

(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-Pétersbourg, 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), eurasien (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.

A2

WO 2004/080202

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

(54) Titre : OBTENTION DE PLANTES A DIGESTIBILITE AMELIOREE POSSEDDANT 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 10 avantages : son rendement au champ est relativement 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 gène 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 5 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 10 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, 15 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 20 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 25 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'un seul nucléotide) sur la totalité de la séquence et 17 indels pour insertion-délétion représentant 20% de la longueur 30 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 35 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.

15 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 digestibilité moyenne F2, W64, et des lignées à faible digestibilité F271, L212, B73, et B14 est représenté sur la Figure 3.

20 Les analyses effectuées sur 37 lignées ou écotypes de maïs ont permis aux inventeurs de montrer que 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 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
30 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.

30 On peut également introduire une ou plusieurs mutations ponctuelles avec des agents physiques (par exemple radiations) ou chimiques. Ces mutations ont pour conséquence de décaler le cadre de lecture et/ou 35 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 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 obtenues par l'expression d'ARN sens, antisens ou double-
10 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 polynucléotide a) ou b) ci-dessus, ou capable de s'hybrider sélectivement avec ledit polynucléotide,

30 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 (Tm) 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 : ATCGACAAATATATGTTATAAGG (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 10 invention, on citera :

- 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 15 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 25 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 30 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 kanamyine (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 5 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 10 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 15 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 20 végétative, des plantes directement obtenues par le procédé de l'invention. De préférence, lesdites plantes sont des monocotylédones, avantagusement du maïs, du sorgho ou du panicum.

L'invention comprend également les cellules et 25 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 30 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.

35 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, 5 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 10 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 :

15 - 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.

20 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 :

GACGAAGCGGGACTGCTTGCGCTTCACCA (SEQ ID NO: 7)

et

25 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.

30 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 35 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)

AGGAGACAAACGCCGGGGCAC (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.

EXAMPLE 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'-GACGAAGCGGCAGTGCTTGCCTCACCA-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)

10 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,

20 500 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 10 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 15 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. 20 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 25 (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 30 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.

35 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, Tm= 67,8°C)

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

U19MITEAS

5'-AGGAGACAAACGCCGGGGCAC-3' (20 bases, Tm=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.

15 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 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 (Prosite 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.

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

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.

25 Les résultats du typage pour les individus apparentés à F7 et les notes de digestibilité 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.

15 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 20 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) :

25 46 haploïdes doublés ont été typés 0,
48 haploïdes doublés typés 1

La ségrégation est de type ½ ½.

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 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 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. 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., 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.

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 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

ns : non significatif (P>10%)

ADF : teneur cellulose et lignine ADL

** : significatif au seuil de 1%

NDF-ADF : teneur en hémicellulose

5 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)

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 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.

5 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

10 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

15 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

20 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'-CGTCAGGTTGCCTACCGTGTGATCAGCAC-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 10 qu'un seul gène de cette famille multigénique. Après 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 réPLICATION plasmidique Col EI, nécessaire au maintien et à la multiplication du plasmide dans *Escherichia coli*.
25 Cette origine de réPLICATION n'est pas fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens*
- une origine de réPLICATION fonctionnelle dans *Agrobacterium tumefaciens* et dans *Escherichia coli*,
- la région cos du bactériophage lambda, pouvant présenter une utilité pour la manipulation du vecteur *in vitro*,
- les régions virB, virC et virG supplémentaires d'*Agrobacterium tumefaciens* qui augmentent 30 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 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 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 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 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 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 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 (SMART™ cDNA Library construction Kit, CLONTECH). Le fragment *Hind* III - *EcoR* I encadrant la séquence d'intérêt a été introduit dans le vecteur E 919 également ouvert aux sites de restriction *Hind* III et *EcoR* 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

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 35 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 amores utilisées sont les suivantes :
O1 321 : (CACCGGAGTGGCTGCG; SEQ ID NO: 5) comportant une extension CACC en 5', nécessaire pour le clonage dans le vecteur d'entrée, et
O1 322: (ATCGACAAATATATGTTATAAGG; 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
O1 321 10 µM	: 1 µl
O1 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 20 I est cloné dans un vecteur de clonage intermédiaire 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 25 cassette d'expression constituée du promoteur CsVMV, de 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 5 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.

10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite plante est le maïs.

3) Utilisation d'au moins un polynucléotide choisi parmi :

15 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 ;

20 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.

25 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

30 CACCGGAGTGGCTGCG (SEQ ID NO: 5)

et

ATCGACAAATATATGTTATAAGG (SEQ ID NO: 6) ;

- un fragment d'au moins 12 nucléotides consécutifs dudit nucléotide.

35 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

1 GACGAAGCGG CACTGCTTGC GCTTCACCAC CGTCCTGGCG ACGACGCTTC
 U19 S1
 51 TCTCCGCCAC CGCCGCCCTGC CTCGACGTG GCTTCTACGA CAGGACATGC
 101 CCCACTGCCG AGACCATCGT GCAGCAGACC GTGGCGGCCG CGTTCAGGAA
 151 CAACTCCGGC GTCGCTCCGG CGCTGATCCG CATGCACTTC CATGACTGCT
 201 TTGTCAGGGT AATTAAGCTC ACCGATGCAT GTGGCTAGAA GACATGCTGT
 intron 1
 251 TTTTTTTCC TCTCCACACG AGCGAGTGAC TGTACGTACG CGCGCGGGCT
 301 CTAAACTCCT TGCTTGCTGC AGGGCTGCGA TGGCTCGGTG CTGATCGACA
 351 CGGTAGGCAA CCTGACGGCG GAGAAGGACG CGCCACCCAA CAACCCCAGC
 401 CTCCGGTTCT TCGACGTGGT CGACCGTGCC AAGGCGTCAC TGGAGGCTCA
 451 GTGCCCGGGC GTGGTCTCCT GCGCCGACGT GCTCGCCTTC GCGGCCAGGG
 501 ACAGCGTCGT GCTCTCCGGT GCCCTCGGCT ACCAGGTGCC GGCGGGACGC
 551 CGTGACGGGC GGATATCCAA TGACACCGAA GCCCTCAACA ACCTGCCTCC
 601 GCCGTTCTTC AACGCCACCG AGCTGGCAGA CAGGTTGCC TCCAAGAAC
 651 TCAGTATCGA GGACCTGGTC GTGCTCTCCG GCGCGCACAC CATCGCGTC
 701 TCGCACTGCA CGGGCTTCGC CGGCCCGACA GACCTGAACG GCCCGTTGA
 751 CCGGCTCTAC AACTCAGCT CGCCTGACGG GGTAGGGCA TCGTCTGTCA
 intron 2
 801 CCTCGCTCTC TGCAAAACCT TGAATGCGAA AAAAGATGA CCCCCGGTTA
 851 TTACTTACCA TGCATTGCTG TGGTGTACAG ATTGACCCGA CGCTGAGCAA
 901 AGCCTACGCA TTTCTTCTCA AGAGCATCTG CCCGGCCAAC ACCAGCCAGT
 951 TCTTCCCGAA CACGACGGTG TTCATGGACC TCATCAGGCC GGAAAGGTTT
 1001 GACAACAAGT ACTACGTCGG CCTGACCAAC AACCTGGGCC TCTTCAAGTC
 1051 AGACGTGGCG CTGCTGACCA ACAGCAGCAGT GAAGGCCCTG GTCGACTCCT
 1101 TCGTGCAG CGAGGGCACT TTCAGGACCA AGTTGCCAG GTCCATGATC
 1151 AAGATGGGGC AGATCGAGGT GCTGACGGGG ACAGCAGGGCG AGATCAGGCG
 1201 CAACTGCAGG GTCATCAACC CCGTTAGTGC CACCGATGAT GTCGCCTCG
 1251 CCCGCCATC AGGATTCACT GGAGTGGCTG CGAGCTAGCT AACCAACTGT
 Stop
 1301 CGGTTCATGC ACATGCATTG TGCAGTGTGT GATGTCTAGT GTGAGTTGAT
 1351 GTGTGAAATT GTAATAAGTA ATGAGCAGAT TATCTTGGTA AGCTCGCTTG
 U19 AS1
 1401 TTACTGTGGC AAAAGTTGTT TTGTTGCATG ACAAAAATGT ATACTCATCG
 1451 GATTATTGAA AACAAAATG ATATTTGTGT TCAGGCAAAT AATAGTTCTA
 1501 CAAATTCCTT ATAAACATAT ATATTTGTCG AT

FIG. 1

F7 U19

1 GACGAAGCGG CACTGCTTGC GCTTCACCAC CGTCCTGGCG ACGACGCTTC
 U19S1
 51 TCTCGGCCAC TGCCGCCCTGC CTCGACGTG GCTTCTACGA CAGGACATGC
 101 CCCAC TGCCCG AGACCACATCGT GCAGCAGACC GTGGCGGCCG CGTTCAAGGAA
 151 CAACTCCGGC GTCGCTCCGG CGCTGATCCG CATGCACTTC CATGACTGCT
 201 TTGTCAGGGT AATCAACGAC ACTGCACGCA TGCACGCATG TAGCTAGACG
 251 ACATGCTGTT TTTTTTTCT CTCCACACGA GCGACTGACG TAAGTACCGCG
 intron 1
 301 CGCGGGCTCT AACTCTAACAC TACTTGCTTG CAGGGCTGCG ATGGCTCGGT
 351 GCTGATCGAC ACGGTGGGCA ACCTGACGGC GGAGAAGGAC GCGCCACCCA
 401 ACAACCCCCAG CCTCCGGTTC TTGACGTGG TCGACGTGC CAAGACGGCA
 451 CTGGAGGCTC AGGGTGTGTT TGGTTGGCT TTTGGTTTG GCTTTGCC
 début
 501 CCTAAAAGCC AAAAGCCAAC CAAAGGGCTG GATCTAGGAA GCAGCTTTT
 551 CTAAAAGTCG ACTTTCTCGT AGTGCAAAAC TGAAAGCACC CCTGGACCTG
 insertion MITE
 601 CTTTTAGTGG CTTTTGAATG GAACTGTGAA AACATATATC AAAGAACTTT
 651 TAACGACTTC TAGTGGTTT CACCAAACGA TTTTAGCTT TTTAACAGCA
 701 CACAGCCTAC AGCAGCTTT TCCACAGCTC ACAGCCCACA GCAACTTTT
 751 CCACAGCCAC AGCCCAACCA AACAGACCC CAGTGCCCG GCGTTGTCTC
 fin
 801 CTGCGCCGAC GTGCTCGCCT TCGCGGCCAG GGACAGCGTC GTGCTCTCCG
 851 GTGGCCTCGG CTACCAAGGTG CGGGCCGGAC GCCGTGACGG GCGGATATCC
 901 AATGACACCG AAGCCCTCAA CAAACCTGCCT CCGCCGTTCT TCAACGCCAC
 951 CGAGCTGGCA GACAGGTTCG CCTCCAAGAA CCTCACTATC GAGGACCTGG
 1001 TCGTGCTCTC CGGCGCGCAC ACCATCGCG TCTCGCACTG CAGCGGCTTC
 1051 GCCGGCCCGA CAGACCTGAA CGGGCCCGTT GACCGGCTCT ACAACTTCAG
 1101 CTCGCCTGAC GGGGTAGGGA CATCGTCTGT CACCTCGCTC TCTCTGTCCA
 1151 AAACCTTGAA TGCAAAAAAA AGATGACCCC CGGTTACTTA CCATTGCTGT
 intron 2
 1201 GGTGTACAGA TTGACCCGAC GCTGAGCAAA GCCTACGCAT TTCTCTCAA
 1251 GAGCATCTGC CCGGCCAACA CCAGCCAGTT CTTCCCGAAC ACGACGGTGT
 1301 TCATGGACCT CATCACGCCG GAAAGGTTTG ACAACAAGTA CTACGTCGGC
 1351 CTGACCAACA ACCTGGGCCT CTTCAAGTCA GACGTGGCGC TGCTGACCAA
 1401 CGCGACGATG AAGGCCCTGG TCGACTCCTT CGTGCAGCAGC GAGGCGACTT
 1451 TCAGGACCAA GTTTGCCAGG TCCATGATCA AGATGGGCA GATCGAGGTG
 1501 CTGACGGGGA CGCAGGGCGA GATCAGGCGC AACTGCAGGG TCATCAACCC
 1551 CGTTAGTGCC ACCGATGATG TCGTCCTCGC CGGCCCATCA GGATTCACTG
 1601 GAGTGGCTGC GAGCTAGCTA ACCAACTGTC GGTTCATGCA CATGCGTTGT
 Stop
 1651 GCACAGTGTG TGATGTCTAG TGTGAGTTGA TGTGTGAAAT TGTAATAAGT
 1701 AATGAGCAGA TTATCTGGT AAGCTCGCTT GTTACTGTGG CAAA
 U19 AS1

3/9

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

B73U19_70.....80.....90.....100.....110.....120
L212U19_ CGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F2U19_ CGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
W64AU19_ CGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
B14U19_ CGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F7012U19_ CGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F226U19_ TGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F227U19_ TGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F7U19_ TGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT
F271U19_ TGCCGCCTGCCTGACGTCGGCTTCTACGACAGGACATGCCCACTGCCGAGACCATCGT

B73U19_130.....140.....150.....160.....170.....180
L212U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F2U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
W64AU19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
B14U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F7012U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F226U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F227U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F7U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG
F271U19_ GCAGCAGACCGTGGCGGCCGCGTTAGGAACAACCTCCGGCGTCGCTCCGGCGCTGATCCG

B73U19_190.....200.....210.....220.....230.....240
L212U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCTCAC-----GCATGCATG
F2U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCTCAC-----GCATGCATG
W64AU19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCTCAC-----GCATGCATG
B14U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCTCAC-----GCATGCATG
F7012U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCACA-----GCATGCATG
F226U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCACA-----GCATGCATG
F227U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCACA-----GCATGCATG
F7U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCACA-----GCATGCATG
F271U19_ CATGCACTTCCATGACTGCTTGTCAAGGTAATTAAAGCACA-----GCATGCATG

B73U19_250.....260.....270.....280.....290.....300
L212U19_ TGGCTAGAAGACATGCTTTTTTTCCCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
F2U19_ TGGCTAGAAGACATGCTTTTTTTCCCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
W64AU19_ TGGCTAGAAGACATGCTTTTTTTCCCTCTCCACACGAGCGAGTGACTGTACGTACG
B14U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
F7012U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
F226U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
F227U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
F7U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG
F271U19_ TAGCTAGAAGACATGCTTTTTCTCTCCACACGAGCGAGTGAC-GTAAGTACG

FIG. 3

4/9

..... 310 320 330 340 350 360
 CGCGCAGGGCTCTAAACTCC--TTGCTTGCT-GCAGGGCTGCATGGCTCGGTGCTGATCG
 ***** * ***** *****
 370 380 390 400 410 420
 ACACGGTAGGCAACCTGACGGCGGAGAAGGACGCGCCACCCAACAACCCCCAGCCTCCGGT
 ***** * *****
 430 440 450 460 470 480
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGTCACTGGAGGCTCAG-----
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGTCACTGGAGGCTCAG-----
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGTCACTGGAGGCTCAG-----
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGTCACTGGAGGCTCAG-----
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGGACTGGAGGCTCAG-----
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGGACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTGGTTGG
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGGACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTGGTTGG
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGGACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTGGTTGG
 TCTTCGACGTGGTGCACCGTGCACAGCGGACTGGAGGCTCAGGGTGTGTTGGTTGG
 ***** * *****
 490 500 510 520 530 540

 CTTTTGGTTTGGCTTTGCCCTAAAGCCAACCAAGGGCTGGATCTAGG
 CTTTTGGTTTGGCTTTGCCCTAAAGCCAACCAAGGGCTGGATCTAGG
 CTTTTGGTTTGGCTTTGCCCTAAAGCCAACCAAGGGCTGGATCTAGG
 CTTTTGGTTTGGCTTTGCCCTAAAGCCAACCAAGGGCTGGATCTAGG

 550 560 570 580 590 600

 AAGCAGCTTTCTAAAAGCCGACTTCTCGTAGTGCAAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
 AAGCAGCTTTCTAAAAGCCGACTTCTCGTAGTGCAAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
 AAGCAGCTTTCTAAAAGCCGACTTCTCGTAGTGCAAAACTGAAAGCACCCCTGGACC
 AAGCAGCTTTCTAAAAGCCGACTTCTCGTAGTGCAAAACTGAAAGCACCCCTGGACC

FIG. 3 (SUITE)

5/9

B73U19	610	620	630	640	650	660
L212U19	-----											
F2U19	-----											
W64AU19	-----											
B14U19	-----											
F7012U19	-----											
F226U19	-----											
F227U19	-----											
F7U19	-----											
F271U19	-----											

B73U19	670	680	690	700	710	720
L212U19	-----											
F2U19	-----											
W64AU19	-----											
B14U19	-----											
F7012U19	-----											
F226U19	-----											
F227U19	-----											
F7U19	-----											
F271U19	-----											

B73U19	730	740	750	760	770	780
L212U19	-----											
F2U19	-----											
W64AU19	-----											
B14U19	-----											
F7012U19	-----											
F226U19	-----											
F227U19	-----											
F7U19	-----											
F271U19	-----											

B73U19	790	800	810	820	830	840
L212U19	-----											
F2U19	-----											
W64AU19	-----											
B14U19	-----											
F7012U19	-----											
F226U19	-----											
F227U19	-----											
F7U19	-----											
F271U19	-----											

B73U19	850	860	870	880	890	900
L212U19	-----											
F2U19	-----											
W64AU19	-----											
B14U19	-----											
F7012U19	-----											
F226U19	-----											
F227U19	-----											
F7U19	-----											
F271U19	-----											

FIG. 3 (SUITE)

B73U19 910 920 930 940 950 960
 L212U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F2U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 W64AU19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 B14U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F7012U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F226U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F227U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F7U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG
 F271U19 CCAATGACACCAGAACCCCTCAACAACCTGCCTCCGCCGGTCTTCACGCCACCGAGCTGG

 B73U19 970 980 990 1000 1010 1020
 L212U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F2U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 W64AU19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 B14U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F7012U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F226U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F227U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F7U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC
 F271U19 CAGACAGGTTGCCCTCCAAGAACCTCACTATCGAGGACTGGTCGTGCTCTCCGGCGC

 B73U19 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 L212U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F2U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 W64AU19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 B14U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F7012U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F226U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F227U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F7U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG
 F271U19 ACACCATCGGCGTCTCGCACTGCAGCGGCTTCGCCGGCCGACAGACCTGAACGGCCCCG

 B73U19 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 L212U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F2U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 W64AU19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 B14U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F7012U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F226U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F227U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F7U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 F271U19 TTGACCGGCTCTACAACCTTCAGCTCGCTGACGGGGTAGGGGCATCGTCTGTACCTCGC
 * *****
 B73U19 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 L212U19 TCTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
 F2U19 TCTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
 W64AU19 TCTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
 B14U19 TCTCT-----GCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTATTAC
 F7012U19 TCTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTA---C
 F226U19 TCTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTA---C
 F227U19 TCTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTA---C
 F7U19 TCTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTA---C
 F271U19 TCTCTCTGT-----CCAAAACCTTGAATGCGAAAAAAAGATGACCCCCGGTTA---C
 **** *

FIG. 3 (SUITE)

7/9

FIG. 3 (SUITE)

8/9

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

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

 B73U19_.....1630.....1640.....1650.....1660.....1670.....1680
 L212U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCACATGCATTGTGC--AGTGTGTGA
 F2U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGC--AGTGTGTGA
 W64AU19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGC--AGTGTGTGA
 B14U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA
 F7012U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA
 F226U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA
 F227U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA
 F7U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA
 F271U19_ TGGCTGCGAGCTAGCTAACCAACTGTCGGTCATGCACATGCATTGTGCA--GTGTGTGA

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

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

FIG. 3 (FIN)

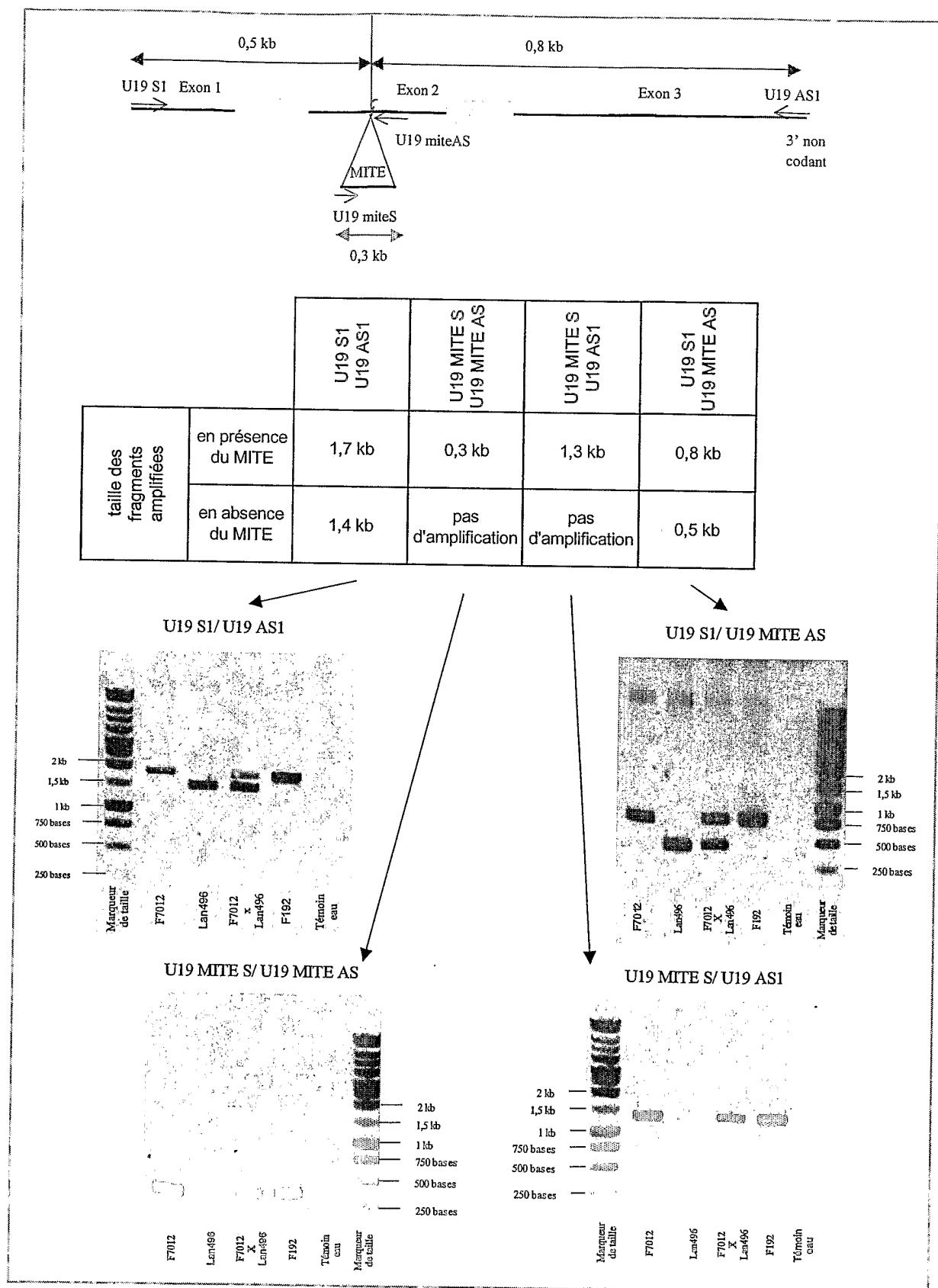


FIG. 4

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE-VALOR

GUILLET, Carine

BARRIERE, Yves

MURIGNEUX, Alain

MARTINANT, Jean-Pierre

<120> OBTENTION DE PLANTES A DIGESTIBILITE AMELIOREE POSSEDENT 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
Thr Lys Arg His Cys Leu Arg Phe Thr Thr Val Leu Ala Thr Thr Leu
1 5 10 15

49

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

97

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

145

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

ttc ccg aac acg acg gtg ttc atg gac ctc atc acg ccg gaa agg ttt Phe Pro Asn Thr Thr Val Phe Met Asp Leu Ile Thr Pro Glu Arg Phe 250 255 260	1000
gac aac aag tac tac gtc ggc ctg acc aac aac ctg ggc ctc ttc aag Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Leu Thr Asn Asn Leu Gly Leu Phe Lys 265 270 275	1048
tca gac gtg gcg ctg ctg acc aac gcg acg atg aag gcc ctg gtc gac Ser Asp Val Ala Leu Leu Thr Asn Ala Thr Met Lys Ala Leu Val Asp 280 285 290	1096
tcc ttc gtg cgc agc gag gcg act ttc agg acc aag ttt gcc agg tcc Ser Phe Val Arg Ser Glu Ala Thr Phe Arg Thr Lys Phe Ala Arg Ser 295 300 305 310	1144
atg atc aag atg ggg cag atc gag gtg ctg acg ggg acg cag ggc gag Met Ile Lys Met Gly Gln Ile Glu Val Leu Thr Gly Thr Gln Gly Glu 315 320 325	1192
atc agg cgc aac tgc agg gtc atc aac ccc gtt agt gcc acc gat gat Ile Arg Arg Asn Cys Arg Val Ile Asn Pro Val Ser Ala Thr Asp Asp 330 335 340	1240
gtc gtc ctc gcc cgc cca tca gga ttc act gga gtg gct gcg agc Val Val Leu Ala Arg Pro Ser Gly Phe Thr Gly Val Ala Ala Ser 345 350 355	1285
tagctaacca actgtcggtt catgcacatg cattgtgcag tgtgtgatgt ctagtgtgag ttgatgtgtg aaattgtaat aagtaatgag cagattatct tggtaagctc gcttgttact gtggcaaaag ttgtttgtt gcatgacaaa aatgtatact catcgatttata ttgaaaacaa aactgatatt tgtgttcagg caaataatag ttctacaaat tccttataaaa catatatatt tgtcgat	1345 1405 1465 1525 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	

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 Ala Ser Leu Glu Ala Gln
100 105 110

Cys Pro Gly Val Val Ser Cys Ala Asp Val Leu Ala Phe Ala Ala Arg
115 120 125

Asp Ser Val Val Leu Ser Gly Gly Leu Gly Tyr Gln Val Pro Ala Gly
130 135 140

Arg Arg Asp Gly Arg Ile Ser Asn Asp Thr Glu Ala Leu Asn Asn Leu
145 150 155 160

Pro Pro Pro Phe Phe Asn Ala Thr Glu Leu Ala Asp Arg Phe Ala Ser
165 170 175

Lys Asn Leu Ser Ile Glu Asp Leu Val Val Leu Ser Gly Ala His Thr
180 185 190

Ile Gly Val Ser His Cys Ser Gly Phe Ala Gly Pro Thr Asp Leu Asn
195 200 205

Gly Pro Val Asp Arg Leu Tyr Asn Phe Ser Ser Pro Asp Gly Ile Asp
210 215 220

Pro Thr Leu Ser Lys Ala Tyr Ala Phe Leu Leu Lys Ser Ile Cys Pro
225 230 235 240

Ala Asn Thr Ser Gln Phe Phe Pro Asn Thr Thr Val Phe Met Asp Leu
245 250 255

Ile Thr Pro Glu Arg Phe Asp Asn Lys Tyr Tyr Val Gly Leu Thr Asn
260 265 270

Asn Leu Gly Leu Phe Lys Ser Asp Val Ala Leu Leu Thr Asn Ala Thr
275 280 285

Met Lys Ala Leu Val Asp Ser Phe Val Arg Ser Glu Ala Thr Phe Arg
290 295 300

Thr Lys Phe Ala Arg Ser Met Ile Lys Met Gly Gln Ile Glu Val Leu
305 310 315 320

Thr Gly Thr Gln Gly Glu Ile Arg Arg Asn Cys Arg Val Ile Asn Pro
325 330 335

Val Ser Ala Thr Asp Asp Val Val Leu Ala Arg Pro Ser Gly Phe Thr
340 345 350

Gly Val Ala Ala Ser
355

<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 acactgcacg catgcacgca tgttagctaga	248
Asp Cys Leu Val Arg	
65	

cgcacatgctg tttttttttt ctctccacac gagcgagtga cgtaagtacg cgccgcggct	308
--	-----

ctaactctaa actacttgct tgcag ggc tgc gat ggc tgc 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 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 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	

aagtgcactt tctcgttagtg caaaaactgaa agcacccctg gacctgcttt tagtggcttt	614
tgaatggaac tgtgaaaaca tatataaag aacttttaac gacttctagt ggttttcacc	674
aaacgattt tagctttta acagcacaca gcctacagca gcttttcca cagtcacag cccacagcaa cttttccac agccacagcc caaccaaaca gaccctcagt gccccggcgt	734 794
tgtctcctgc gccgacgtgc tcgcctcgc ggccaggac agcgtcgtgc tctccgggtgg	854
cctcggctac caggtgccgg ccggacgccc tgacgggcgg atatccaatg acaccgaagc	914
cctcaacaac ctgcctccgc cggtcttcaa cgccaccgag ctggcagaca ggttcgccctc	974
caagaacctc actatcgagg acctggcgt gctctccggc gcgcacacca tcggcgtctc	1034
gcactgcagc ggcttcgccc gcccgcacaga cctgaacggc cccgttgacc ggctctacaa	1094
cttcagctcg cctgacgggg tagggacatc gtctgtcacc tcgctctctc tgtccaaaac	1154
cttgaatgcg aaaaaaagat gaccccccgt tacttaccat tgctgtggtg tacagattga	1214
cccgacgctg agcaaagcct acgcatttct tctcaggagc atctgcccgg ccaacaccag	1274
ccagttcttc ccgaacacga cgggtttcat ggacctcatc acgcccggaaa ggtttgacaa	1334
caagtactac gtcggcctga ccaacaacct gggcctttc aagttagacg tggcgctgct	1394
gaccaacgcg acgatgaagg ccctggtcga ctccttcgtg cgacgcgagg cgactttcag	1454
gaccaagttt gccaggtcca tggatcaagat gggcagatc gaggtgctga cggggacgca	1514
gggcgagatc aggcccaact gcagggtcat caaccccggtt agtgcacccg atgatgtcgt	1574
cctcgccgc ccatcaggat tcactggagt ggctgcgagc tagctaaccg actgtcggtt	1634
catgcacatg cgttgtgcac agtgtgtgt gtctagtgtg agttgatgtg taaaattgtta	1694
ataagtaatg agcagattat cttagtaagc tcgcttgtta 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 gttcacca

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 gctcagggtg tgtt

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