

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 septembre 2004 (23.09.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/080202 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **A23L**
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000569
- (22) Date de dépôt international : 10 mars 2004 (10.03.2004)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
03/02954 10 mars 2003 (10.03.2003) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **GENO-PLANTE-VALOR** [FR/FR]; 93, rue Henri Rochefort, F-91025 Evry (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **GUILLET, Carine** [FR/CA]; Appt 100, 741 d'Aiguillon, Quebec, Quebec G1R1M8 (CA). **BARRIERE, Yves** [FR/FR]; 15, rue du Grand Quéreux, F-86600 Cloue (FR). **MURIGNEUX, Alain** [FR/FR]; 7, impasse des Boutons d'Or, F-63670 la Roche Blanche (FR). **MARTINANT, Jean-Pierre** [FR/FR]; 6, rue de la Croix de l'Aire Basse, F-63910 Vertaizon (FR). **REDONDO, Elise** [FR/FR]; 46, rue des Gravouses, F-63100 Clermont-Ferrand (FR).
- (74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie José** etc.; Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.



WO 2004/080202 A2

(54) Title: PRODUCTION OF PLANTS WITH IMPROVED DIGESTIBILITY HAVING AN INACTIVE PEROXIDASE

(54) Titre : OBTENTION DE PLANTES A DIGESTIBILITE AMELIOREE POSSEDANT UNE PEROXYDASE INACTIVE.

(57) Abstract: The invention relates to the improvement of the digestibility of a plant, by total or partial inhibition of the expression and/or the activity of the peroxidase Pox3/U19 in said plant. The invention further relates to the selection of plants with improved digestibility in which the expression and/or the activity of the peroxidase Pox3/U19 is partially or totally inhibited.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'amélioration de la digestibilité d'une plante, par inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de la peroxydase Pox3/U19 de ladite plante. L'invention concerne également la sélection de plantes à digestibilité améliorée, chez lesquelles l'expression et/ou l'activité de la peroxydase Pox3/U19 est partiellement ou totalement inhibée.

OBTENTION DE PLANTES A DIGESTIBILITE AMELIOREE POSSEDANT UNE PEROXYDASE INACTIVE.

La présente invention concerne l'amélioration de la digestibilité de plantes fourragères, et plus
5 particulièrement du maïs.

L'utilisation du maïs comme fourrage, notamment sous forme d'ensilage, est de plus en plus répandue. En effet, le maïs fourrage présente de nombreux avantages : son rendement au champ est relativement
10 élevé, sa récolte et son stockage sont aisés. Il constitue un apport alimentaire riche en énergie dont les qualités nutritionnelles sont stables, qui peut être complémenté en protéines par des protéagineux ou par des tourteaux d'oléoprotéagineux comme le soja, et permet
15 d'obtenir notamment une production laitière régulière et d'un niveau élevé.

L'amélioration des variétés de maïs fourrager a initialement porté principalement sur l'augmentation de rendement, sur la rusticité et sur la résistance à la
20 verse (BARRIERE et al., Fourrages, 107-119, 2000). Toutefois, il a été observé que parallèlement, la valeur alimentaire qui n'était pas prise en compte dans les critères de sélection, avait diminué en moyenne et présentait une grande variabilité d'un hybride à l'autre,
25 se traduisant par des écarts importants dans la production de lait. Un effort de sélection a donc été entrepris pour améliorer la valeur alimentaire des maïs fourragers, en particulier après la mise au point des équations de prédiction de la valeur énergétique et
30 l'adoption d'une solubilité enzymatique de référence (ANDRIEU, Prod. Anim., 273-274, 1995).

Une composante importante de la valeur alimentaire est la digestibilité. Par exemple, différentes expérimentations menées avec des vaches
35 laitières ont montré que l'utilisation de variétés plus digestibles permet une augmentation de la production de lait et une meilleure prise de poids des vaches, quand le niveau de complémentation ne permet pas aux animaux

d'exprimer leur potentiel avec les variétés normales. En outre, ces variétés plus digestibles permettent aux animaux d'atteindre leur potentiel avec un plus faible niveau de complémentation, ce qui permet en particulier
5 de réduire les coûts de production.

Un facteur important limitant la digestibilité des plantes fourragères est lié à la présence dans les parois des cellules végétales, de composés phénoliques, en particulier de lignines. Les lignines établissent
10 différents types de liaisons avec les autres constituants pariétaux et forment un maillage serré qui gêne l'accessibilité des enzymes digestives aux glucides pariétaux, principales sources d'énergie pour les herbivores. La part de résidus non digérés varie au cours
15 du développement de la plante. Le taux de lignification augmente au cours de la maturation de la plante et provoque une diminution de sa digestibilité. Toutefois, il existe une variabilité génétique de l'intensité et de la qualité de la lignification entre les lignées ou les
20 hybrides, pour un niveau de maturité donnée, associée à une variabilité de digestibilité (MECHIN et al., J. Sci. Food Agric., 80, 574-580, 2000). Cette variabilité est aussi illustrée par les modifications de quantité et qualité de lignine et l'amélioration de la digestibilité
25 observée chez les mutants « brown-midrib », en particulier le mutant bm3.

Par conséquent, une des voies privilégiées d'amélioration de la valeur alimentaire du maïs fourrager concerne la sélection ou la production par génie
30 génétique de plantes dont les lignines sont modifiées qualitativement ou quantitativement.

Les lignines sont des polymères insolubles de 3 monomères d'alcools ou monolignols, dérivant de la voie des phénylpropanoïdes (NEISH, Constitution and
35 Biosynthesis of Lignin, eds New York: Springer Verlag, 1-43, 1968) : l'alcool p-coumarylique (sous-unités H), l'alcool coniférylique (sous-unités G) et l'alcool sinapylique (sous-unités S). Chez le maïs les proportions

respectives des unités H/S/G sont voisines de 3/35/62 (MECHIN, Thèse INAPG, 2000). Chacun de ces précurseurs peut former diverses liaisons avec les autres et ainsi constituer la lignine. D'autres liaisons peuvent également s'établir avec d'autres composés pariétaux (polysaccharides et protéines) pour former un réseau tridimensionnel complexe. Les monolignols libèrent par oxydation un radical permettant leur association spontanée. La formation de ces radicaux dépendrait de peroxydases et de laccases ou d'autres oxydases. Un nombre important de ces enzymes en association avec des protéines de régulation serait nécessaire dans l'assemblage des sous-unités H, G et S (BOUDET, Plant Physiol. Biochem., 38, 81-96, 2000)

Bien que les mécanismes impliqués *in vivo* dans la biosynthèse de la lignine ne soient pas complètement élucidés, il est généralement considéré que les laccases pourraient intervenir dans la formation des dimères et des trimères alors que les peroxydases permettraient d'obtenir un degré de polymérisation supérieur à partir des dimères et trimères (ROS BARCELO, International Review of Cytology, 176, 87-132, 1997).

Les peroxydases appartiennent à une famille multigénique et sont très largement représentées dans le génome des plantes. Par exemple le génome d'*Arabidopsis thaliana* compterait plus de 70 peroxydases (WELINDER et al., Eur. J. Biochem., 269(24), 6063-6081, 2002).

En outre, les peroxydases intervenant dans des voies métaboliques très variées, il est très difficile de déterminer lesquelles sont impliquées dans la lignification (BOUDET et al, Plant Physiol. Biochem., 38, 81-96, 2000).

QUIROGA et al, (Plant Physiol., 122, 1119-1127, 2000) et OSTERGAARD (Plant Mol. Biol., 44, 231-243, 2000) ont identifié des peroxydases impliquées dans la synthèse de la lignine chez la tomate (TPX1) et chez *Arabidopsis thaliana* (ATP A2). MOROSHI et KAJITA (Journal of Plant Research, 517-523, 2001) sont parvenus à sous-

réguler une peroxydase impliquée dans la synthèse des lignines chez un arbre. Dans ce cas, la diminution de l'activité de cette enzyme entraîne une augmentation de la teneur en sous-unités S et des liaisons non condensées ainsi qu'une diminution de la quantité de lignines dans la paroi.

Les inventeurs ont cartographié le gène d'une peroxydase, qu'ils ont dénommée peroxydase Pox3/U19, sur le chromosome 6 (bin 6.06), et ont établi qu'il existait une colocalisation entre ce gène et des QTL de digestibilité et de teneur en lignines de la paroi. Ce gène correspond à la séquence Pox3 répertoriée dans GenBank sous le numéro d'accès AJ401276.

La séquence d'ADN génomique de Pox3/U19, obtenue à partir de la lignée de maïs F2, est représentée sur la Figure 1, ainsi que dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1. La séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 2.

Les Inventeurs ont séquencé l'ADN génomique d'une longueur d'environ 1,7 kb de Pox3/U19 dans 37 lignées ou écotypes de maïs différents et ont ainsi pu déterminer que la région codante était constituée de 2 introns respectivement de 127 et 111 paires de bases et de 3 exons. L'analyse du polymorphisme réalisée sur ces lignées montre qu'il existe un site polymorphe toutes les 57 paires de bases en moyenne, soit 31 SNP (pour Single nucleotide polymorphism - site polymorphe d'1 seul nucléotide) sur la totalité de la séquence et 17 indels pour insertion-délétion représentant 20% de la longueur totale de la séquence.

Les Inventeurs ont en outre découvert que chez certaines lignées de maïs plus digestibles le gène de la peroxydase Pox3/U19 était interrompu par un fragment de transposon de type MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element ; WESSLER et al., Current Opinion in Genetics and Development, 5, 814-821, 1995), introduisant au début du second exon un codon stop résultant en la

production d'une protéine tronquée et donc non-fonctionnelle. Ils ont montré une corrélation significative entre la présence de cet élément transposable et la digestibilité de la lignée.

5 La séquence d'ADN génomique de Pox3/U19 obtenue à partir de la lignée de maïs F7 à digestibilité élevée, est représentée sur la Figure 2, ainsi que dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3. La séquence polypeptidique correspondante est
10 représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 4.

L'alignement de séquences d'ADN génomique de Pox3/U19, obtenues à partir des lignées à digestibilité élevée F226, F227, F7012, et F7, des lignées à
15 digestibilité moyenne F2, W64, et des lignées à faible digestibilité F271, L212, B73, et B14 est représenté sur la Figure 3.

Les analyses effectuées sur 37 lignées ou écotypes de maïs ont permis aux inventeurs de montrer que
20 5 des sites polymorphes entre les lignées F2 et F7 étaient en déséquilibre de liaison avec l'insertion du transposon MITE au site S0465 (la dénomination des sites polymorphes utilisée ici se réfère à leur position par rapport à l'alignement de séquences de la figure 3 ;
25 ainsi, le site S0465 correspond au nucléotide 465 selon la numérotation de cet alignement). Ces sites sont : le site S0061 où un C dans la séquence de F2 est remplacé par un T dans la séquence de F7 ; le site S0231 où un T est inséré dans la séquence de F7 par rapport à la
30 séquence de F2 ; le site S0447 correspondant à un G dans la séquence de F2 et à un A dans la séquence de F7 ; le site S0797 correspondant à un G dans la séquence de F2 et à un T dans la séquence de F7 ; le site S1208 correspondant à la délétion de 4 paires de bases GCAT
35 dans la séquence de F7 par rapport à la séquence de F2. Chacun des ces polymorphismes caractérise un groupe de 5 lignées apparentées (F7, F7012, F324, F227 and F226) possédant un degré de digestibilité élevé.

Les inventeurs ont aussi identifié d'autres sites polymorphes apparaissant associés avec la digestibilité des parois cellulaires sans être en déséquilibre de liaison avec l'insertion du transposon MITE au site S0465. Il s'agit : du site S0270, correspondant à une délétion d'une base (C), caractéristique d'un groupe de quatre lignées à digestibilité élevée (F564, EP1, Wis94-443 et Wis93-3520, non représentées sur la figure 3) par rapport à la séquence de F2 ; du site S0988 où un G dans la séquence de F2 est remplacé par un C dans la séquence de F7 ; ce SNP affecte un site putatif de N-glycosylation ; du site S1663, localisé dans la région 3' non traduite, et correspondant à un A dans la séquence de F2, et un G dans la séquence de F7 et qui explique 20% de la variabilité phénotypique.

La mise en évidence par les Inventeurs de l'implication de Pox3/U19 dans la digestibilité fournit un ensemble de moyens permettant d'obtenir des plantes, en particulier des plantes monocotylédones, notamment le maïs, le sorgho, ou le panicum, possédant une digestibilité accrue.

Ces nouveaux moyens font l'objet de la présente invention.

La présente invention a pour objet un procédé pour améliorer la digestibilité d'une plante, caractérisé en ce que l'on inhibe totalement ou partiellement l'expression et/ou l'activité de la peroxydase Pox3/U19 de ladite plante.

On définit ici comme « peroxydase Pox3/U19 » toute protéine possédant une activité peroxydase, et dont la séquence polypeptidique présente au moins 75%, de préférence au moins 85%, avantageusement au moins 94%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2 sur une fenêtre de comparaison la plus large possible, correspondant de préférence à la totalité de la séquence SEQ ID NO: 2.

Sauf précision contraire, les pourcentages d'identité indiqués ici sont établis à l'aide du logiciel BLAST2 (ALTSCHUL et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402, 1997) en utilisant les paramètres par défaut.

5 L'inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de la peroxydase Pox3/U19 peut être obtenue de diverses manières, par des méthodes connues en elles mêmes.

10 De manière particulièrement avantageuse, cette inhibition peut être obtenue en intervenant en amont de la production de la peroxydase Pox3/U19, par mutagenèse du gène codant pour cette protéine, ou bien par inhibition ou modification de la transcription ou de la traduction.

15 La mutagenèse du gène codant pour la peroxydase Pox3/U19 peut intervenir au niveau de la séquence codante ou des séquences de régulation de l'expression, notamment du promoteur. On peut par exemple procéder à la délétion de tout ou partie dudit gène et/ou
20 à l'insertion d'une séquence exogène. A titre d'exemple, on citera la mutagenèse insertionnelle : on produit un grand nombre d'individus dérivant d'une plante active pour la transposition d'un élément transposable, (élément AC ou Mutator chez le maïs), et on sélectionne, par
25 exemple par PCR, les plantes chez lesquelles une insertion s'est effectuée dans le gène de la peroxydase Pox3/U19.

On peut également introduire une ou plusieurs mutations ponctuelles avec des agents physiques (par
30 exemple radiations) ou chimiques. Ces mutations ont pour conséquence de décaler le cadre de lecture et/ou d'introduire un codon stop dans la séquence et/ou de modifier le niveau de la transcription et/ou de la traduction du gène et/ou de rendre l'enzyme moins active
35 que la protéine sauvage. Les allèles mutés du gène de Pox3/U19 peuvent être identifiés par exemple par PCR à l'aide d'amorces spécifiques dudit gène.

Dans ce cadre, on peut notamment utiliser des techniques de type « TILLING » (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes ; McCALLUM et al, Plant Physiol., 123, 439-442, 2000).

5 On peut aussi effectuer une mutagenèse dirigée, ciblant le gène codant pour la peroxydase Pox3/U19. L'inhibition ou la modification de la transcription et/ou de la traduction peuvent être
10 obtenues par l'expression d'ARN sens, antisens ou double-brin dérivés du gène de la peroxydase Pox3/U19, ou de l'ADNc de cette protéine, ou bien par l'utilisation d'ARNs interférents (pour revue sur les techniques d'inhibition antisens cf. par exemple : WATSON et GRIERSON, Transgenic Plants : Fundamentals and
15 Applications (HIATT, A, ed) New York : Marcel DEKKER, 255-281, 1992 ; CHICAS et MACINO, EMBO reports, 21(11), 992-996, 2001 ; pour revue concernant plus spécifiquement l'utilisation des ARNs interférents cf. HANNON, Nature, 418, 244-251, 2002).

20 La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins un polynucléotide choisi parmi :

a) un polynucléotide codant pour une peroxydase Pox3/U19 telle que définie ci-dessus ;

25 b) un polynucléotide complémentaire d'un polynucléotide a) ci-dessus ;

c) un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs, de préférence au moins 15, avantageusement au moins 20, et de manière tout à fait préférée au moins 50 nucléotides consécutifs, spécifique d'un
30 polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide,

pour obtenir une plante possédant une digestibilité accrue.

35 On définit ici comme « polynucléotide codant pour une peroxydase Pox3/U19 » tout polynucléotide contenant l'information génétique permettant la synthèse de ladite peroxydase.

Ceci englobe notamment l'ADN génomique, par exemple la séquence SEQ ID NO: 1 représentée en annexe, ainsi que l'ADNc correspondant.

On définit comme « fragment spécifique » d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, tout fragment dudit polynucléotide dont la séquence n'est pas trouvée dans d'autres gènes de la même plante, et notamment dans d'autres gènes de ladite plante codant pour des peroxydases.

On définit ici comme polynucléotide capable de s'hybrider sélectivement avec un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, tout polynucléotide qui lorsqu'il est hybridé en conditions stringentes avec une banque d'acide nucléique de la même plante (notamment une banque d'ADN génomique, ou d'ADNc) produit un signal d'hybridation détectable (c'est-à-dire au moins 2 fois supérieur, de préférence au moins 5 fois supérieur au bruit de fond) avec ledit polynucléotide, mais ne produit aucun signal détectable avec d'autres séquences de ladite banque, et notamment avec des séquences codant pour d'autres peroxydases.

Des conditions stringentes d'hybridation, pour un polynucléotide donné, peuvent être identifiées par l'homme du métier en fonction de la taille et de la composition en bases du polynucléotide concerné, ainsi que de la composition du mélange d'hybridation (notamment pH et force ionique). Généralement, des conditions stringentes, pour un polynucléotide de taille et de séquence données, sont obtenues en opérant à une température inférieure d'environ 5°C à 10°C à la température de fusion (T_m) de l'hybride formé, dans le même mélange réactionnel, par ce polynucléotide et son complémentaire.

A titre d'exemple de fragment spécifique d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide, on citera notamment un polynucléotide susceptible d'être obtenu à partir d'ADNc ou d'ADN génomique non intronique

de maïs, par amplification en conditions stringentes avec les amorces :

OL 321 : CACCGGAGTGGCTGCG (SEQ ID NO: 5)

et

- 5 OL 322 : ATCGACAAATATATATGTTTATAAGG (SEQ ID NO: 6),
ainsi que les fragments d'au moins 12 nucléotides consécutifs, de préférence au moins 15, avantageusement au moins 20, et de manière tout à fait préférée au moins 50 nucléotides consécutifs, dudit polynucléotide.

10 Les positions des amorces SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6 sont encadrées sur la séquence représentée sur la Figure 1.

La présente invention a en particulier pour objet un procédé pour augmenter la digestibilité d'une
15 plante, par inhibition totale ou partielle de la peroxydase Pox3/U19 endogène de ladite plante, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de ladite plante avec une construction d'ADN recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus,
20 placé en orientation sens ou en orientation antisens, ou pouvant être transcrit en ARN double brin, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

La présente invention a également pour objet des constructions d'ADN recombinant, comprenant un
25 polynucléotide tel que défini ci-dessus. Ces constructions peuvent être notamment :

- des cassettes d'expression, comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié. Ces cassettes
30 d'expression peuvent également comprendre, avantageusement, d'autres éléments de régulation, en particulier des éléments de régulation de la transcription tels que terminateurs, amplificateurs, etc. ;
- 35 - des vecteurs recombinants, comprenant un polynucléotide, ou avantageusement une cassette d'expression tels que définis ci-dessus.

Des constructions d'ADN recombinant conformes à l'invention peuvent également comprendre d'autres éléments, par exemple un ou plusieurs marqueurs de sélection.

5 L'homme du métier dispose d'un très large choix d'éléments utilisables pour l'obtention de constructions d'ADN recombinant conformes à l'invention.

A titre d'exemples non-limitatifs de promoteurs utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera :

10 - des promoteurs constitutifs, tels que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) décrit par KAY et *al.* (Science, 236, 4805, 1987), ou ses dérivés, le promoteur du virus de la mosaïque des nervures de manioc (CsVMV) décrit dans la Demande PCT WO 97/48819, le promoteur de l'ubiquitine ou le promoteur « Actine-Intron-actine », du riz (McELROY et *al.*, Mol. Gen. Genet., 231, 150-160, 1991 ; GenBank numéro d'accès S 44221).

20 - des promoteurs inductibles ou tissu-spécifiques, afin de ne modifier la teneur ou la composition en lignines qu'à certains stades du développement de la plante, dans certaines conditions environnementales, ou dans certains tissus-cibles, comme par exemple, les tiges, les feuilles, les graines, les spathes, le cortex ou le xylème.

A titre d'exemples non-limitatifs d'autres éléments de régulation de la transcription utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera des terminateurs, tels que le terminateur 3'NOS de la nopaline synthase (DEPICKER et *al.*, J. Mol. Appl. Genet., 1, 561-573, 1982), ou le terminateur 3'CaMV (FRANCK et *al.*, Cell, 21, 285-294, 1980 ; GenBank numéro d'accès V00141).

35 A titre d'exemples non-limitatifs de gènes marqueurs de sélection utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera notamment des gènes conférant une résistance à un antibiotique (HERRERA-

ESTRELLA et al., EMBO J., 2, 987-995, 1983) tel que l'hygromycine, la kanamycine, la bléomycine ou la streptomycine, ou à un herbicide (EP 0 242 246) tels que le glufosinate, le glyphosate ou la bromoxynil, ou le
5 gène NPTII qui confère la résistance à la kanamycine (BEVAN et al., Nucleic Acid Research, 11, 369-385, 1984).

La transformation des plantes peut s'effectuer par de nombreuses méthodes, connues en elles-mêmes de l'homme du métier.

10 On peut par exemple transformer des cellules végétales, des protoplastes ou des explants, et régénérer une plante entière à partir du matériel transformé. La transformation peut ainsi être réalisée, à titre d'exemples non-limitatifs :

15 - par transfert des vecteurs conformes à l'invention dans des protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylèneglycol (PG) en présence de cations divalents (Ca^{2+}) selon la méthode décrite dans l'article de KRENS et
20 al. (Nature, 296, 72-74, 1982) ;

- par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de FROMM et al. (Nature, 319, 791-793, 1986) ;

25 - par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes des séquences d'ADN d'intérêt, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de FINER et al. (Plant Cell Report, 11, 323-
30 328, 1992) ;

- par micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

On peut également utiliser *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans
35 les articles de BEVAN et al. (Nucleic Acid Research, 11, 369-385, 1984) et d'AN et al. (Plant Physiol., 81, 86-91, 1986), ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de JOUANIN et al.

(Plant Sci., 53, 53-63, 1987). Par exemple, la transformation de cellules végétales peut être effectuée par le transfert de la région T du plasmide circulaire extra-chromosomique inducteur de tumeurs Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*, en utilisant un système binaire (WATSON et al., Ed. De Boeck Université, 273-292, 1994). On peut aussi utiliser *Agrobacterium tumefaciens* sur des plantes entières, par exemple par dépôt au niveau de la blessure d'une plante monocotylédone, de la bactérie hébergeant l'ADN à transférer, en présence de substances libérées au niveau de la blessure d'une plante dicotylédone.

La présente invention a également pour objet les cellules végétales et les plantes transgéniques susceptibles d'être obtenues par un procédé conforme à l'invention. Bien entendu, la présente invention englobe les descendants, notamment les hybrides issus d'un croisement impliquant au moins une plante selon l'invention, obtenus par semis ou par multiplication végétative, des plantes directement obtenues par le procédé de l'invention. De préférence, lesdites plantes sont des monocotylédones, avantageusement du maïs, du sorgho ou du panicum.

L'invention comprend également les cellules et tissus végétaux, ainsi que les organes ou parties de plantes, y compris feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, et/ou graines obtenues à partir d'une plante conforme à l'invention.

La présente invention a aussi pour objet un procédé de sélection de plantes, caractérisé en ce qu'il comprend la recherche chez les plantes à tester d'un allèle du gène de la peroxydase Pox3/U19 possédant une mutation résultant en une inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de ladite protéine.

Ledit allèle peut être recherché par détection directe de la mutation responsable de l'inhibition ; il peut également être recherché par détection de la forme allélique associée à cette mutation d'un polymorphisme en

déséquilibre de liaison avec celle-ci. Par exemple, l'insertion du transposon MITE peut être détectée directement, ou bien par détection de la forme allélique d'un ou plusieurs des polymorphisme S0061, SS0231, S0447, S0797 et S1208.

Les allèles mutants favorables à la digestibilité ainsi identifiés peuvent ensuite être introgressés dans des lignées choisies, et notamment dans des « lignées élites » à savoir des lignées présentant un potentiel agronomique et commercial important.

On peut en particulier utiliser, dans le cadre de ce procédé, des polynucléotides spécifiques de la peroxydase Pox3/U19, tels que définis ci-dessus, et notamment :

- des amorces permettant d'amplifier sélectivement le gène de la peroxydase Pox3/U19 ou des sondes d'acide nucléique permettant la détection sélective de ce gène.

A titre d'exemples non-limitatifs d'amorces permettant d'amplifier sélectivement le gène de la peroxydase Pox3/U19, on citera notamment le couple d'amorces défini par les séquences suivantes :

GACGAAGCGGCACTGCTTGCGCTTCACCA (SEQ ID NO: 7)

et

TGCCACAGTAACAAGCGAGCTTACCAAGA (SEQ ID NO: 8).

Les positions de ces amorces sont indiquées en gris et soulignées sur les séquences représentées sur les Figures 1 et 2.

L'utilisation de ces amorces permet, par comparaison du produit d'amplification avec celui obtenu à partir de plantes possédant une peroxydase Pox3/U19 active, de détecter les mutations pouvant affecter l'expression ou l'activité de ladite protéine. Par exemple, la comparaison des tailles des produits d'amplification permet de détecter la présence d'insertions ou de délétions, susceptibles de résulter en la production d'une protéine inactive.

- des amorces ou des sondes d'acide nucléique permettant de détecter une mutation déterminée, préalablement identifiée comme affectant l'expression ou l'activité de la peroxydase Pox3/U19 ou des sondes d'acide nucléique permettant la détection sélective de ce gène:

A titre d'exemple non limitatif, on citera notamment le couple d'amorces défini par les séquences suivantes, qui permet d'amplifier sélectivement l'ADN de plantes possédant l'insertion du transposon MITE dans le gène codant pour Pox3/U19 :

GGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTT (SEQ ID NO:9)

AGGAGACAACGCCGGGGCAC (SEQ ID NO: 10)

Ces deux types d'amorces peuvent être utilisés séparément ou en combinaison ; par exemple, la combinaison d'un couple d'amorces permettant d'amplifier sélectivement le gène de la peroxydase Pox3/U19 et d'un couple d'amorces permettant de détecter une mutation déterminée est utilisable pour détecter des plantes hétérozygotes pour cette mutation.

L'invention a également pour objet les couples d'amorces définis ci-dessus, ainsi que les kits comprenant ces couples d'amorces individuellement ou en combinaison.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'implication de la peroxydase Pox3/U19 dans la digestibilité, et son utilisation pour l'obtention de plantes possédant une digestibilité améliorée.

EXEMPLE 1 : OBTENTION DE L'ADN GENOMIQUE DE POX3/U19

Des amorces spécifiques de Pox3/U19 ont été définies à partir de la séquence d'ADNc de la peroxydase Pox3/U19.

L'amorce sens (U19S1) située position 1 à 29 de l'ADNc est représentée par la séquence (SEQ ID NO: 7) ci-dessous :

5'-GACGAAGCGGCACTGCTTGCGCTTCACCA-3' (29 bases Tm=75°C)

5 L'amorce antisens (U19AS1) située position 1170-1198 de l'ADNc est représentée par la séquence (SEQ ID NO: 8) ci-dessous :

5'TGCCACAGTAACAAGCGAGCTTACCAAGA-3' (29 bases Tm=71°C)

La position de ces amorces est indiquée sur la Figure 1.

Les amplifications par PCR sont réalisées à partir de 100-150 ng d'ADN selon le protocole suivant :

Mix PCR :

100-150 ng d'ADN génomique

15 0,2 µM de chaque amorce

200 µM de chaque dNTP

2,5 unités de polymérase REDTaq® (Sigma) / 50µL de réaction

5 µL de tampon 10X pH 8,3 comprenant 100 mM de tris-HCL, 500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂ et 0,01% de gélatine

Cycle :

5 min à 95°C

30 cycles : 30 sec à 95°C

30 sec à 60°C

25 1 min 40 à 72°C

5 min à 72°C

La séquence obtenue par amplification a une taille d'environ 1,44 kb. Elle se compose de 3 exons et de 2 introns respectivement d'environ 130 et 100 pb. Les sites d'épissage consensus des monocotylédones sont présents.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE L'ASSOCIATION D'UNE AMELIORATION DE LA DIGESTIBILITE, AVEC UNE PEROXYDASE Pox3/U19 INACTIVE.

35 Association sites polymorphes/digestibilité

La séquence codant pour la peroxydase Pox3/U19 a été amplifiée chez 37 lignées. Les séquences ainsi

obtenues ont été alignées. Le pourcentage de polymorphisme est de 2,2% soit 1 SNP toutes les 45 bases environ. Le taux de polymorphisme de la séquence d'acides aminés est de 1,39% soit seulement 5 changements d'acides aminés sur 358.

La construction d'un arbre phylogénétique selon la méthode UPGMA sur les séquences nucléiques permet de distinguer deux groupes :

Le premier groupe comprend la lignée F7, et des lignées apparentées dont l'amplification PCR du gène codant pour Pox3/U19 aboutit à l'obtention d'un fragment de 1744 pb.

Le second groupe comprend les lignées dont l'amplification PCR du gène codant pour Pox3/U19 donne un fragment d'environ 1410 pb.

Cette différence de taille entre les amplifiats des deux groupes est due à la présence dans le deuxième exon d'un élément de 321 pb possédant les caractéristiques structurales d'un élément transposable. En effet, à chacune de ses extrémités une quinzaine de paires de bases est répétée de manière imparfaite et inversée. Une répétition directe de 5 paires de bases est présente de part et d'autre du site d'insertion de l'élément. Celui-ci correspond à un élément MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) (WESSLER et al., Current Opinion in Genetics and Development, 5, 814-821, 1995).

Une analyse de variance (test ANOVA) réalisée sur chaque locus polymorphe permet de rechercher les associations avec le paramètre de digestibilité. Ensuite, une étape de régression par la méthode des moindres carrés (pour un modèle linéaire) est réalisée afin de repérer le locus qui explique la plus grande part de la variabilité du caractère digestible.

Le résultat au locus d'insertion du transposon MITE est le suivant : la probabilité pour que le polymorphisme correspondant à l'insertion de l'élément

soit liée à la digestibilité est significative à un seuil de 5% (probabilité de 0,032).

Recherche d'association entre la digestibilité et la présence de l'insertion MITE

5 Un couple d'amorces amplifiant spécifiquement l'insertion de l'élément MITE a été défini.

L'amorce sens est représentée par la séquence (SEQ ID NO: 9) ci-dessous :

U19MITES

10 5'-GGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTT-3' (24 bases, T_m= 67,8°C)

et l'amorce antisens par la séquence (SEQ ID NO: 10) ci-dessous :

U19MITEAS

5'-AGGAGACAACGCCGGGGCAC-3' (20 bases, T_m=65,5°C)

15 Les amplifications par PCR sont réalisées à partir de 100 ng d'ADN selon le protocole suivant :

Mix PCR :

100 ng d'ADN génomique

0,2 µM de chaque amorce

20 200 µM de chaque dNTP

1,25 unités de polymérase REDTaq® (Sigma) / 25µL de réaction

2,5 µL de tampon 10X pH 8,3 comprenant 100 mM de tris-HCL, 500 mM de KCl, 11 mM de MgCl₂ et 0,01% de gélatine

25 Cycle :

5 min à 95°C

25 cycles : 30 sec à 95°C

30 sec à 65°C

30 sec à 72°C

30 5 min à 72°C

Ce couple d'amorces amplifie spécifiquement l'insertion MITE dans le gène de Pox3/U19. Il n'y a aucune amplification avec ce couple d'amorces lorsque les individus n'ont pas cette mutation dans le gène de Pox3/U19.

Caractéristiques de la peroxydase de la lignée F7

La lignée F7 et certaines lignées apparentées, pour lesquelles le gène codant pour la peroxydase a été séquencé, ont une séquence de 1744 pb au lieu de 1440 pb.

5 La séquence génomique obtenue se compose de la région codante constituée de trois exons et de deux introns. Les introns sont de petite taille soit respectivement 130 et 100 pb.

10 La différence de taille est due à l'insertion dans le deuxième exon d'un transposon de type MITE de 321 pb.

La traduction de l'allèle de Pox3/U19 possédant l'insertion de l'élément MITE permet d'obtenir une séquence d'acides aminés homologue aux traductions
15 des allèles de Pox3/U19 ne possédant pas cette insertion pour les 111 premiers acides aminés, correspondant à la traduction du premier exon et du premier tiers du deuxième exon. En effet, l'insertion de l'élément MITE introduit un codon stop dans la séquence 75 nucléotides
20 après le début de l'insertion.

Il apparaît donc que contrairement à la peroxydase sauvage qui comporte 358 acides aminés, la peroxydase de la lignée F7 et des lignées dont le gène est interrompu par l'insertion du MITE, ne comporte que
25 111+25 acides aminés. L'insertion de l'élément transposable entraîne, dans le produit de traduction, la délétion d'acides aminés putativement impliqués dans l'activité catalytique. En effet, par analyse bioinformatique (Prosit release 10.0), le domaine
30 peroxydase 1 se positionnerait des position 163 à 212, le domaine peroxydase 2 des positions 36 à 87. Par conséquent, l'insertion de l'élément MITE empêcherait la traduction du domaine peroxydase 1 et rendrait l'enzyme totalement ou partiellement inactive.

Génotypage de lignées de maïs

Le génotypage est réalisé par PCR sur quelques lignées (F7012, Lan496 et F192) puis sur une collection plus vaste.

5 Les amorces utilisées sont U19S, U19AS, U19MITES, U19MITEAS. En fonction du couple d'amorces utilisé, il est possible d'avoir un marqueur dominant ou codominant. Par exemple, le couple U19S/U19MITEAS permet de distinguer les plantes homozygotes pour l'allèle muté
10 ou sauvage des plantes hétérozygotes.

F7012 est une lignée fixée (homozygote) issue de F7 qui possède l'élément MITE. Lan496 est aussi une lignée fixée non apparentée à F7 et qui ne possède pas l'insertion. L'hybride présente les 2 allèles du gène de
15 Pox3/U19. F192, qui est une lignée fixée issue du croisement F7×F2 a été typée et présente l'insertion de l'élément MITE.

Les résultats attendus pour chaque couple d'amorces sont résumés dans la Figure 4.

20 Dans un second temps, une collection plus vaste de lignées ayant le parent F7 dans leur généalogie et ayant un niveau de digestibilité variable a été typée.

Les résultats du typage pour les individus apparentés à F7 et les notes de digestibilité
25 correspondante sont représentés dans le tableau I ci-après.

Les lignées ont été notées :

1 quand l'élément MITE est présent au niveau du gène de Pox3/U19.

30 0 quand l'élément MITE est absent au niveau du gène de Pox3/U19.

Tableau I

	MITE présence/absence	Digestibilité
F7	1	4
F192	1	3
F7012	1	4,5
F226	1	3,5
F227	1	3
F324	1	5,5
2058	1	4,5
2068	1	5
LGFS	1	3,5
CP1718	0	3
CP1622	0	3
SK02	0	3,5
SK122	0	2,5
SK132	0	3
F268	0	2,5
F7023	0	1,5
LGD3	0	2,5
LGI9	0	1,5
LGI2	0	2
LGI1	0	3

La note de digestibilité résulte des expérimentations à long terme conduites depuis 1992. Les lignées ont été phénotypées en valeur propre pour leur valeur de digestibilité in vitro des parois (critère DINAG, ARGILLIER et al., Euphytica, 82, 175-184, 1995). Ces valeurs ont ensuite été homogénéisées et synthétisées sous forme de note de 1 (très peu digestible comme F271) à 5 (très digestible comme F324).

Le tableau II ci-après illustre la comparaison des moyennes des notes de digestibilité des individus ayant l'insertion MITE et des individus ne l'ayant pas.

Tableau II

	Moyenne de digestibilité	Ecart-type	Variance	Nombre de lignées
Lignées possédant le MITE	4,06	0,88	0,78	9
Lignées ne possédant pas le MITE	2,55	0,65	0,42	11

Comparaison des moyennes

Estimation de la variance commune	F calculé	Degrés de liberté	F tabulé pour un seuil de 5%	Significatif ?	F tabulé pour un seuil de 1%	Significatif ?
0,58	4,41	18	2,101	OUI	2,878	OUI

Le test de comparaison de moyennes entre les lignées possédant l'insertion MITE et celles ne la possédant pas montre que les moyennes des notes de digestibilité pour les lignées ayant et n'ayant pas l'élément MITE sont significativement différentes à un seuil de 1%.

L'analyse de variance réalisée avec comme co-variable, le pourcentage de F7 dans les lignées analysées confirme un effet hautement significatif de l'insertion du MITE.

Ces résultats montrent une association entre la présence d'une peroxydase inactive et un niveau de digestibilité accru.

Association entre la digestibilité et la présence de l'insertion MITE dans une population recombinante Lan496 x F7012

L'impact de l'allèle muté de Pox3/U19 a été évalué d'une autre façon par typage d'une population d'haploïdes doublés issus du croisement de Lan496 (absence d'insertion de l'élément MITE et de digestibilité moyenne) par F7012 (insertion de l'élément MITE et bonne digestibilité) :

46 haploïdes doublés ont été typés 0,
48 haploïdes doublés typés 1
La ségrégation est de type $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$.

L'effet de l'insertion de l'élément MITE sur les caractères de parois (digestibilité, lignification,

composition en glucides pariétaux) a été étudié à partir de l'estimation de ces caractéristiques faite sur des plantes récoltées à une date normale ensilage en 2002 (10 septembre 2002). Ceci étant, la différence de précocité
5 de floraison entre les parents et les conditions peu favorables à la maturation des maïs en 2002 ont fait qu'il existait à la récolte un écart important de niveau de maturation entre les différentes lignées étudiées.

Les caractéristiques pariétales et les valeurs
10 de digestibilité ont été évaluées par NIRS (Near Infra Red Spectroscopy), en utilisant la calibration du Centre de Recherches Agronomiques de Libramont, Belgique.

Les mesures de NDF, ADF et ADL sont réalisées selon les protocoles décrits dans GOERING et *al.*, Agric.
15 Handb., 379, US Gov. Print Office, Washington DC, 1971 ; celles de lignine Klason selon DENCE et *al.*, Methods in Lignin Chemistry Springer (ed.) Berlin, 33-62, 1992 ; les mesures de DINAG et DINAGZ respectivement selon ARGILLIER et *al.*, Euphytica, 82, 175-184, 1995 et BARRIERE et *al.*,
20 Fourrages, 163, 221-238, 2000. Enfin, les mesures de dNDF sont réalisées selon STRUIK, thèse doctorale, Université de Wageningen, 1983 et DOLSTRA et MEDEMA, Proceedings of The 15th Congress Maize And Sorghum Section of Eucarpia, 4-8 juin 1990, Baden, Austria, 258-270.

25 Une analyse de variance a été réalisée avec des effets bloc, sous-bloc, matière sèche, marqueur MITE et génotype, une covariable matière sèche étant nécessaire en raison du décalage de précocité entre les deux parents, en particulier après un été froid peu
30 favorable à la maturation des lignées. Les résultats obtenus avec la variable « marqueur MITE » sont illustrés par le tableau ci-dessous.

Tableau III.

Marqueur MITE	Carré moyen MITE	Carré moyen résiduel	F (Fisher)	P (Probabilité en %)
ADL/NDF	0,28	0,14	2,0	16,0ns
LK/NDF	30,5	0,65	47,1	0,00**
NDF	92,9	2,23	41,5	0,00**
ADF	52,0	1,15	45,2	0,00**
NDF-ADF	38,4	0,87	43,9	0,00**
ADF-ADL	5,9	0,35	17,0	0,00**
DINAGZ	89,7	1,33	67,4	0,00**
dNDF	26,6	2,93	9,1	0,39**

NDF : teneur en paroi

ADF : teneur cellulose et lignine ADL

NDF-ADF : teneur en hémicellulose

ADL/NDF : teneur en lignine ADL

LK/NDF : teneur en lignine Klason

dNDF : digestibilité de la paroi

DINAGZ : digestibilité des parois (sauf amidon, glucide soluble)

ns : non significatif (P>10%)

** : significatif au seuil de 1%

5

10

15

20

A un stade de récolte représentatif du stade ensilage (compris entre 30 et 35 % de matière sèche en moyenne), l'effet du MITE mesuré par le critère du test F de Fisher est très significatif sur de nombreux caractères liés à la digestibilité des parois. Il y a ainsi un effet significatif de l'insertion MITE sur les caractères de digestibilité *in vitro* des parois DINAGZ et dNDF. De même, il y a un effet du MITE sur la composition en glucides pariétaux hémicellulose et cellulose. Sur la lignification de la paroi, l'effet du MITE est très significatif sur la lignine totale, estimée par le critère lignine Klason dans le NDF, mais ne l'est pas sur la partie la plus résistante de la lignine estimée par l'ADL dans le NDF.

Présence de l'ARN de la peroxydase Pox3/U19 dans F7012 (possédant l'insertion MITE) et dans Lan496 par RT-PCR

25

30

Pour confirmer l'inactivation de la peroxydase par l'insertion d'un élément MITE, des analyses de RT-PCR ont été réalisées sur le haut et le bas de jeunes plantes (mélange tiges et gaines de feuilles) et sur des limbes de feuilles pour des plantes au même stade. Ces analyses ont été réalisées sur la lignée F7012 (porteur de l'insertion MITE) et sur la lignée Lan496. L'extraction d'ARN total se fait à partir des tissus en présence de billes d'inox dans des tubes Eppendorf de 2mL trempés

dans l'azote liquide. Les tissus sont ensuite broyés dans un Mixer Mill MM300 (Qiagen®) en agitant 2 fois 30 secondes. La poudre ainsi obtenue est vortexée avec 1mL de réactif TRIzol® (Invitrogen) à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 18000g pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse est à nouveau extraite à température ambiante avec 200 µL de chloroforme. L'ARN est ensuite précipité avec 500µL d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Après 10 minutes de centrifugation (18000g, 4°C), le culot d'ARN est lavé avec 1mL d'éthanol à 70%, séché puis suspendu dans 30 µL d'eau sans RNase. Après traitement à la DNase ensuite inactivée conformément aux instructions du fournisseur (AMBION), l'ARN est quantifié au spectrophotomètre à 260nm. Environ 5µg d'ARN total est rétro-transcrit en utilisant des hexamères aléatoires (Amersham) et une reverse-transcriptase sans activité RNaseH (Fermentas). Les 20 µL de la réaction de rétro-transcription contiennent également $2,5 \times 10^5$ copies de GeneAmplimer pAW109 RNA (Applied Biosystems). L'ADNc ainsi obtenu est dilué 50 fois dans de l'eau. 5µL sont utilisés pour la réaction PCR dans un volume total de 20µL.

L'allèle Pox3/U19 est amplifié en utilisant l'amorce U19S1 (SEQ ID N°7) avec : soit l'amorce U19R1 (SEQ ID N°11 : 5'-CGTCAGGTTGCCTACCGTGTCTGATCAGCAC-3') située à 84 pb en amont de l'insertion MITE, soit l'amorce U19MITEAS (SEQ ID N°10) située en aval de l'insertion. L'amplification est conduite avec comme témoins positifs l'ARNr 18S et le GeneAmplimer pAW109 RNA. Le nombre de cycles est ajusté en fonction de la visualisation de bandes visibles sur gel d'agarose et ce afin d'avoir une évaluation semi-quantitative. Les bandes sont visualisées avec du bromure d'éthidium.

Aucune différence d'intensité de signal n'est visible entre F7012 et Lan496 pour la partie amont de Pox3/U19 tandis que les bandes issues de l'amplification avec les amorces encadrant le MITE sont à peine visibles. Cette différence d'intensité peut s'expliquer par une

dégradation rapide de la partie non traduite de l'ARN de l'allèle mutant. Cette expérience confirme que l'insertion du transposon MITE entraîne l'inactivation de la peroxydase Pox3/U19.

5 **EXEMPLE 3 : AMELIORATION DE LA DIGESTIBILITE PAR INACTIVATION DE LA PEROXYDASE POX3/U19**

Pour cette approche, une étude de bioanalyse a été réalisée au préalable pour rechercher une région spécifique de la peroxydase U19 afin de ne déréguler qu'un seul gène de cette famille multigénique. Après
10 clonage de ce fragment il a été vérifié par transfert de Southern que ce fragment n'hybridait qu'un seul locus.

Transformation par *Agrobacterium tumefaciens* de plantes de maïs par un antisens du gène de Pox3/U19

15 Construction d'un plasmide comprenant la séquence 3'UTR de la peroxydase Pox3/U19 en orientation antisens :

Le vecteur utilisé pour la transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens* se présente sous la forme d'un plasmide superbinaire d'environ 50 kb (pREC
20 520).

Ce vecteur comporte :

- une région ori : origine de répllication plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*.
25 Cette origine de répllication n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*
- une origine de répllication fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,
- 30 - la région cos du bacteriophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,
- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent
35 l'efficacité de transformation

- les gènes de résistance à la tétracycline (Tétra) et à la spectinomycine (Spect) qui s'expriment uniquement dans les bactéries,

un ADN-T porteur de deux cassettes
5 d'expression : l'une contient le promoteur CsVMV, la séquence 3'UTR de Pox3/U19 en orientation antisens et le terminateur NOS et l'autre comporte un gène de sélection (par exemple, un gène de résistance aux herbicides) sous contrôle du promoteur d'actine de riz et suivi du
10 terminateur 3'NOS.

Protocole de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

(d'après ISHIDA et al., Nature Biotechnology, 14, 745-750, 1996).

Des épis immatures d'une lignée produite en
15 serre, sont prélevés 10 jours après la pollinisation et stérilisés pendant 15 minutes. Les embryons sont prélevés et mis en contact 5 minutes avec une suspension d'*Agrobacterium* contenant le vecteur super binaire tel que décrit ci-dessus. Après avoir été retirés de la
20 suspension d'*Agrobacterium*, les embryons sont mis en culture sur un milieu ne contenant ni de bactériostatique, ni d'agent sélectif. Cette coculture a lieu 4 à 7 jours à l'obscurité.

Après la coculture, les embryons sont repiqués
25 sur un milieu de callogénèse frais contenant le bactériostatique et l'agent sélectif. Un cal va s'initier et se développer à partir de cellules transformées de ces embryons. L'étape de callogénèse se passe à 25 °C à l'obscurité et dure 5 semaines. Les embryons-cals sont
30 repiqués sur milieu frais toutes les 2 à 3 semaines.

Au terme de cette étape les cals blancs, transformés, sont excisés de l'explant primaire et sont repiqués sur un milieu de régénération contenant de la zéatine au lieu d'auxine. L'étape de régénération dure
35 aussi 5 semaines entrecoupées d'un repiquage du cal sur milieu frais toutes les 2 à 3 semaines.

Après 2-3 semaines sur ce milieu, des plantules régénèrent à partir des cals. Une fois que les plantules sont assez développées, elles sont mises en enracinement en tube.

5 Après 10-15 jours en tube, les plantules sont acclimatées en phytotron avant d'être transférées en serre. Les transformants sont ensuite cultivés et croisés avec du pollen d'une plante non transgénique pour produire la génération T1.

10 **Transformation par biolistique de plantes de maïs par un antisens du gène de Pox3/U19**

Construction d'un plasmide comprenant la séquence 3'UTR de la peroxydase Pox3/U19 en orientation antisens :

15 La région 3'UTR de Pox3/U19 en orientation antisens a été clonée dans le vecteur pTriplex2 (SMARTTM cDNA Library construction Kit, CLONTECH). Le fragment *Hind* III - *Eco*R I encadrant la séquence d'intérêt a été introduit dans le vecteur E 919 également ouvert aux sites de restriction *Hind* III et *Eco*R I, sites situés
20 respectivement en aval du promoteur CsVMV et en amont du terminateur NOS. On obtient ainsi le plasmide d'intérêt E 1105.

25 La technique de transformation par biolistique implique de co-transformer des cellules végétales d'une part avec le gène d'intérêt (E 1105), et d'autre part avec un plasmide porteur d'une cassette d'expression (pDM302) comprenant un gène de sélection (par exemple, un gène de résistance à un herbicide) précédé du promoteur adéquat et suivi du terminateur adapté.

30 **Protocole de transformation**

35 Des embryons immatures de HiII sont prélevés 10 jours après la pollinisation. Ils sont mis en culture sur un milieu osmotique. 4 jours après ils sont bombardés avec des particules d'or enrobées de plasmide contenant le gène d'intérêt et un plasmide portant le gène de sélection.

Les embryons sont ensuite repiqués sur un milieu de callogénèse. Cette étape, à l'obscurité et à 25 °C, dure environ 2 mois, entrecoupés de repiquage sur milieu frais tous les 15 jours. Une fois que les cals transformés sont sélectionnés, ils sont cultivés sur milieu de maturation, puis sur milieu de régénération. L'étape de régénération se fait à la lumière et dure 2 à 4 semaines.

Dès 1 à 2 semaines après le passage sur ce milieu des plantules régénèrent à partir d'embryons somatiques initiés pendant l'étape de maturation. Ces plantules sont ensuite mises en enracinement en tube. Comme dans le cas des plantes produites par transformation par *Agrobacterium*, les plantules enracinées sont ensuite acclimatées au phytotron avant transfert en serre pour production de graines T1

Inactivation de la peroxydase Pox3/U19 par RNAi

Construction d'un vecteur comprenant la séquence 3'UTR de la peroxydase Pox3/U19 en orientation sens et antisens

Ce vecteur est construit en utilisant le système Gateway® (Invitrogen).

Un fragment 3'UTR du gène de Pox3/U19, est amplifié par PCR, à partir d'ADNc de maïs contenu dans un plasmide dénommé E1100.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Ol 321 : (CACCGGAGTGGCTGCG; SEQ ID NO: 5) comportant une extension CACC en 5', nécessaire pour le clonage dans le vecteur d'entrée, et

Ol 322: (ATCGACAAATATATATGTTTATAAGG; SEQ ID NO: 6).

Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :

plasmide E 1100 (10 ng/μl) :	2 μl
Tampon x10 (Cloned Pfu Buffer)	2 μl
dNTP (5mM each)	0,8 μl
Ol 321 10 μM	1 μl
Ol 322 10 μM	1 μl
Pfu (2.5U/μl) (Stratagene)	1 μl

H₂O 10,7 µl

Cycle : 10 min 95°
30 sec 92°
30 sec 55° 20 fois
5 40 sec 72°
10 min 72°

Le fragment amplifié est ensuite cloné en antisens et en sens dans le vecteur dans le vecteur pENTR D/Topo (Invitrogen), pour donner le vecteur d'entrée
10 E1121.

Parallèlement le vecteur de destination E1122, qui contient l'intron de tubuline de riz est construit. Une double recombinaison entre ces 2 vecteurs aboutit à l'obtention du vecteur E1129, qui contient une cassette
15 comprenant la 3'UTR de Pox3/U19 en orientation antisens, l'intron de tubuline de riz, et la 3'UTR de Pox3/U19 en orientation sens. De part et d'autre de cette cassette se trouvent deux sites de restriction Sac I. Le fragment Sac I est cloné dans un vecteur de clonage intermédiaire
20 portant un gène de résistance à la kanamycine. Le vecteur obtenu est dénommé E 1137. Le fragment Sac I de E 1137 est introduit dans le vecteur E 919 ouvert au site Sac I, pour obtenir le vecteur E 1142. Ce vecteur porte une cassette d'expression constituée du promoteur CsVMV, de
25 la séquence 3'UTR de U19 en orientation antisens, du premier intron du gène de la tubuline de riz, de la séquence 3'UTR de Pox3/U19 en orientation sens et du terminateur NOS.

Il peut être utilisé pour la transformation du
30 maïs par biolistique, comme décrit ci-dessus.

Obtention des plantes

115 lignées transgéniques ont été obtenues en suivant le protocole de dérégulation décrit ci-dessus. Parmi elles, 105 sont en cours d'observation en serre et
35 18 en champ. Ces plantes font l'objet d'observations phénotypiques complétées par des analyses croisées d'histochimie, de RT-PCR et d'évaluation dans le proche

infra-rouge (NIRS). Suite à ces diverses analyses, les lignées retenues font l'objet d'analyses de digestibilité *in vitro* (selon les différents protocoles mentionnés dans l'exemple 2 ci-dessous).

REVENDICATIONS

- 1) Procédé pour améliorer la digestibilité d'une plante, caractérisé en ce que l'on inhibe totalement ou partiellement l'expression et/ou l'activité dans ladite plante, d'une peroxydase, dénommée ci-après peroxydase Pox3/U19, dont la séquence polypeptidique possède au moins 75% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 2.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite plante est le maïs.
- 3) Utilisation d'au moins un polynucléotide choisi parmi :
- a) un polynucléotide codant pour une peroxydase Pox3/U19 telle que définie dans la revendication 1 ;
 - b) un polynucléotide complémentaire d'un polynucléotide a) ci-dessus ;
 - c) un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs, d'un polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide,
- pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 4) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit polynucléotide est choisi parmi :
- un polynucléotide susceptible d'être obtenu à partir d'ADNc ou d'ADN génomique de maïs, par amplification avec les amorces
CACCGGAGTGGCTGCG (SEQ ID NO: 5)
et
ATCGACAAATATATATGTTTATAAGG (SEQ ID NO: 6) ;
 - un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs dudit nucléotide.
- 5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de la peroxydase

Pox3/U19 est obtenue par mutagenèse du gène codant pour ladite peroxydase.

6) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend la transformation de ladite plante avec une construction d'ADN recombinant comprenant un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 3 ou 4, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

7) Cassette d'expression comprenant un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 3 ou 4, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

8) Vecteur recombinant contenant une cassette d'expression selon la revendication 7.

9) Plante génétiquement modifiée, susceptible d'être obtenue par un procédé selon la revendication 6.

10) Procédé de sélection de plantes, caractérisé en ce qu'il comprend la recherche chez les plantes à tester d'un allèle du gène de la peroxydase Pox3/U19 possédant une mutation résultant en une inhibition totale ou partielle de l'expression et/ou de l'activité de ladite peroxydase.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre sur le maïs.

12) Utilisation d'au moins un polynucléotide tel que défini dans une quelconque des revendications 3 ou 4, pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 10 ou 11.

13) Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre du couple d'amorces SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8.

14) Utilisation selon une quelconque des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre du couple d'amorces SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

15) Couple d'amorces de séquences SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

16) Couple d'amorces de séquences SEQ ID NO: 7 et SEQ ID NO: 8.

17) Couple d'amorces de séquences SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

5 18) Kit pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un couple d'amorces selon une quelconque des revendications 16 ou 17.

F2 U19

[illegible]

FIG. 1

F7 U19

1 GACGAAGCGG CACTGCTTGC GCTTCACCCAC CGTCCTGGCG ACGACGCTTC
 U19S1
 51 TCTCGGCCAC TGCCGCCTGC CTCGACGTCG GCTTCTACGA CAGGACATGC
 101 CCCACTGCCG AGACCATCGT GCAGCAGACC GTGGCGGCCG CGTTCAGGAA
 151 CAACTCCGGC GTCGCTCCGG CGCTGATCCG CATGCACTTC CATGACTGCT
 201 TTGTCAGGGT AATCAAGCAC ACTGCACGCA TGCACGCATG TAGCTAGACG
 251 ACATGCTGTT TTTTTTTTCT CTCCACACGA GCGAGTCACG TAAGTACGCG
 intron 1
 301 CGCGGGCTCT AACTCTAAAC TACTTGCTTG CAGGGCTGCG ATGGCTCGGT
 351 GCTGATCGAC ACGGTGGGCA ACCTGACGGC GGAGAAGGAC GCGCCACCCA
 401 ACAACCCAG CCTCCGGTTC TTCGACGTGG TCGACCGTGC CAAGACGGCA
 451 CTGGAGGCTC AGGGTGTGTT TGGTTGGCT TTTGGTTTTG GCTTTTGCCC
 début
 501 CCTAAAGCC AAAAGCCAAC CAAAGGGCTG CATCTAGGAA GCAGCTTTTT
 551 CTAAAGTCG ACTTTCTCGT AGTGCAAAAC TGAAGCACC CCTGGACCTG
 insertion MITE
 601 CTTTTAGTGG CTTTGAATG GAACTGTGAA AACATATATC AAAGAACTTT
 651 TAACGACTTC TAGTGGTTTT CACCAAACGA TTTTTAGCTT TTTAACAGCA
 701 CACAGCCTAC AGCAGCTTTT TCCACAGCTC ACAGCCCACA GCAACTTTTT
 751 CCACAGCCAC AGCCCAACCA AACAGACCCT CAGTGCCCCG GCGTTGTCTC
 fin
 801 CTGCGCCGAC GTGCTCGCCT TCGCGGCCAG GGACAGCGTC GTGCTCTCCG
 851 GTGGCTCGG CTACCAGGTG CCGGCCGGAC GCCGTGACGG GCGGATATCC
 901 AATGACACCG AAGCCCTCAA CAACCTGCCT CCGCCGTTCT TCAACGCCAC
 951 CGAGCTGGCA GACAGGTTCT CCTCCAAGAA CCTCACTATC GAGGACCTGG
 1001 TCGTGCTCTC CGGCGCGCAC ACCATCGGCG TCTCGCACTG CAGCGGCTTC
 1051 GCCGGCCCGA CAGACCTGAA CGGCCCCGTT GACCGGCTCT ACAACTTCAG
 1101 CTCGCCTGAC GGGGTAGGGA CATCGTCTGT CACCTCGCTC TCTCTGTCCA
 1151 AAACCTTGAA TGCGAAAAAA AGATGACCCC CGGTTACTTA CCATTGCTGT
 intron 2
 1201 GGTGACAGA TTGACCCGAC GCTGAGCAAA GCCTACGCAT TTCTTCTCAA
 1251 GAGCATCTGC CCGGCCAACA CCAGCCAGTT CTTCCCGAAC ACGACGGTGT
 1301 TCATGGACCT CATCACGCCG GAAAGGTTTG ACAACAAGTA CTACGTCGGC
 1351 CTGACCAACA ACCTGGGCCT CTTCAAGTCA GACGTGGCGC TGCTGACCAA
 1401 CGCGACGATG AAGGCCCTGG TCGACTCCTT CGTGCGCAGC GAGGCGACTT
 1451 TCAGGACCAA GTTTGCCAGG TCCATGATCA AGATGGGGCA GATCGAGGTG
 1501 CTGACGGGGA CGCAGGGCGA GATCAGGCGC AACTGCAGGG TCATCAACCC
 1551 CGTTAGTGCC ACCGATGATG TCGTCCTCGC CCGCCCATCA GGATTCACTG
 1601 GAGTGGCTGC GAGCTAGCTA ACCAACTGTC GGTTCATGCA CATGCGTTGT
 Stop
 1651 GCACAGTGTG TGATGTCTAG TGTGAGTTGA TGTGTGAAAT TGTAATAAGT
 1701 AATGAGCAGA TTATCTTGGT AAGCTCGCTT GTTACTGTGG CAAA
 U19 AS1

FIG. 2

3/9

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60
 B73U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 L212U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F2U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 W64AU19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 B14U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F7012U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F226U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F227U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F7U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC
 F271U19_ GACGAAGCGGCACTGCTTGCCTTACCACCGTCCTGGCGACGACGCTTCTCTCGGCCAC

70.....80.....90.....100.....110.....120
 B73U19_ CGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 L212U19_ CGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F2U19_ CGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 W64AU19_ CGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 B14U19_ CGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F7012U19_ TGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F226U19_ TGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F227U19_ TGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F7U19_ TGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT
 F271U19_ TGCCGCCTGCCTCGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCCACTGCCGAGACCATCGT

130.....140.....150.....160.....170.....180
 B73U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 L212U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F2U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 W64AU19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 B14U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F7012U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F226U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F227U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F7U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
 F271U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTTCCAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG

190.....200.....210.....220.....230.....240
 B73U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 L212U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F2U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 W64AU19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 B14U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F7012U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F226U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F227U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F7U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG
 F271U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTTTGTTCAGGGTAATTAAGCTCAC-----GCATGCATG

250.....260.....270.....280.....290.....300
 B73U19_ TGGCTAGAAAGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
 L212U19_ TGGCTAGAAAGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
 F2U19_ TGGCTAGAAAGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
 W64AU19_ TGGCTAGAAAGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
 B14U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
 F7012U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
 F226U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
 F227U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
 F7U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
 F271U19_ TAGCTAGACGACATGCTGTTTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTACGTACG
 * * * * *

FIG. 3

```

.....310.....320.....330.....340.....350.....360
B73U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCC--TTGCTTGCT-GCAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
L212U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCC--TTGCTTGCT-GCAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F2U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCC--TTGCTTGCT-GCAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
W64AU19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCC--TTGCTTGCT-GCAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
B14U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTACTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F7012U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTACTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F226U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTACTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F227U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTACTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F7U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTACTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
F271U19_ CGCGCGGGCTCTAAACTCTAAACTCTTGCTTGCAAGGGCTGCGATGGCTCGGTGCTGATCG
*****
.....370.....380.....390.....400.....410.....420
B73U19_ ACACGGTAGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
L212U19_ ACACGGTAGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F2U19_ ACACGGTAGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
W64AU19_ ACACGGTAGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
B14U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F7012U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F226U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F227U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F7U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
F271U19_ ACACGGTGGGCAACCTGACGGCGGAGAGGACGCGCCACCCAACAACCCAGCCTCCGGT
*****
.....430.....440.....450.....460.....470.....480
B73U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGCTCACTGGAGGCTCAG-----
L212U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGCTCACTGGAGGCTCAG-----
F2U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGCTCACTGGAGGCTCAG-----
W64AU19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGCTCACTGGAGGCTCAG-----
B14U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGGCACTGGAGGCTCAG-----
F7012U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGACGGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTTGGTTTGG
F226U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGACGGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTTGGTTTGG
F227U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGACGGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTTGGTTTGG
F7U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGACGGCACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTTGGTTTGG
F271U19_ TCTTCGACGTGGTCGACCGTGCCAAGGCGGCACTGGAGGCTCAG-----
*****
.....490.....500.....510.....520.....530.....540
B73U19_ -----
L212U19_ -----
F2U19_ -----
W64AU19_ -----
B14U19_ -----
F7012U19_ CTTTTGGTTTTGGCTTTTGCCCCCTAAAAGCCAAAAGCCAACCAAAGGGCTGGATCTAGG
F226U19_ CTTTTGGTTTTGGCTTTTGCCCCCTAAAAGCCAAAAGCCAACCAAAGGGCTGGATCTAGG
F227U19_ CTTTTGGTTTTGGCTTTTGCCCCCTAAAAGCCAAAAGCCAACCAAAGGGCTGGATCTAGG
F7U19_ CTTTTGGTTTTGGCTTTTGCCCCCTAAAAGCCAAAAGCCAACCAAAGGGCTGGATCTAGG
F271U19_ -----
.....550.....560.....570.....580.....590.....600
B73U19_ -----
L212U19_ -----
F2U19_ -----
W64AU19_ -----
B14U19_ -----
F7012U19_ AAGCAGCTTTTTCTAAAAGCCGACTTTCTCGTAGTGCAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
F226U19_ AAGCAGCTTTTTCTAAAAGCCGACTTTCTCGTAGTGCAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
F227U19_ AAGCAGCTTTTTCTAAAAGCCGACTTTCTCGTAGTGCAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
F7U19_ AAGCAGCTTTTTCTAAAAGTCGACTTTCTCGTAGTGCAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
F271U19_ -----

```

FIG. 3 (SUITE)

.....610.....620.....630.....640.....650.....660

.....670.....680.....690.....700.....710.....720

.....730.....740.....750.....760.....770.....780

.....790.....800.....810.....820.....830.....840

FIG. 3 (SUITE)

.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCAGTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCAGTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCAGTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC
CAGACAGGTTCGCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACCTGGTCGTGCTCTCCGGCGCGC

[illegible][illegible]

```

.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200
CTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
CTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
CTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
CTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
CTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
CTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTA--C
CTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTA--C
CTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTA--C
CTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTA--C
CTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAGATGACCCCCGGTTA--C
*****

```

FIG. 3 (SUITE)

.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260
B73U19_ TTACCATGCATTGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
L212U19_ TTACCATGCATTGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F2U19_ TTACCATGCATTGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
W64AU19_ TTACCATGCATTGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
B14U19_ TTACCATGCATTGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F7012U19_ TTACCAT----TGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F226U19_ TTACCAT----TGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F227U19_ TTACCAT----TGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F7U19_ TTACCAT----TGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC
F271U19_ TTACCAT----TGCTGTGGTGTACAGATTGACCCGACGCTGAGCAAAGCCTACGCATTTTC

.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320
B73U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
L212U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F2U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
W64AU19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
B14U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F7012U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F226U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F227U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F7U19_ TTCTCAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
F271U19_ TGCTGAAGAGCATCTGCCCGGCCAACACCAGCCAGTTCTTCCCGAACACGACGGTGTTC
* * * * *
.....1330.....1340.....1350.....1360.....1370.....1380
B73U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
L212U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F2U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
W64AU19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
B14U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F7012U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F226U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F227U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F7U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC
F271U19_ TGGACCTCATCAGCCCGGAAAGGTTTGACAACAAGTACTACGTCGGCCTGACCAACAACC

.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440
B73U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
L212U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F2U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
W64AU19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
B14U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F7012U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F226U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F227U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F7U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG
F271U19_ TGGGCCTCTTCAAGTCAGACGTGGCGCTGCTGACCAACGCGACGATGAAGGCCCTGGTCG

.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500
B73U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
L212U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F2U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
W64AU19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
B14U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F7012U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F226U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F227U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F7U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA
F271U19_ ACTCCTTCGTGCGCAGCGAGGCGACTTTTCAGGACCAAGTTTGCCAGGTCCATGATCAAGA

FIG. 3 (SUITE)

.....1510.....1520.....1530.....1540.....1550.....1560
B73U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
L212U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F2U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
W64AU19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
B14U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F7012U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F226U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F227U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F7U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA
F271U19_ TGGGGCAGATCGAGGTGCTGACGGGGACGCAGGGCGAGATCAGGCGCAACTGCAGGGTCA

.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610.....1620
B73U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
L212U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F2U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
W64AU19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
B14U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F7012U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F226U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F227U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F7U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG
F271U19_ TCAACCCCGTTAGTGCCACCGATGATGTCGTCTCGCCCGCCCATCAGGATTCACCTGGAG

.....1630.....1640.....1650.....1660.....1670.....1680
B73U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA
L212U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTC--AGTGTGTGA
F2U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTC--AGTGTGTGA
W64AU19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTC--AGTGTGTGA
B14U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTC--AGTGTGTGA
F7012U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA
F226U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA
F227U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA
F7U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA
F271U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTTCATGCACATGCGTTGTGTCACAGTGTGTGA

.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740
B73U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
L212U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F2U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
W64AU19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
B14U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F7012U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F226U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F227U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F7U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG
F271U19_ TGTCTAGTGTGAGTTGATGTGTGAAATTGTAATAAGTAATGAGCAGATTATCTTGGTAAG

.....1750.....1760.
B73U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
L212U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F2U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
W64AU19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
B14U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F7012U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F226U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F227U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F7U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA
F271U19_ CTCGCTTGTTACTGTGGCAA

FIG. 3 (FIN)

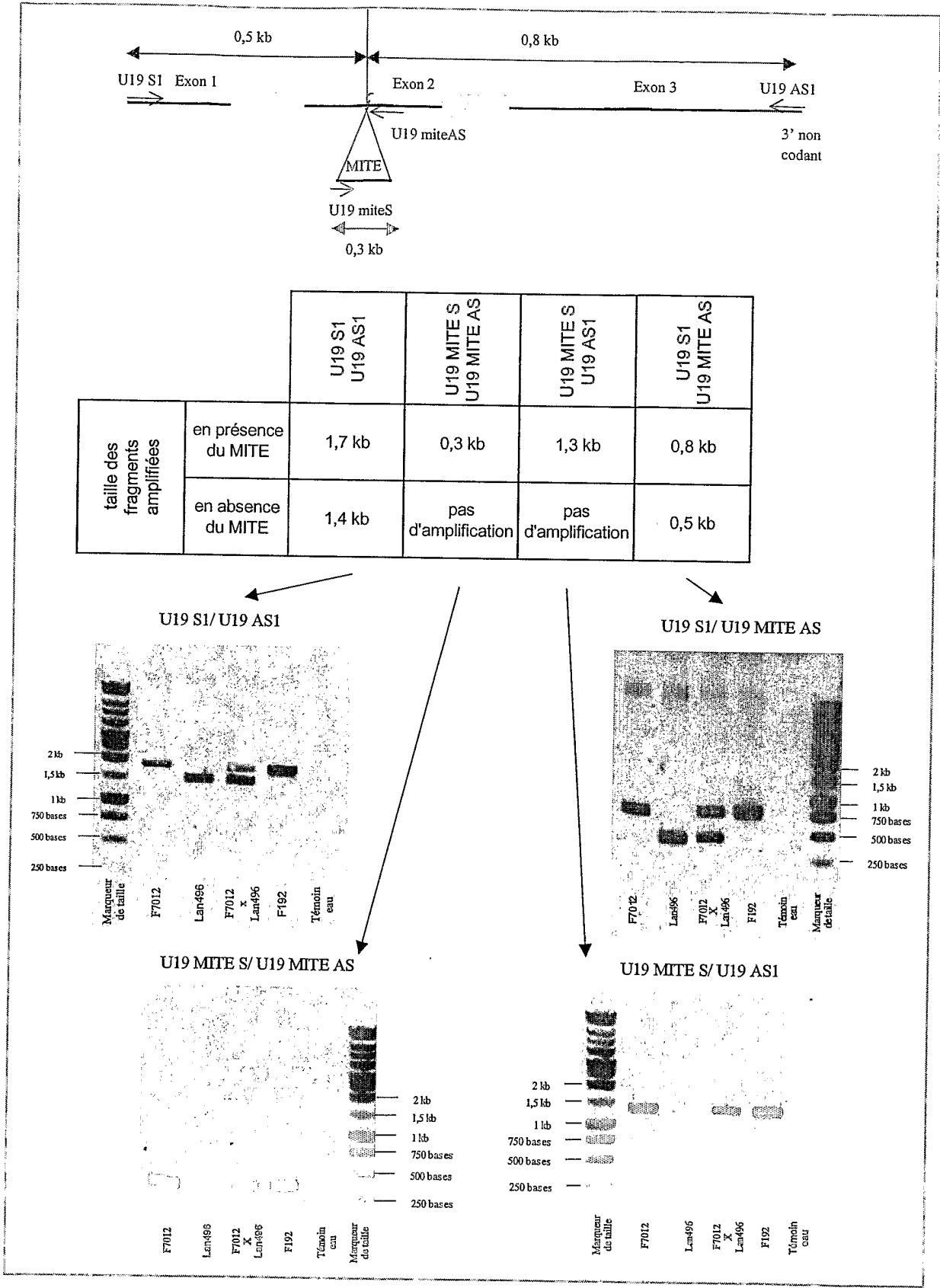


FIG. 4

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE-VALOR
 GUILLET, Carine
 BARRIERE, Yves
 MURIGNEUX, Alain
 MARTINANT, Jean-Pierre

<120> OBTENTION DE PLANTES A DIGESTIBILITE AMELIOREE POSSEDANT UNE
 PEROXYDASE INACTIVE

<130> MJPbv1516-15

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 1532
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(208)
 <223>

<220>
 <221> Intron
 <222> (209)..(322)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (323)..(781)
 <223>

<220>
 <221> Intron
 <222> (782)..(880)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (881)..(1285)
 <223>

<400> 1
 g acg aag cgg cac tgc ttg cgc ttc acc acc gtc ctg gcg acg acg ctt 49
 Thr Lys Arg His Cys Leu Arg Phe Thr Thr Val Leu Ala Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 ctc tcc gcc acc gcc gcc tgc ctc gac gtc ggc ttc tac gac agg aca 97
 Leu Ser Ala Thr Ala Ala Cys Leu Asp Val Gly Phe Tyr Asp Arg Thr
 20 25 30
 tgc ccc act gcc gag acc atc gtg cag cag acc gtg gcg gcc gcg ttc 145
 Cys Pro Thr Ala Glu Thr Ile Val Gln Gln Thr Val Ala Ala Ala Phe
 35 40 45

agg aac aac tcc ggc gtc gct ccg gcg ctg atc cgc atg cac ttc cat	193
Arg Asn Asn Ser Gly Val Ala Pro Ala Leu Ile Arg Met His Phe His	
50 55 60	
gac tgc ttt gtc agg gtaattaagc tcacgcatgc atgtggctag aagacatgct	248
Asp Cys Phe Val Arg	
65	
gtttttttttt cctctccaca cgagcgagtg actgtacgta cgcgcgcggg ctctaaactc	308
cttgcttgct gcag ggc tgc gat ggc tcg gtg ctg atc gac acg gta ggc	358
Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu Ile Asp Thr Val Gly	
70 75 80	
aac ctg acg gcg gag aag gac gcg cca ccc aac aac ccc agc ctc cgg	406
Asn Leu Thr Ala Glu Lys Asp Ala Pro Pro Asn Asn Pro Ser Leu Arg	
85 90 95	
ttc ttc gac gtg gtc gac cgt gcc aag gcg tca ctg gag gct cag tgc	454
Phe Phe Asp Val Val Asp Arg Ala Lys Ala Ser Leu Glu Ala Gln Cys	
100 105 110	
ccc ggc gtg gtc tcc tgc gcc gac gtg ctc gcc ttc gcg gcc agg gac	502
Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Val Leu Ala Phe Ala Ala Arg Asp	
115 120 125	
agc gtc gtg ctc tcc ggt ggc ctc ggc tac cag gtg ccg gcc gga cgc	550
Ser Val Val Leu Ser Gly Gly Leu Gly Tyr Gln Val Pro Ala Gly Arg	
130 135 140 145	
cgt gac ggg cgg ata tcc aat gac acc gaa gcc ctc aac aac ctg cct	598
Arg Asp Gly Arg Ile Ser Asn Asp Thr Glu Ala Leu Asn Asn Leu Pro	
150 155 160	
ccg ccg ttc ttc aac gcc acc gag ctg gca gac agg ttc gcc tcc aag	646
Pro Pro Phe Phe Asn Ala Thr Glu Leu Ala Asp Arg Phe Ala Ser Lys	
165 170 175	
aac ctc agt atc gag gac ctg gtc gtg ctc tcc ggc gcg cac acc atc	694
Asn Leu Ser Ile Glu Asp Leu Val Val Leu Ser Gly Ala His Thr Ile	
180 185 190	
ggc gtc tcg cac tgc agc ggc ttc gcc ggc ccg aca gac ctg aac ggc	742
Gly Val Ser His Cys Ser Gly Phe Ala Gly Pro Thr Asp Leu Asn Gly	
195 200 205	
ccc gtt gac cgg ctc tac aac ttc agc tcg cct gac ggg gtaggggcat	791
Pro Val Asp Arg Leu Tyr Asn Phe Ser Ser Pro Asp Gly	
210 215 220	
cgctctgtcac ctgcgtctct gcaaaacctt gaatgcgaaa aaaagatgac ccccggttat	851
tacttaccat gcattgctgt ggtgtacag att gac ccg acg ctg agc aaa gcc	904
Ile Asp Pro Thr Leu Ser Lys Ala	
225 230	
tac gca ttt ctt ctc aag agc atc tgc ccg gcc aac acc agc cag ttc	952
Tyr Ala Phe Leu Leu Lys Ser Ile Cys Pro Ala Asn Thr Ser Gln Phe	
235 240 245	

ttc ccg aac acg acg gtg ttc atg gac ctc atc acg ccg gaa agg ttt 1000
 Phe Pro Asn Thr Thr Val Phe Met Asp Leu Ile Thr Pro Glu Arg Phe
 250 255 260

gac aac aag tac tac gtc ggc ctg acc aac aac ctg ggc ctc ttc aag 1048
 Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Leu Thr Asn Asn Leu Gly Leu Phe Lys
 265 270 275

tca gac gtg gcg ctg ctg acc aac gcg acg atg aag gcc ctg gtc gac 1096
 Ser Asp Val Ala Leu Leu Thr Asn Ala Thr Met Lys Ala Leu Val Asp
 280 285 290

tcc ttc gtg cgc agc gag gcg act ttc agg acc aag ttt gcc agg tcc 1144
 Ser Phe Val Arg Ser Glu Ala Thr Phe Arg Thr Lys Phe Ala Arg Ser
 295 300 305 310

atg atc aag atg ggg cag atc gag gtg ctg acg ggg acg cag ggc gag 1192
 Met Ile Lys Met Gly Gln Ile Glu Val Leu Thr Gly Thr Gln Gly Glu
 315 320 325

atc agg cgc aac tgc agg gtc atc aac ccc gtt agt gcc acc gat gat 1240
 Ile Arg Arg Asn Cys Arg Val Ile Asn Pro Val Ser Ala Thr Asp Asp
 330 335 340

gtc gtc ctc gcc cgc cca tca gga ttc act gga gtg gct gcg agc 1285
 Val Val Leu Ala Arg Pro Ser Gly Phe Thr Gly Val Ala Ala Ser
 345 350 355

tagctaacca actgtcgggt catgcacatg cattgtgcag tgtgtgatgt ctagtgtgag 1345

ttgatgtgtg aaattgtaat aagtaatgag cagattatct tggttaagctc gcttgttact 1405

gtggcaaaag ttgttttgtt gcatgacaaa aatgtatact catcggatta ttgaaaacaa 1465

aactgatatt tgtgttcagg caaataatag ttctacaaat tccttataaa catatatatt 1525

tgtcgat 1532

<210> 2
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 2
 Thr Lys Arg His Cys Leu Arg Phe Thr Thr Val Leu Ala Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Thr Ala Ala Cys Leu Asp Val Gly Phe Tyr Asp Arg Thr
 20 25 30
 Cys Pro Thr Ala Glu Thr Ile Val Gln Gln Thr Val Ala Ala Ala Phe
 35 40 45
 Arg Asn Asn Ser Gly Val Ala Pro Ala Leu Ile Arg Met His Phe His
 50 55 60
 Asp Cys Phe Val Arg Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu Ile Asp Thr Val
 65 70 75 80

[illegible]

<210>	3
<211>	1744
<212>	DNA

<213> Zea mays
 <220>
 <221> CDS
 <222> (2)..(208)
 <223>

 <220>
 <221> CDS
 <222> (334)..(534)
 <223>

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (458)..(779)
 <223> Insertion MITE

 <400> 3
 g acg aag cgg cac tgc ttg cgc ttc acc acc gtc ctg gcg acg acg ctt 49
 Thr Lys Arg His Cys Leu Arg Phe Thr Thr Val Leu Ala Thr Thr Leu
 1 5 10 15

 ctc tcg gcc act gcc gcc tgc ctc gac gtc ggc ttc tac gac agg aca 97
 Leu Ser Ala Thr Ala Ala Cys Leu Asp Val Gly Phe Tyr Asp Arg Thr
 20 25 30

 tgc ccc act gcc gag acc atc gtg cgg cag acc gtg gcg gcc gcg ttc 145
 Cys Pro Thr Ala Glu Thr Ile Val Arg Gln Thr Val Ala Ala Ala Phe
 35 40 45

 agg aac aac tcc ggc gtc gct ccg gcg ctg atc cgc atg cac ttc cat 193
 Arg Asn Asn Ser Gly Val Ala Pro Ala Leu Ile Arg Met His Phe His
 50 55 60

 gac tgc ctt gtc agg gtaatcaagc aactgcacg catgcacgca ttagctaga 248
 Asp Cys Leu Val Arg
 65

 cgacatgctg tttttttttt ctctccacac gagcgagtga cgtaagtacg cgcgcgggct 308

 ctaactctaa actacttgct tgcag ggc tgc gat ggc tcg gtg ctg gtc gac 360
 Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu Val Asp
 70 75

 acg gtg ggc aac ctg acg gcg gag aag gac gcg cca ccc aac aac ccc 408
 Thr Val Gly Asn Leu Thr Ala Glu Lys Asp Ala Pro Pro Asn Asn Pro
 80 85 90

 agc ctc cgg ttc ttc gac gtg gtc gac cgt gcc aag acg gca ctg gag 456
 Ser Leu Arg Phe Phe Asp Val Val Asp Arg Ala Lys Thr Ala Leu Glu
 95 100 105 110

 gct cag ggt gtg ttt ggt ttg gct ttt ggt ttt ggc ttt tgc ccc cta 504
 Ala Gln Gly Val Phe Gly Leu Ala Phe Gly Phe Gly Phe Cys Pro Leu
 115 120 125

 aaa gcc aaa agc caa cca aag ggc tgg atc taggaagcag ctttttctaa 554
 Lys Ala Lys Ser Gln Pro Lys Gly Trp Ile
 130 135

```

aagtcgactt tctcgtagtg caaaactgaa agcacccttg gacctgcttt tagtggcttt 614
tgaatggaac tgtgaaaaca tatatcaaag aacttttaac gacttctagt ggttttcacc 674
aaacgatttt tagcttttta acagcacaca gcctacagca gctttttcca cagctcacag 734
cccacagcaa ctttttccac agccacagcc caaccaaaca gaccctcagt gcccggcgt 794
tgtctcctgc gccgacgtgc tcgccttcgc ggccagggac agcgtcgtgc tctccggtgg 854
cctcggctac caggtgccgg ccggacgccg tgacgggcgg atatccaatg acaccgaagc 914
cctcaacaac ctgcctccgc cgttcttcaa cgccaccgag ctggcagaca ggttcgcctc 974
caagaacctc actatcgagg acctggctgt gctctccggc gcgcacacca tcggcgtctc 1034
gcaactgcagc ggcttcgccg gcccgacaga cctgaacggc cccgttgacc ggctctacaa 1094
cttcagctcg cctgacgggg tagggacatc gtctgtcacc tcgtctcttc tgtccaaaac 1154
cttgaatgcg aaaaaaagat gacccccggt tacttaccat tgctgtggtg tacagattga 1214
cccgacgctg agcaaagcct acgcatttct tctcaggagc atctgcccg ccaacaccag 1274
ccagttcttc ccgaacacga cgggtgttcat ggacctcatc acgccggaaa ggtttgacaa 1334
caagtactac gtcggcctga ccaacaacct gggcctcttc aagtcagacg tggcgctgct 1394
gaccaacgcg acgatgaagg ccctggtcga ctcttcctg cgcagcgagg cgactttcag 1454
gaccaagttt gccaggtcca tgatcaagat ggggcagatc gaggtgctga cggggacgca 1514
gggcgagatc aggcgcaact gcagggtcac caaccccggt agtgccaccg atgatgtcgt 1574
cctcgcccg ccatcaggat tcaactggagt ggctgcgagc tagctaacca actgtcgggt 1634
catgcacatg cgttgtgcac agtgtgtgat gtctagtgtg agttgatgtg tgaaattgta 1694
ataagtaatg agcagattat cttagtaagc tcgcttgta ctgtggcaaa 1744

```

<210> 4
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (458)..(779)
 <223> Insertion MITE

<400> 4
 Thr Lys Arg His Cys Leu Arg Phe Thr Thr Val Leu Ala Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Thr Ala Ala Cys Leu Asp Val Gly Phe Tyr Asp Arg Thr
 20 25 30
 Cys Pro Thr Ala Glu Thr Ile Val Arg Gln Thr Val Ala Ala Ala Phe
 35 40 45

Arg Asn Asn Ser Gly Val Ala Pro Ala Leu Ile Arg Met His Phe His
 50 55 60
 Asp Cys Leu Val Arg Gly Cys Asp Gly Ser Val Leu Val Asp Thr Val
 65 70 75 80
 Gly Asn Leu Thr Ala Glu Lys Asp Ala Pro Pro Asn Asn Pro Ser Leu
 85 90 95
 Arg Phe Phe Asp Val Val Asp Arg Ala Lys Thr Ala Leu Glu Ala Gln
 100 105 110
 Gly Val Phe Gly Leu Ala Phe Gly Phe Gly Phe Cys Pro Leu Lys Ala
 115 120 125
 Lys Ser Gln Pro Lys Gly Trp Ile
 130 135

<210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 5
 caccggagtg gctgcg

16

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 6
 atcgacaaat atatatgttt ataagg

26

<210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 7
 gacgaagcgg cactgcttgc gcttcacca

29

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 8
 tgccacagta acaagcgagc ttaccaaga

29

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 9

ggcactggag gctcaggggtg tggt 24

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 10
aggagacaac gccggggcac 20

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 11
cgtcaggttg cctaccgtgt cgatcagcac 30