Functional Validation of *Coffea PAL* Genes Using Genetic Engineering

G. PARVATAM[1], V. MAHESH[2], G. A. RAVISHANKAR[1], C. CAMPA[3] AND A. DE KOCHKO[3]

[1]Plant Cell Biotechnology Department, Central Food Technological Research Institute, Mysore-570 020, Karnataka State, India
[2]Avestha Gengraine Technologies, 9th Floor, Int. Tech Park, Discoverer, Whitefield Rd, Bangalore-560 066, Karnataka State, India
[3]IRD, Génomique et qualité du café, UMR DGPC, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

SUMMARY

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyzes the first step of the phenylpropanoid pathway and plays a critical role in the biosynthesis of phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids, coumarins, chlorogenic acids or lignins. PAL enzymes are encoded by a small multigene family. Screening *Coffea canephora* EST libraries, three encoding PAL genes have been isolated. In this paper, their functional validation is considered using a sense or antisense approach in two model plants differing by their ability to accumulate chlorogenic acids (CGAs), compounds known to play a critical role by adding bitterness and astringency to the final coffee beverage quality. In view of this, understanding and identifying the role of each candidate paralogue in CGA biosynthesis is an important step towards the improvement of organoleptic properties. Sense and antisense constructs, comprising individual *Coffea* PAL genes (PAL1, PAL2, PAL3) were prepared in the binary vector pCAMBIA1305.1. All six constructs were introduced into *Arabidopsis* by floral dip method and in tobacco plants by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 or GV 3101 strains. The preliminary analysis of the transformed plants are presented.

RÉSUMÉ

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse la première étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (PPP) et joue un rôle critique dans la biosynthèse des composés phénoliques tels que les anthocyanines, les flavonoïdes, les coumarines, les acides chlorogéniques ou les lignines. Les PAL sont codées par une petite famille multigénique. Par criblage de banques EST de *Coffea canephora*, trois gènes codant des PAL ont été isolés. Leur validation fonctionnelle est envisagée en utilisant l'approche transformation génétique (sens ou antisens) de deux plantes modèles différant par leur capacité à accumuler les acides chlorogéniques (CGAs), composés connus pour jouer un rôle critique en ajoutant l'amertume et l'astringence à la qualité finale du café boisson. L'identification du rôle de chaque paralogue de PAL dans la biosynthèse des CGAs est une étape importante vers l'amélioration des propriétés organoleptiques du café boisson. Des constructions géniques sens et antisens, avec les différents gènes PAL de *C. canephora* (PAL1, PAL2, PAL3) ont été réalisées dans le vecteur binaire pCAMBIA1305.1. Chacune des six constructions a été introduite dans *Arabidopsis* par la méthode d'immersion florale et dans *Nicotiana* par co-culture avec les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 ou GV 3101. L'analyse préliminaire des plantes transformées est présentée dans ce travail.