle de la ravenelle ; ils ont des structures

génomiques très distinctes : soit identiques à celle de la plante-mère (ACRr, 2n = 28), soit de type BC1 (ACRrRr, 2n = 37), soit de type amphidiploïde (AACCRrRr, 2n = 56), soit à nombre chromosomique intermédiaire (figure 2) ; la fertilité femelle est meilleure qu'à la génération précédente (figure 1) ; les plantes ayant le plus faible nombre de chromosomes présentent la meilleure fertilité femelle ;

– au cours des deux générations suivantes (G3 et G4), les plantes présentent une morphologie de type ravenelle ; le taux de transmission du transgène diminue (figure 1) ainsi que le nombre de chromosomes (figure 2). À la quatrième génération, 25,4 % des plantes présentent entre 18 et 20 chromosomes ; une importante déficience chlorophyllienne est notée. En revanche, la fertilité femelle augmente (figure 1). Cependant, aucune plante à 18 chromosomes, comme la ravenelle, et tolérante au Basta® n'a été observée jusqu'à présent.

Troisième étape

Dans un troisième temps, des essais de colza ont été réalisés en conditions agronomiques normales en association avec la ravenelle. Un essai a été mis en place dans le cadre du projet inter-instituts en 1996 afin de déterminer quel peut être le taux d'hybrides interspécifiques en conditions de compétition pollinique. Un champ de 1 ha de la variété Synergy (80 % d'hybrides F1 mâles stériles, hémizygotes pour le gène *pat* conférant la résistance au Basta® + 20 % d'une lignée mâle fertile contenant deux copies à l'état homozygote du transgène) a été implanté à Rennes et à Dijon. Selon un dispositif défini par Darmency (Malherbologie, INRA Dijon), des ravenelles ont été repiquées soit en tant que plantes isolées, soit en peuplement plus ou moins dense, en bordure et en milieu de champ. Les notations ont permis d'observer une bonne synchronisation des floraisons du colza et de la ravenelle. La caractérisation d'hybrides interspécifiques parmi les graines récoltées sur les ravenelles et le colza est en cours.

Stratégies pour tenter de limiter les flux de gènes

Plusieurs stratégies sont à l'étude afin de diminuer les risques de dissémination de transgènes :

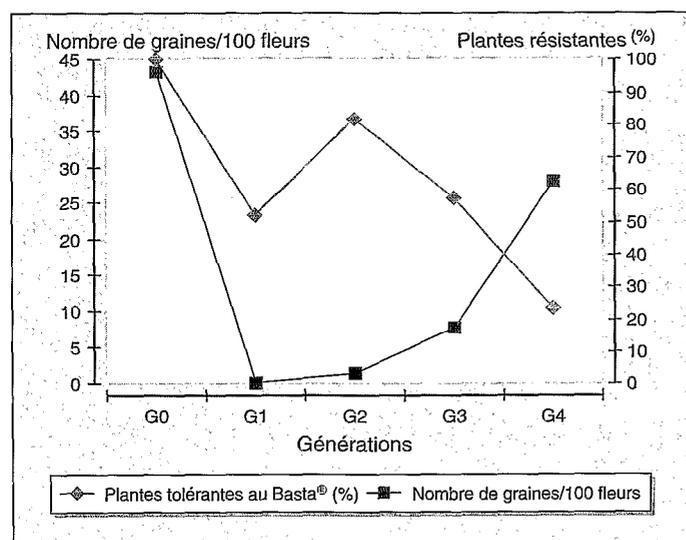


Figure 1. Évolution de la fertilité femelle (nombre de graines pour 100 fleurs) et du taux de transmission du transgène aux différentes générations chez le colza.

Figure 1. Evolution of female fertility (seed number/flowers) and transgene transmission rate at different generations, in oilseed rape.

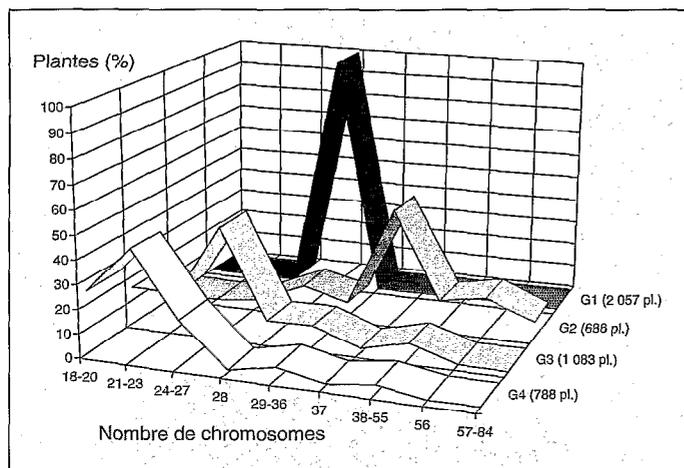


Figure 2. Évolution du nombre de chromosomes aux différentes générations de colza.

Figure 2. Evolution of the chromosome number at the different generations of oilseed rape.

– exploiter la variabilité génétique du colza permettant de modifier sa biologie (morphologie florale, incompatibilité, résistance à l'égrenage, modification de la dormance) pour limiter la dissémination du pollen et des graines ;

– identifier des itinéraires techniques permettant de limiter les repousses [14] ;

– analyser s'il existe un effet de la position initiale du transgène dans le génome du colza sur le transfert à un génome voisin. En effet, nos essais en conditions optimales nous ont révélé, dès la génération G2, qu'il existait un taux de transmission des locus de colza variable en fonction du locus considéré [15]. Le gène *bar* contenu dans la variété Westar, utilisée pour réaliser nos essais en conditions optimales, a été localisé sur la carte génétique du colza en position terminale d'un groupe de liaison et donc probablement télomérique [16]. Parallèlement, le même travail est en cours à partir de sept plantes, produites par Rhône-Poulenc (Lyon, France) [17], issues de sept événements différents de transformation de la variété Westar, contenant une copie à l'état homozygote du gène de la nitrilase, *Bmx*, conférant la résistance aux herbicides de la famille des oxynils. De plus, des locus de colza bien répartis sur la carte génétique du colza et distincts de ceux présents dans la population de ravenelle utilisée sont en cours d'identification. Les transgènes et les locus de colza seront étudiés dans les générations avancées d'hybrides interspécifiques afin de préciser s'il existe des zones privilégiées de recombinaison.

Conclusion

L'utilisation de la transgénèse constitue une révolution dans le domaine de la sélection,

ce qui justifie les mesures de précaution qui sont prises par le biais des différentes commissions. Des questions d'éthique se posent en raison de l'accès à une variabilité génétique quasi illimitée. La décision de mise sur le marché sera prise au cas par cas en fonction de l'espèce considérée et du caractère conféré.

Dans le cas du colza, le sélectionneur sera amené dans certaines situations à privilégier à court terme l'approche traditionnelle de la sélection, dans la mesure du possible, du fait des interrogations qui persistent en relation avec la biologie florale de cette espèce et des possibilités d'hybridation spontanée avec certaines crucifères adventices.

Dans nos conditions, il paraît illusoire de vouloir isoler totalement une parcelle de colza transgénique de tout autre champ de colza, aucune distance limite d'isolement n'ayant pu être définie. Cependant des travaux sont en cours pour tenter de préciser les flux de pollen entre parcelles de colza en tenant compte, par exemple, de la taille des champs, des distances d'isolement et des vecteurs de pollinisation (vent et insectes). À partir de l'ensemble de ces données expérimentales, des études de modélisation sont poursuivies.

Les travaux entrepris sur les flux de gènes entre espèces ont permis d'identifier la ravenelle comme étant l'espèce adventice qui, dans nos conditions, présente le plus fort risque d'hybridation avec le colza lorsque ce dernier ne produit pas de pollen. Les essais en cours permettront d'évaluer la fréquence d'hybridation en conditions agronomiques normales. L'analyse des générations successives d'hybrides obtenus nous a permis d'observer une diminution du taux de transmission de transgène et du nombre de chromosomes mais une augmentation des fertilités mâle et femelle. Cependant,

jusqu'à présent, aucune plante à 18 chromosomes et résistante au glufosinate n'a encore été mise en évidence dans notre étude. Ces travaux sont poursuivis, d'une part, en recherchant si le transgène peut être intégré de façon stable dans le génome de la ravenelle et, d'autre part, en analysant l'effet du cytoplasme sur la valeur adaptative des plantes obtenues. En effet, nous avons montré que les hybrides produits sur cytoplasme colza sont déficients en chlorophylle, le même phénomène ayant été observé dans la situation réciproque (noyau de colza sur cytoplasme radis [18]). L'obtention d'hybrides sur cytoplasme ravenelle [19] rend nécessaire l'analyse de la valeur adaptative des plantes en fonction de l'origine du parent femelle.

Au vu des premiers résultats obtenus, les difficultés rencontrées dans la dissémination de colzas génétiquement modifiés concerneront plus rapidement les flux intraspécifiques (fécondation croisée et surtout gestion des repousses). Les questions soulevées par les colzas génétiquement modifiés rejoignent en fait en grande partie celles posées par la diversification de la production de colza à usages alimentaires ou non alimentaires.

Il apparaît donc important de développer les travaux en cours visant à limiter les risques de dissémination ■

Références

- Renard M, Chèvre AM, Delourme R, Barret P. Les objectifs du génie génétique dans le secteur des oléagineux. *OCL* 1997 ; 4 : 102-6.
- Picard-Nizou AL, Pham-Delégue MH, Kerguelen V, et al. Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *Oleifera*). *Transg Res* 1995 ; 4 : 270-6.
- Timmons AM, O'Brien ET, Charters YM, Dubbels SJ, Wilkinson MJ. Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *Euphytica* 1995 ; 85 : 417-23.
- Scheffler JA, Parkinson R, Dale P. Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plot of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breeding* 1995 ; 114 : 317-21.
- Scheffler JA, Parkinson R, Dale P. Frequency and distribution of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research* 1993 ; 2 : 356-64.
- Lavigne C, Klein EK, Vallée P, Pierre J, Godelle B, Renard M. A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Genet* 1998 ; 96 : 886-96.
- Mikkelsen TR, Andersen B, Bagger Jorgensen R. The risk of crop transgene spread. *Nature* 1996 ; 380 : 31.
- Kerlan MC, Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Renard M. Risk assessment of outcrossing of

Transgénèse et estimation des risques

transgenic rapeseed to related species : I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 1992 ; 62 : 145-53.

9. Kerlan MC, Chèvre AM, Eber F. Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) and related species : cytogenetical characterization and detection of the transgene. *Genome* 1993 ; 36 : 1099-106.

10. Eber F, Chèvre AM, Baranger A, Vallée P, Tanguy X, Renard M. Spontaneous hybridization between a male sterile oilseed rape and two weeds. *Theor Appl Genet* 1994 ; 88 : 362-8.

11. Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Kerlan MC, Barret P, Vallée P, Renard M. Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic *Brassica*. *Acta Horticulturae* 1996 ; 407 : 169-79.

12. Baranger A, Chèvre AM, Eber F, Renard M. Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species : an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 1995 ; 91 : 956-63.

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

14. Champolivier J, Messean A. Impact du colza transgénique dans les systèmes de culture : étude du flux de gènes. *OCL* 1997 ; 4 : 111-3.

15. Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Hureau G, Barret P, Picault H, Renard M. Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids : an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 1998 ; 97 : 90-8.

16. Baranger A, Delourme R, Foisset N, Barret P, Dupuy P, Renard M, Chèvre AM. Wide mapping of a T-DNA insertion site in oilseed rape using Bulk Segregant Analysis and comparative mapping. *Plant Breeding* 1997 ; 116 : 553-60.

17. Freyssinet M, Borrod G, Creange P, et al. Development of transgenic oilseed rape resistant to oxynil herbicides. 9th international rapeseed congress, Cambridge, UK, 1995 : 974-6.

18. Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chétrit P, Rémy R, Rouselle P, Renard M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 1983 ; 191 : 244-50.

19. Darmency H, Fleury A, Lefol E. Effect of transgenic release on weed biodiversity : oilseed rape and wild radish. *Brighton Crop Conf Weeds* 1995 ; 433-8.

Summary

Impact of oilseed rape genetic transformation

A.M. CHÈVRE, ET AL.

In oilseed rape, genetic transformation offers new opportunities for the selection of characters such as male sterility to increase yields, grain quality, pest resistance and herbicide tolerance. Potential impacts of new introduced genes on food quality and the environment should be assessed. Regarding the environmental impact, the spread of introduced genes is dependant on pollen and seed dispersal.

Oilseed rape is partially allogamous (20 to 30% of outcrossing) and pollen is carried by the wind and insects. Some studies have indicated that viable pollen can be found 1.5 km from the pollen source [3]. In discontinuous pollen-dispersal experiments, cross-hybridization rates were estimated to be 0.0156% and 0.0038% at 200 m and 400 m, respectively [4] whereas in a continuous pollen dispersal experiment, only 0.00033% of hybrids were found 47 m from the central plot [5]. To obtain a pollen dispersal curve, a square field (90 m x 90 m) was planted, and a herbicide-tolerant variety as pollen source was grown in the central plot (10 m x 10 m). Approximately half of the pollen produced by an individual plant fell within 3 m, and the probability of subsequent fertilization decreased slowly along a negative exponential gradient according to the distance from the source. Pollen dispersal distributions, based on individual plants from whole plots, instead of individual plants, would underestimate the proportion of pollen dispersal over average to long distances [6].

Various steps have to be overcome to enable efficient gene flow between species, including: (i) the production of viable F1 interspecific hybrids; (ii) genetic recombination between genomes of two species, which can lead to introgressions; (iii) the production of fertile successive backcross generations; and (iv) gene (especially transgene) transmission through these different generations, with effective transgene introgression and the maintenance of such plants within natural populations.

In a first step, reciprocal hand pollinations followed by embryo rescue were performed between a transgenic oilseed rape (*Brassica napus*, AACC, 2n = 38) containing the bar gene, which confers herbicide tolerance (material produced by PGS, Gent, Belgium), and five weedy crucifer species: wild kale (*B. oleracea*, CC, 2n = 18) which is an oilseed rape progenitor, wild mustard (*Sinapis arvensis*, SarSar, 2n = 18), wild radish (*Raphanus raphanistrum*, RrRr, 2n = 18), black mustard (*B. nigra*, BB, 2n = 16) and hoary mustard (*B. adpressa*, syn: *Hirschfeldia incana* AdAd, 2n = 14). Hybrids were obtained for all combinations tested (Table 1). When present, the bar gene was expressed. Analyses of the meiotic behaviours indicated that the chromosome pairing frequency was dependant on the wild species genome (Table 2). The fertility of these interspecific hybrids was poor (Table 3).

In a second step, field experiments were performed under optimal conditions, i.e. in isolated trials using male-sterile oilseed rape as female parent and a weed as pollinator. The results obtained from different wild species tested (hoary mustard, wild mustard and wild radish) confirmed previous data (Tables 1, 2 and 3). The highest hybridization rate was obtained using wild radish as pollinator [10, 11]. This model was chosen for further experiments. Different generations (Table 4) were produced using the same field design. Experiments involving different male sterile oilseed rape varieties (Basta-tolerant) revealed a significant difference in the production of interspecific hybrids according to the female oilseed rape genotype [12]. The female fertility of G1 interspecific hybrids was poor, but this fertility was improved in successive backcross generations (Figure 1). The transgene showed Mendelian heredity in the G1 generation. The transmission rate increased in the G2 generation, but decreased in the G3 and G4 generations (Figure 1). Regarding the chromosome number, most of the F1 interspecific hybrids had the expected structure (ACRr, 2n = 28) (Figure 2), but a decrease was observed in the G3 and G4 generations (Figure 2). No plants with the same chromosome number as wild radish and herbicide tolerance were obtained.

In a third step, field experiments under normal agronomic conditions are under way.

Pollen and seed flow is the most difficult problem to manage. Different genetic strategies for decreasing these characters are proposed.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 525-30.

Résumé

Impact de la transformation génétique du colza

A.M. CHÈVRE, ET AL.

La transformation génétique du colza ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration et de diversification de cette espèce hermaphrodite. Son système de reproduction est mixte (20 à 30 % de fécondation croisée), la pollinisation étant à la fois entomophile et anémophile. Le premier point étu-

dié concerne l'évaluation des distances de pollinisation au sein de l'espèce. Des expérimentations ont permis de montrer une diminution rapide du flux de pollen dans les premiers mètres mais aucune distance limite n'a pu être définie. Cette dissémination nous a conduits à évaluer les risques de croisements avec des espèces adventices de la même famille botanique, abondantes dans les zones de culture. Les premiers travaux réalisés en serre par croisements manuels et au champ par culture de colzas mâles stériles en présence d'adventices comme pol-

linisateur ont permis d'identifier la ravenelle comme étant l'espèce présentant le plus fort taux d'hybridation interspécifique et une fréquence élevée d'appariements chromosomiques intergénomiques. En conditions optimales, les études réalisées sur le modèle colza transgénique tolérant à un herbicide-ravenelle n'ont pas permis jusqu'à présent d'obtenir de ravenelle (2n = 18) ayant intégré le transgène dans leur génome. Des études en conditions agronomiques normales ont été initiées et des stratégies de prévention de la dissémination sont proposées.