

Analysis of Genetically Transformed Coffee Plants (*Coffea canephora* Pierre) for Resistance to Coffee Leaf Miner: Bioassays, Molecular and Immunological Analyses

**M. DUFOUR¹, R. PHILIPPE², C. FENOUILLET², C. CARASCO-LACOMBE³,
D. GRUCHY², I. JOURDAN³, T. LEROY³**

¹CIRAD-CP, TA 80/IRD, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail: magali.dufour@cirad.fr

²CIRAD-CP, TA 80/02, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

³CIRAD-CP, TA 80/IRD, avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

SUMMARY

Sixty transgenic coffee plants (*Coffea canephora*) were obtained with genetic constructs containing a *Bacillus thuringiensis* gene efficient against Lepidopterae (*cryIAc*). Their molecular analyses (Southern blots and PCR) have been performed including analysis of T-DNA integration quality, and estimation of copy number. These plants were also submitted to bioassays and to studies of toxin occurrences by immunoassays (Western blotting). For the bioassays, coffee plants were put in presence of adult Tanzania leaf miners (*Leucoptera coffeina*) for 24 hours and checked two weeks later. In order to perform biochemical analysis, proteins were extracted from the same plants, concentrated and checked for protein content. After migration and transfer to nitrocellulose membranes, CryIA(c) protein was looked for with a polyclonal rabbit antiserum.

Most of plants harbour single copy integration of complete T-DNA. Transgene expression varies among bioassays and this variation is not always detected through the Western blots. Hypothesis about the kind of antibodies for future experiments will be discussed, as well as the integration of new genetic constructs, harbouring tissue-specific promoters.

RÉSUMÉ

Soixante plantes transgéniques de caféiers (*Coffea canephora*) ont été obtenues à l'aide de constructions contenant un gène de *Bacillus thuringiensis* efficace contre les Lépidoptères (*cryIA(c)*). Leur analyse moléculaire (Southern blots et PCR) a été réalisée, y compris l'analyse de la qualité de l'intégration du T-DNA et l'estimation du nombre de copies de gènes insérés. Ces plantes ont également fait l'objet de bioessais et d'études de la présence de protéines toxiques par immunodétection ("Western blotting"). Pour les bioessais, les plantes ont été mises 24 heures en présence de mineuses Tanzaniennes adultes (*Leucoptera coffeina*) et évaluées deux semaines plus tard. Afin de réaliser les analyses biochimiques, les protéines ont été extraites à partir des mêmes plantes, concentrées et dosées. Après migration et transfert sur une membrane de nitrocellulose, la protéine CryIA(c) a été recherchée par réaction avec un anticorps polyclonal développé chez le lapin.

La plupart des plantes ont une seule copie du T-DNA. Les résultats obtenus permettent de faire des commentaires sur l'expression du transgène; celle-ci varie dans les bioessais, mais cette variation n'est pas toujours bien mise en évidence par les tests Western. Une interprétation des résultats sera présentée ainsi que des hypothèses sur les types d'anticorps à utiliser dans les études futures.