

TỐI ƯU CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ CHUYỂN GEN VÀO DƯA LEO (*Cucumis sativus* L.) QUA TRUNG GIAN *Agrobacterium tumefaciens*

Phan Thùy Quyên, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Phan Lê Trâm Anh, Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa, Dương Hoa Xô, Nguyễn Xuân Dũng*

Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) là một loại cây rau được trồng phổ biến và lâu đời ở Việt Nam. Một trong những khó khăn lớn trong sản xuất dưa leo là cây rất dễ bị nhiễm virus, dẫn đến giảm năng suất và sản lượng. Vì vậy, giống dưa leo kháng virus có ý nghĩa rất quan trọng đối với thực tế sản xuất. Bài báo này trình bày kết quả tối ưu các yếu tố ảnh hưởng đến sự chuyển gen, là bước đầu tiên trong chiến lược nghiên cứu chuyển gen tạo giống dưa leo kháng virus. Trong đó, mô lá mầm được sử dụng làm nguồn vật liệu nhận gen từ *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) mang vector chuyển gen pCAMBIA 1301 qua đồng nuôi cây. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen như nồng độ acetosyringone (AS), thời gian đồng nuôi cây, nồng độ kháng sinh khử khuẩn và sàng lọc đã được khảo sát. Kết quả cho thấy AS ở nồng độ 100 µM và thời gian đồng nuôi cây 4 ngày thích hợp cho sự chuyển nạp gen vào lá mầm dưa leo. Cefotaxime ở nồng độ 500mg/L và hygromycine ở nồng độ 15 mg/L thích hợp cho việc loại *Agrobacterium* khỏi mô lá mầm và sàng lọc mô chuyển gen, tương ứng.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, *Cucumis sativus* L., chuyển nạp gen, *GUS*.

MỞ ĐẦU

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) là loại cây trồng chủ lực cho thị trường tiêu thụ trong nước cũng như cho ngành chế biến rau quả xuất khẩu. Việc trồng dưa leo mặc dù đã mang lại nguồn thu lớn cho người nông dân nhưng cũng gặp không ít khó khăn do dịch bệnh gây ra bởi virus. Bệnh virus gây mất năng suất (có thể lên đến 100%), tạo nên thiệt hại kinh tế nghiêm trọng ở những vùng không kiểm soát dịch hại hiệu quả, đặc biệt ở các nước đang phát triển (Asma *et al.*, 2015). Phương pháp chuyển gen đã được áp dụng trên cây dưa leo để tạo ra giống dưa leo có khả năng kháng virus (Chee, Slightom, 1991). Việc nghiên cứu chuyển gen vào các loại mô khác nhau của dưa leo cũng đã được thực hiện thành công bởi nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới (Trulson *et al.*, 1986; Chee, 1990; Samento *et al.*, 1992; Nishibayashi *et al.*, 1996). Đây là cơ sở dữ liệu hữu ích có thể xem xét để áp dụng cho nghiên cứu chuyển gen vào dưa leo ở Việt Nam. Tuy nhiên, do hiệu quả chuyển gen thay đổi phụ thuộc vào giống cây nhận gen, gen chỉ thị chọn lọc và chủng *Agrobacterium* (Niaboga *et al.*, 2014), nên việc nghiên cứu tối ưu hóa để xác định các thông số thích hợp cho chuyển gen trên một giống dưa leo cụ thể trước khi tiến hành chuyển gen chính thức là điều thực sự cần thiết.

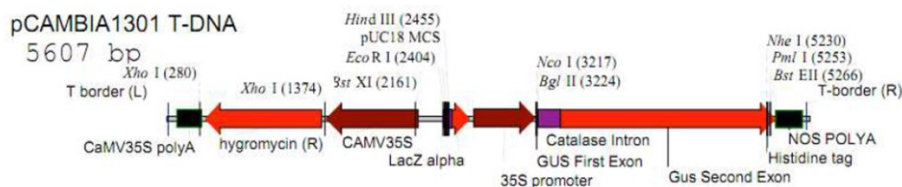
Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hóa một số nhân tố chính (nồng độ AS, thời gian đồng nuôi cây, nồng độ kháng sinh diệt khuẩn và sàng lọc mẫu chuyển gen) ảnh hưởng đến sự chuyển gen qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens* trên giống dưa leo nếp ta, làm tiền đề cho việc chuyển gen tạo ra giống dưa leo có khả năng kháng virus trong giai đoạn tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Lá mầm cây dưa leo nếp ta (cung cấp bởi Công ty TNHH Nông nghiệp Smile Seeds) *in vitro* 7 ngày tuổi được nuôi cấy tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 mang vector pCAMBIA 1301, chứa gen *GUS* và gen kháng hygromycin (Hình 1), được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc vector pCAMBIA 1301 (Singh *et al.*, 2014)

Kiểm tra sự hiện diện của vector pCAMBIA 1301 trong vi khuẩn *A. tumefaciens*

Để đảm bảo chất lượng của chủng vi khuẩn sau thời gian dài lưu trữ, sự hiện diện của vector pCAMBIA 1301 trong vi khuẩn được kiểm tra. Theo đó, khuẩn lạc đơn của chủng *A. tumefaciens* C58 được nuôi cấy qua đêm (16 giờ) trong 10 mL môi trường LB lỏng có bổ sung 50 mg/L rifamycin, 100 mg/L kanamycin trong điều kiện lắc 250 vòng/phút, ở nhiệt độ 28°C, trong tối. Sau đó, 1 mL dịch vi khuẩn tiếp tục được tăng sinh trong 29 mL môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh như trên và nuôi cấy trong điều kiện tương tự. Dịch vi khuẩn sau tăng sinh được ly tâm ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để thu sinh khối. DNA plasmid của *Agrobacterium* được tách chiết theo hướng dẫn sử dụng bộ Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo scientific). DNA plasmid thu nhận từ vi khuẩn được cắt với enzyme cắt hạn chế *XhoI* cho mục đích kiểm tra sự hiện diện của vector pCAMBIA 1301. Phản ứng cắt được thực hiện với thể tích 20µL bao gồm 2µL buffer; 0,5 µL enzyme; 10 µL DNA plasmid (100 ng/µL) và 7,5 µL nước cất khử trùng. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 2 giờ trước khi điện di, kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1,5%. Quan sát sự xuất hiện của băng DNA mục tiêu (1090 bp) trên gel bằng máy đọc gel (GelDoc-It², UVP, Mỹ).

Xác định nồng độ Acetosyringone và thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho chuyển nạp gen

Khuẩn lạc đơn của chủng *A. tumefaciens* C58 được nuôi cấy tăng sinh qua đêm trong 10 mL môi trường LB lỏng có bổ sung 50 mg/L rifamycin, 100 mg/L kanamycin, nhiệt độ 28°C, lắc 250 vòng/phút trong điều kiện tối. Sau đó, 1 mL dịch vi khuẩn tiếp tục được tăng sinh trong 29 mL môi trường LB có bổ sung kháng sinh như trên và nuôi cấy trong điều kiện tương tự. Mẫu vi khuẩn được tăng sinh cho đến khi đạt giá trị OD (600 nm) nằm trong khoảng từ 0,6 - 1, sau đó tiến hành ly tâm thu sinh khối vi khuẩn ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 15 phút. Sinh khối vi khuẩn thu được sau khi ly tâm được hòa vào 30 mL môi trường MS lỏng có bổ sung chất cảm ứng AS ở các nồng độ 0, 50, 100, 200 và 300 µM trong 15 phút.

Lá mầm dưa leo được cắt thành mảnh nhỏ (0,5 x 0,5) cm và ngâm vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) lỏng có bổ sung chất cảm ứng AS ở các nồng độ 0, 50, 100, 200 và 300 µM trong 15 phút. Sau đó, mẫu lá được chuyển sang ủ với vi khuẩn đã chuẩn bị ở trên trong 30 phút. Sau khi ủ, mô lá được chuyển sang đồng nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/L 2,4-D; 0,2 mg/L kinetin và AS ở các nồng độ tương ứng, trong tối trong 1, 2, 3, 4, 5 ngày.

Đánh giá hiệu quả chuyển nạp gen

Hiệu quả chuyển nạp gen được đánh giá thông qua biểu hiện tạm thời của gen *GUS*. Sau khi đồng nuôi cấy, mẫu được nhuộm GUS theo quy trình của Nguyễn Xuân Dũng và đồng tác giả (2014). Theo đó, mẫu được chuyển vào các ống eppendorf 1,5 ml có chứa thuốc nhuộm GUS, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 72 giờ. Sau đó, loại bỏ thuốc nhuộm, ngâm mẫu với cồn 70 độ cho đến khi mất hoàn toàn diệp lục. Theo dõi và ghi nhận số mẫu biểu hiện dương tính GUS (có màu xanh) dưới kính hiển vi soi nổi (Olympus, 40X). Đánh giá hiệu quả chuyển nạp gen thông qua tỷ lệ mẫu dương tính GUS.

Xác định nồng độ hygromycin thích hợp cho việc loại bỏ mẫu không chuyển gen

Để sàng lọc được mẫu chuyển gen, cần xác định được nồng độ hygromycin có khả năng gây chết toàn bộ mẫu không chuyển gen. Các mẫu chuyển gen do có gen kháng hygromycin được chuyển vào sẽ sống được trên môi trường có kháng sinh này. Theo đó, lá mầm dưa leo được cắt thành mảnh với kích thước 0,5 cm², sau đó cấy vào môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L kinetin và hygromycin ở các nồng độ 0, 5, 7, 10 và 15 mg/L. Theo dõi, xác định thời gian và nồng độ kháng sinh gây chết toàn bộ mẫu.

Xác định nồng độ kháng sinh cefotaxime thích hợp để loại vi khuẩn sau khi đồng nuôi cấy

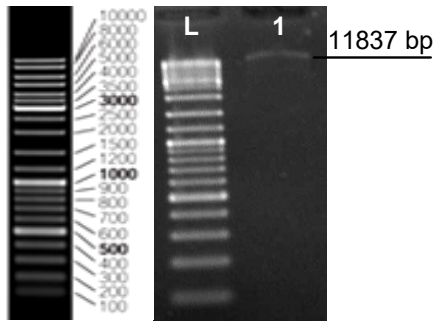
Mẫu lá sau khi đồng nuôi cấy được rửa ba lần với nước cất vô trùng và rửa tiếp một lần với môi trường MS lỏng có bổ sung cefotaxime ở các nồng độ 0, 100, 200, 300, 400, 500 và 700 mg/L. Sau đó, làm khô mẫu trên giấy thấm và tiến hành cấy mẫu lên môi trường MS có bổ sung 2 mg/L 2,4D; 0,5 mg/L kinetin và cefotaxime có nồng độ tương ứng. Đĩa nuôi cấy được đặt trong điều kiện ánh sáng 2500 ± 500 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường tương tự sau mỗi tuần nuôi cấy trong 4 tuần. Sau đó, mẫu được cấy sang môi trường phục hồi không bổ sung kháng sinh trong 2 tuần. Theo dõi khả năng khử khuẩn cũng như khả năng sống sót và phát triển của mô lá sau quá trình khử khuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự hiện diện của vector pCAMBIA 1301 trong vi khuẩn *A. tumefaciens*

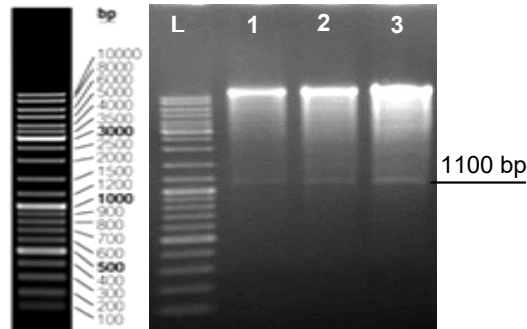
Kết quả tách chiết DNA plasmid từ chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 cho thấy có sự xuất hiện sản phẩm DNA ở vị trí trên 10.000 bp so với thang chuẩn (Hình 2), phù hợp với kích thước của vector pCAMBIA 1301 (11.837bp). Điều này cho thấy có sự hiện diện của vector pCAMBIA 1301 trong chủng vi khuẩn được kiểm tra.

Tuy nhiên, để đảm bảo sự hiện diện của cấu trúc (cassette) chuyển gen trong vector, phản ứng cắt vector ở vị trí cấu trúc chuyển gen với enzyme *Xho*I (vị trí cắt ở hai đầu gen kháng hygromycin) đã được thực hiện để kiểm tra.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm tách chiết DNA plasmid tách chiết từ chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 (L). Thang DNA (Thermo scientific), (1 - 3). Mẫu

Kết quả cắt vector đã thu được một phân đoạn DNA ở vị trí gần 1100 bp so với thang chuẩn (Hình 3), phù hợp với kích thước của đoạn gen hygromycin (1094 bp) trong cấu trúc chuyển gen. Sự hiện diện của gen kháng hygromycin cho thấy cấu trúc chuyển gen hiện diện trong vector. Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 được kiểm tra có mang vector pCAMBI 1301 chứa cấu trúc chuyển gen.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pCAMBIA 1301 tách chiết từ chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 bằng enzyme *Xho*I. (L). Thang (Thermo scientific), (1 - 3). MẪU.

Nồng độ Acetosyringone và thời gian đồng nuôi cấy thích hợp cho chuyển nạp gen

Sau thời gian đồng nuôi cấy, ở các nghiệm thức đều thu được các mẫu dương tính với GUS. Tỷ lệ mẫu dương tính GUS bắt đầu có sự khác biệt giữa các trường hợp có bổ sung AS ở thời điểm 4 ngày đồng nuôi cấy và đạt mức cao nhất ở nồng độ 100 µM, sau đó duy trì không đổi ở nồng độ 200 và 300 µM. Ở thời điểm 5 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mẫu dương tính GUS vẫn duy trì sự khác biệt giữa các trường hợp có bổ sung AS và đạt mức cao nhất ở nồng độ 100 µM, sau đó giảm ở nồng độ 200 và 300 µM (Bảng 1). Các mẫu chuyển gen thành công biểu hiện màu xanh chàm với 3 mức khác nhau: biểu hiện dạng khảm, biểu hiện thành mảng và biểu hiện trên toàn bộ mẫu (Hình 4).

Bảng 1. Tỷ lệ mẫu lá mầm dừa leo biểu hiện dương tính GUS ở các nồng độ AS khác nhau theo thời gian đồng nuôi cấy

Nồng độ AS	Tỷ lệ dương tính GUS (%)				
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày
0	13,33 ^b	13,33 ^b	20,00 ^a	13,33 ^b	20,00 ^c
50	33,33 ^{ab}	26,67 ^{ab}	40,00 ^a	20,00 ^b	40,00 ^b
100	40,00 ^a	33,33 ^{ab}	46,67 ^a	60,00 ^a	60,00 ^a
200	53,33 ^a	46,67 ^a	60,00 ^a	66,67 ^a	40,00 ^b
300	40,00 ^a	33,33 ^{ab}	53,33 ^a	66,67 ^a	40,00 ^b

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.



Hình 4. Mức độ biểu hiện gen GUS của mẫu lá mầm dưa leo chuyển gen

(A). Đối chứng không chuyển gen; (B). Biểu hiện dạng khảm; (C, D). Biểu hiện thành mảng; (E). Biểu hiện trên toàn mẫu.

Acetosyringone đã được chứng minh có tác dụng kích thích sự phiên mã các gen *vir* của tế bào vi khuẩn *Agrobacterium*. Trong nghiên cứu này, AS ở nồng độ 100 - 300 μM đã giúp tạo ra hiệu quả chuyển gen cao nhất trong thời gian 4 ngày đồng nuôi cấy. Tuy nhiên, ở góc độ hiệu quả sử dụng, nồng độ AS 100 μM đã được chọn là nồng độ thích hợp nhất cho chuyển gen ở lá mầm cây dưa leo. Các nghiên cứu chuyển gen trên cây dưa leo đã thực hiện bởi Thiruvengadam và đồng tác giả (2013), Nanasato và đồng tác giả (2013) cũng cho thấy nồng độ AS thích hợp là 200 μM với số ngày đồng nuôi cấy từ 3 - 4 ngày.

Nồng độ hygromycin thích hợp để loại bỏ mẫu không chuyển gen

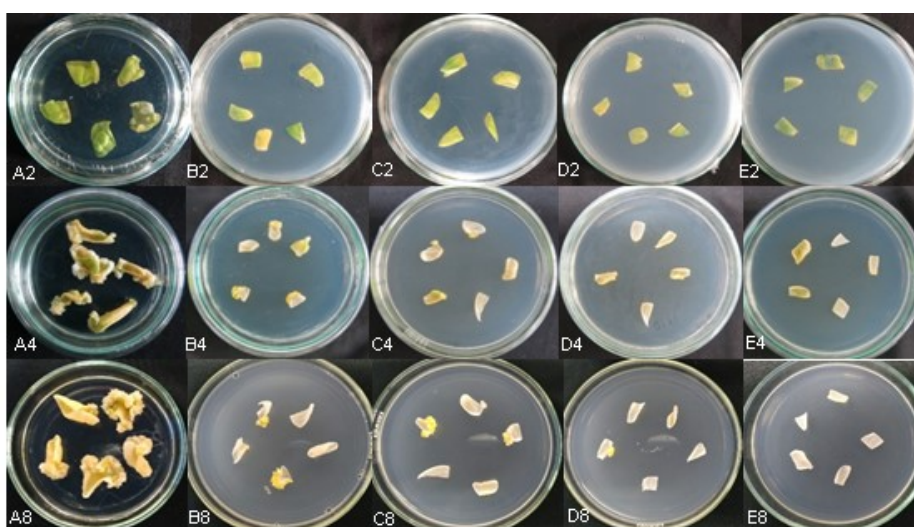
Sau 2 tuần nuôi cấy, ở cả hai trường hợp có bổ sung hygromycin và đối chứng (không bổ sung hygromycin) đều không có mẫu chết. Tuy nhiên, mẫu lá ở nghiệm thức đối chứng có sự tạo mô sẹo trong khi mẫu lá ở nghiệm thức bổ sung hygromycin bắt đầu hóa vàng. Sau 4 tuần nuôi cấy, mẫu lá đối chứng tiếp tục tăng sinh mô sẹo nhưng một số mẫu ở các nghiệm thức xử lý hygromycin bị mất diệp lục tố và chết. Tỷ lệ mẫu chết tăng tỷ lệ thuận với nồng độ hygromycin. Đến thời điểm 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu chết tiếp tục gia tăng trên tất cả các trường hợp có hygromycin và đạt mức $\geq 96,67\%$ ở nồng độ 15 mg/L (Bảng 2, Hình 4).

Bảng 2. Tỷ lệ chết của mẫu lá mầm dưa leo trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L kinetin và hygromycin theo thời gian nuôi cấy

Nồng độ hygromycin (mg/L)	Tỷ lệ chết theo thời gian (%)		
	2 tuần	4 tuần	8 tuần
0	0,00 ^a	0,00 ^c	0,00 ^c
5	0,00 ^a	43,33 ^b	73,33 ^b
7	0,00 ^a	53,33 ^b	76,67 ^{ab}
10	0,00 ^a	66,67 ^a	90,00 ^{ab}
15	0,00 ^a	73,33 ^a	96,67 ^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Như vậy, hygromycin ở nồng độ 15 mg/L thích hợp nhất cho sàng lọc mẫu chuyển gen. Phù hợp với kết quả này, Abookazemi và đồng tác giả (2017) cũng đã sử dụng hygromycin ở nồng độ 15 mg/L cho mục đích sàng lọc mẫu chuyển gen.



Hình 5. Lá mầm cây dưa leo nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4-D; 0,5 mg/L kinetin và hygromycin ở các nồng độ khác nhau sau 2, 4, 8 tuần nuôi cấy. (A, B, C, D, E). 0, 5, 7, 10, 15 mg/L hygromycin

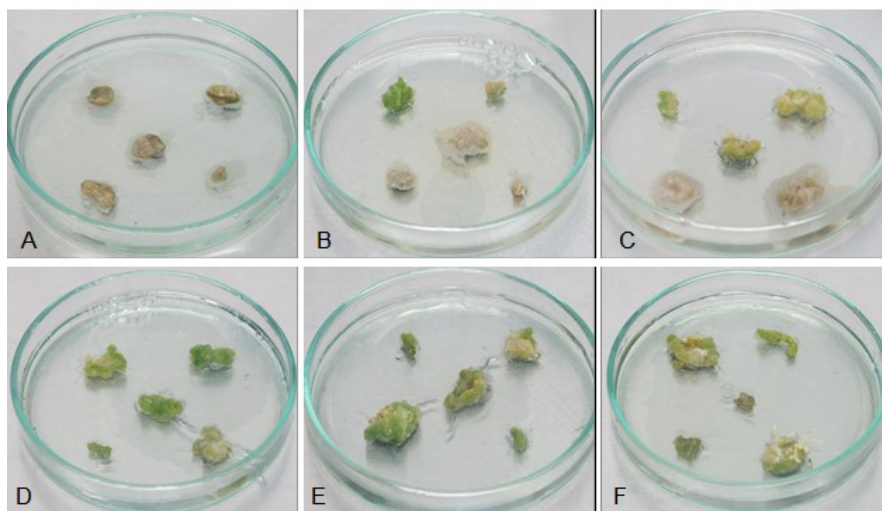
Nồng độ kháng sinh cefotaxime thích hợp để loại vi khuẩn sau khi đồng nuôi cấy

Sau 6 tuần nuôi cấy (4 tuần trên môi trường có bổ sung cefotaxime và 2 tuần trên môi trường không có cefotaxime), tất cả các mẫu ở nghiệm thức đối chứng không bổ sung kháng sinh đều nhiễm khuẩn và chết. Các mẫu được khử khuẩn với kháng sinh có tỷ lệ sống và sạch khuẩn thay đổi phụ thuộc vào nồng độ kháng sinh. Cụ thể, khi tăng nồng độ kháng sinh, tỷ lệ mẫu sống và sạch khuẩn cũng tăng lên và đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 500 mg/L cefotaxime. Việc nhiễm khuẩn cũng ảnh hưởng đến sức sống của mẫu, các mẫu nhiễm khuẩn sau thời gian nuôi cấy bắt đầu hóa vàng và chết, chỉ các mẫu sạch khuẩn mới sống sót, tạo sẹo và phát triển (Bảng 3, Hình 5).

Bảng 3. Tỷ lệ mẫu lá mầm dưa leo sống và sạch khuẩn sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4D, 0,5 mg/L kinetin và cefotaxime ở các nồng độ khác nhau

Nồng độ cefotaxime (mg/L)	Tỷ lệ mẫu sống và sạch khuẩn (%)
0	0 ^e
100	0 ^e
200	26,67 ^d
300	68,89 ^c
400	80,00 ^{bc}
500	95,56 ^a
700	88,89 ^{ab}

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.



Hình 6. Mẫu lá mầm dưa leo nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L 2,4D, 0,5 mg/L kinetin và cefotaxime ở các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy. (A, B, C, D, -F). 0, 100, 200, 300, 400, 500, 700 mg/L cefotaxime

Kết quả này cho thấy cefotaxime ở nồng độ 500 mg/L thích hợp nhất cho việc khử khuẩn trên mẫu lá mầm dưa leo sau khi đồng nuôi cấy. Trong một nghiên cứu khác, Baskaran và đồng tác giả (2016) cũng cho thấy cefotaxime ở nồng độ 300 mg/L phù hợp để loại bỏ vi khuẩn sau đồng nuôi cấy ở dưa leo với thời gian khử khuẩn kéo dài đến 6 tuần thay vì 4 tuần như trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, việc kéo dài thời gian nuôi cấy trên môi trường có cefotaxime có thể làm giảm sức sống của mẫu sau khi lây nhiễm.

KẾT LUẬN

Đã xác định được các điều kiện thích hợp cho việc chuyển gen vào lá mầm của giống dưa leo nếp ta qua trung gian vi khuẩn *A. tumefaciens* C58. Trong đó, mẫu lá mầm được lây nhiễm và đồng nuôi cấy với vi khuẩn 4 ngày trên môi trường có bổ sung 100 µM AS; mẫu chuyển gen được khử khuẩn với 500mg/l cefotaxime và sàng lọc với 15 mg/L hygromycine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akbar A, Ahmad Z, Begum F, Ubairah, Raees N (2015). Varietal Reaction of Cucumber against *Cucumber mosaic virus*. *Ame J Plant Sci* 6: 833-838.
- Baskaran P, Soós V, Balázs E, VanStaden J (2016). Shoot apical meristem injection: A novel and efficient method to obtain transformed cucumber plants. *South Afr J Bot* 103: 210-215.
- Chee PP (1990). Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 9: 245-248.
- Chee PP and Slightom JL (1991). Transfer and expression of *Cucumber mosaic virus* coat protein gene in the genome of *Cucumis sativus*. *J Amer Soc Hort Sci* 116(6): 1098-1102.
- Dũng NX, Xô DH, Hà CH (2014). Tối ưu hóa sự chuyển nạp gen ở lan *Dendrobium Sonia* qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Sinh học* 36(1se): 257-265.
- Singh HR, Bhattacharya N, Agarwala N, Bhagawati P, Deka M, Das S (2014). Pelagia Research Library Exogenous gene transfer in Assam tea [*Camellia assamica* (Masters)] by *Agrobacterium*-mediated transformation using somatic embryo. *Eur J Exp Biol* 4(3): 166-175.
- Abookazemi K, Javaran MJ, Mohebodini M, Vaseghi A (2017). Transfer of human proinsulin gene into cucumber (*Cucumis sativus* L.) via *Agrobacterium* method. *Genetika* 49(2): 717-728.
- Murashige T, Skoog F (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nanasato Y, Konagaya K, Okuzaki A, Tsuda M, Tabei Y (2013). Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnol Rep* 7: 267-276.
- Nishibayashi S., Kaneko H, Hayakawa T (1996). Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Rep* 15: 809-814.
- Nyaboga E, Tripathi JN, Manoharan R, Tripathi L (2014). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in plant science* 5(463): 1-14.
- Sarmento GG, Alpert K, Tang FA, Punja ZK (1992). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in pickling cucumber. *Plant cell Tiss Org Cult* 31(3): 185-193.
- Thiruvengadam M, Jeyakumar J, Kamaraj M, Chung IM, Kim JJ (2013). Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in gherkin (*Cucumis anguria* L.). *Plant Omics* 6(3): 231-239.

OPTIMIZATION OF FACTORS AFFECTING *Agrobacterium*-MEDIATED GENETIC TRANSFORMATION IN CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

Phan Thuy Quyen, Nguyen Thi Thanh Thao, Phan Le Tram Anh, Huynh Nguyen Minh Nghia, Duong Hoa Xo, Nguyen Xuan Dung*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) is a popular vegetable plant in Vietnam. One of the major problems of cucumber production is viral disease leading to reduced productivity and yields. Therefore, virus-resistant cucumber varieties are very important to the production. This paper presents the results of optimization of factors effecting the genetic transformation, which is the first step of the strategy to create virus-resistant cucumber using genetic transformation technology. The cotyledon was used as a material for gene receiving from *Agrobacterium tumefaciens* carrying the pCAMBIA 1301 vector. The primary factors influencing the transformed efficiency, including acetosyringone (AS) concentration, the co-cultivation time, antibiotic concentrations for bactericidal and screening of putative transformants were surveyed. Results showed that AS at a concentration of 100 μ M and 4 days of co-cultivation suitable for the genetic transformation. Cefotaxime at a concentration of 500 mg/L and hygromycine at a concentration of 15 mg/L are suitable for eliminating bacteria from cotyledons and screening putative transformants, respectively.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Cucumis sativus* L., genetic transformation, *GUS*.

* Author for correspondence: Tel: +84 903800438; Email: nguyensexuanandung294@gmail.com