

BÀI TỔNG QUAN

MỘT SỐ HIỆN TƯỢNG BẤT THƯỜNG TRONG VI NHÂN GIỐNG THỰC VẬT VÀ GIẢI PHÁP KHẮC PHỤC

Hà Thị Mỹ Ngân^{1,2}, Hoàng Thanh Tùng², Bùi Văn Lệ¹, Dương Tấn Nhựt^{2,✉}

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 27.6.2019

Ngày nhận đăng: 03.8.2019

TÓM TẮT

Nuôi cấy mô, tế bào và cơ quan thực vật hiện nay đã trở thành một phương pháp nhân giống chuẩn và phổ biến đối với nhiều loại cây trồng như: cây cảnh, cây dược liệu, cây ăn trái và rau xanh. Ưu điểm của phương pháp này là tạo ra được một số lượng lớn cây giống đồng nhất về mặt di truyền, kiểm soát được các yếu tố gây bệnh cho cây, tạo ra các cây giống sạch bệnh, là công cụ để bảo tồn, phát triển nguồn gen và nghiên cứu những đặc tính sinh lý của thực vật. Bên cạnh những ưu điểm thì phương pháp này vẫn tồn tại những hạn chế chưa khắc phục được như hình thái, sinh lý và cấu trúc giải phẫu bất thường, cây bị thoái hóa, dị dạng, khí không mất chức năng... Những bất thường này tác động rất lớn lên hệ số nhân giống cũng như sự sinh trưởng và phát triển của thực vật ở giai đoạn vườn ươm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro* như hệ thống nuôi cấy kín, thành phần và hàm lượng các chất dinh dưỡng, chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy, ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, tuổi và nguồn gốc mẫu cây... là những nguyên nhân chủ yếu gây ra những bất thường này. Do đó, việc cải tiến và tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy đồng thời nâng cao chất lượng cây giống vẫn luôn là một trong những mục tiêu chính của vi nhân giống thương mại. Trong bài tổng quan này chúng tôi tập trung phân tích một số hiện tượng bất thường hay gặp trong vi nhân giống thực vật như thủy tinh thể; hiện tượng vàng và rụng lá; sự nhiễm vi sinh vật; hoại tử chồi đỉnh, rễ và mẫu mô nuôi cấy; sự hóa nâu mẫu, môi trường nuôi cấy và một số hạn chế khác. Bên cạnh đó, đề xuất các giải pháp hiệu quả để khắc phục những hiện tượng bất thường này.

Từ khóa: Hóa nâu, hoại tử mẫu cấy, nhiễm vi sinh vật, nuôi cấy *in vitro*, rụng lá, thủy tinh thể.

GIỚI THIỆU

Thuật ngữ nhân giống vô tính thực vật thường đề cập đến các phương pháp sinh sản vô tính từ các mô hoặc cơ quan sinh dưỡng để bảo tồn các kiểu gen mong muốn hoặc các giống thực vật tốt được chọn lựa trong nông nghiệp và lâm nghiệp. Theo truyền thống, phương pháp này đạt được bằng cách sử dụng các đoạn cắt (giâm hom), chiết cành, tách cây, ghép.... Tuy nhiên, đối với nhiều loài thực vật, đặc biệt là hoa lan và các loài cây thân gỗ thì những

phương pháp này rất khó thực hiện hoặc mất rất nhiều thời gian (Bhojwani, Dantu, 2013). Nhiều năm qua, khi diện tích sản xuất được mở rộng, nhu cầu về giống cũng tăng theo và phương pháp nhân giống cũng không ngừng cải tiến thì những phương pháp truyền thống không thể đáp ứng kịp nhu cầu về giống, mặt khác còn mang nguy cơ làm lây lan bệnh hại và làm thoái hóa giống.

Vào đầu những năm 1960, khi tính toàn năng của tế bào thực vật được thiết lập và một

số lượng lớn thực vật đã được tái tạo bắt đầu từ những mảnh nhỏ của các mô sinh dưỡng ở điều kiện vô trùng thì nuôi cấy mô được đã dự đoán là một phương pháp thay thế tiềm năng để nhân giống thực vật một cách nhanh chóng. Nhân giống vô tính thực vật *in vitro* hay còn được gọi là vi nhân giống đã tạo nên một cuộc cách mạng trong khoa học công nghệ và đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới để nhân giống các loại cây cảnh, cây ăn quả và cây rừng (George *et al.*, 2008; Yam, Arditti, 2009).

Phương pháp vi nhân giống tỏ ra hiệu quả trong sản xuất số lượng cây giống sạch bệnh với tốc độ nhanh, chất lượng đồng đều và đồng nhất về mặt di truyền bởi có những lợi thế vượt trội so với các phương pháp nhân giống vô tính thông thường: (a) trong một thời gian và không gian tương đối, một số lượng lớn thực vật có thể được sản xuất bắt đầu từ một cá thể riêng lẻ, (b) điều kiện nuôi cấy vô trùng đảm bảo sạch bệnh, (c) tỷ lệ nhân giống *in vitro* thành công thường cao hơn nhiều so với phương pháp nhân giống *ex vitro* vì trong quá trình nuôi cấy có thể điều chỉnh nồng độ các chất dinh dưỡng và chất điều hòa sinh trưởng, nhiệt độ và ánh sáng một cách tối ưu và hiệu quả, (d) có thể áp dụng cho nhiều kiểu gen mà ở phương pháp truyền thống trong khó hoặc không thể thực hiện, (e) có thể tiến hành quanh năm và không phụ thuộc thời tiết hay mùa vụ, (f) nếu sử dụng thực vật từ những nguồn sạch virus, chúng sẽ được bảo vệ khỏi sự tái nhiễm và các cây con vi nhân giống có thể được xuất khẩu với ít vấn đề về kiểm dịch, (g) thực vật không bị phá hoại bởi vi sinh vật, (h) thực vật sản xuất trong ống nghiệm có thể được hoạch định tốt hơn bằng cách lưu trữ các nuôi cấy ở nhiệt độ thấp trong thời điểm nhu cầu thị trường thấp và (i) cây trồng vi nhân giống có thể có được những đặc điểm mong muốn mới chẳng hạn như thay đổi màu sắc hoa của cây cảnh và tăng số lượng ngó (cây con) ở cây dâu tây (Bhojwani, Dantu, 2013).

Bên cạnh rất nhiều lợi ích mang lại thì phương pháp này với những đặc trưng như điều kiện nuôi cấy kín, nhiệt độ, độ ẩm cao trong bình nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng... vẫn còn có những hạn chế chưa khắc phục được như

hiện tượng thủy tinh thể; vàng, rụng lá; sự nhiễm môi trường nuôi cấy; hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy; hoại tử mẫu cấy và hiện tượng biến dị soma.

Hiện tượng thủy tinh thể

Các chồi vi nhân giống được nuôi cấy dưới điều kiện độ ẩm cao và dị dưỡng bên trong các bình nuôi cấy kín thường thể hiện các bất thường về hình thái, sinh lý và hoạt động trao đổi chất. Những bất thường về hình thái giải phẫu và sinh lý được miêu tả bằng rất nhiều thuật ngữ: hiện tượng thủy tinh thể hóa, sự tích lũy nước quá mức, sự mọng nước hay hiện tượng trong vắt như thủy tinh (Hình 1A, B, C). Thuật ngữ “vitrification” là thuật ngữ chính đề cập đến một quá trình sinh lý chứ không phải một quá trình sinh học, đó là thuật ngữ được dùng nhiều nhất để diễn tả sự biến đổi của mẫu dẫn đến hiện tượng thủy tinh thể (Kharrazi *et al.*, 2011).

Những bất thường liên quan đến hiện tượng “thủy tinh thể” là sự biệt hóa và hóa gỗ kém của mô, các tế bào trong những lá bị thủy tinh thể được bao quanh bởi những vách mỏng và chứa nguyên sinh chất nghèo dinh dưỡng với không bào lớn, hàm lượng lục lạp thấp. Kiểm tra qua kính hiển vi phát hiện ra rằng, trong nhiều trường hợp những lá bị mọng nước có thể thiếu mô giậu hay chỉ chứa một lớp mô giậu mỏng. Ở cây táo, những cơ quan bị dị tật đã phát triển vượt mức, sự gia tăng thể tích của lá bị khiếm khuyết gấp năm lần so với lá bình thường. Ở cây hoa cẩm chướng, sự gia tăng không gian nội màng đồng nghĩa với việc gia tăng nước trong nguyên sinh chất, khi nuôi cấy trong môi trường lỏng lục lạp chứa nhiều hạt tinh bột lớn. Đối với cây mận, cây hoa cẩm chướng và cây mâm xôi, hàm lượng lục lạp trong lá bị thủy tinh thể thấp hơn trong lá bình thường (Ziv, 1991). Đối với một vài loài cây, sự thủy tinh thể lá kéo theo sự khiếm khuyết của mô biểu bì. Sự khiếm khuyết trong quá trình hình thành của lớp lông sừng trên những lá bị thủy tinh thể đã được nghiên cứu cả về số lượng và chất lượng. Lớp lông sừng của lá cây bị thủy tinh thể mỏng manh hơn so với những lá bình thường. Thủy tinh thể còn

làm cho khả năng định hướng của những vi sợi cellulose trên vách tế bào bảo vệ lỗ khí giảm đi nên khả năng đóng, mở khí khổng của chúng kém đi. Những khí khổng dị thường cho thấy có những vết thương xung quanh lỗ khí và chúng không đáp ứng được với stress nước, abscisic acid (ABA) cũng như nồng độ CO₂ cao (Gaspar *et al.*, 2002). Sự mất nước của chồi là một trong những vấn đề nghiêm trọng nhất trong vi nhân giống ở quy mô thương mại bởi vì những chồi bất thường này thể hiện sự đáp ứng của rễ kém và tỷ lệ sống thấp. Những triệu chứng bất thường sẽ không giống nhau ở tất cả các loài cây và được biểu hiện ở nhiều mức độ của sự phát sinh hình thái dị thường, mức độ tích lũy nước phụ thuộc vào loài hoặc giống cây trồng, tính chất vật lý của môi trường, loại bình nuôi cấy, loại và hàm lượng của các tác nhân làm đông, nồng độ và loại cytokinin (Gaspar *et al.*, 1987).

Sự sản sinh quá mức ethylene bởi mô thực vật, tác động của photon quang hợp, nồng độ CO₂, độ ẩm cao bên trong bình nuôi cấy ($\geq 95\%$), nhiệt độ không khí... làm cho cây không tăng trưởng hoàn chỉnh được, gây dị dạng cho thân và đặc biệt là gây ra hiện tượng thủy tinh thể. Ethylene (C₂H₄) là một hormone thực vật duy nhất ở dạng khí, tác động đến sự sinh trưởng, sự biệt hóa và sự già hóa của thực vật ở nồng độ rất thấp 0,01 $\mu\text{L/L}$ (Chang, 2016). Cùng với việc nghiên cứu các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cổ điển như cytokinin và auxin thì tốc độ sản sinh hormone thực vật dạng khí như ethylene đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến sự biệt hóa, sự tăng sinh và sinh trưởng của các mẫu tế bào và mô nuôi cấy *in vitro*. Các mô thực vật nuôi cấy *in vitro* thường sinh ra ethylene do các tổn thương của mẫu cây trong quá trình cấy chuyển cùng với rất nhiều điều kiện stress khác nhau (Kumar *et al.*, 1998). Hàm lượng ethylene thay đổi phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng của mẫu cây, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng và kiểu giống. Đối với loài cẩm chướng ‘Ceris Royalette’ khi được bổ sung 5×10^{-6} M amino oxyacetic acid (AOA), một chất ức chế sự tạo thành ethylene vào môi trường đã làm giảm số

lá bị thủy tinh thể, tăng hàm lượng chlorophyll và lớp lông sừng của lá khi nuôi cấy trên môi trường lỏng. Nuôi cấy thoáng khí bằng cách đục một lỗ trong nắp nhựa và bao phủ nó bằng một màng micropore (kích thước lỗ màng 0,20 μm) cũng giúp giảm sự tích tụ ethylene trong bình nuôi cấy và do đó làm giảm hiện tượng thủy tinh thể (Bhojwani, Dantu, 2013).

Hai thành phần quan trọng của điều kiện nuôi cấy có liên hệ trực tiếp đến sự phát sinh hình thái bất thường và sự phát triển của cây đó là trạng thái hóa học và lý học của môi trường. Agar có ảnh hưởng đến thể nước, độ ẩm, nước có sẵn và những chất hòa tan có trong môi trường; đối với nuôi cấy lỏng, hiện tượng thủy tinh thể được ghi nhận ở một vài loài thậm chí khi những chồi không bị ngập chìm trong nuôi cấy lác và được tiếp xúc với không khí trong bình khi nằm trên một số giá thể (như cầu giấy lọc hay giá thể khác). Sự gia tăng hàm lượng agar giúp giảm được hiện tượng thủy tinh thể nhưng lại cho tỉ lệ nhân giống thấp hơn. Khả năng đáp ứng của những mẫu nuôi cấy đối với trạng thái agar hay các chất tạo gel khác phụ thuộc vào nồng độ chất tạo gel và loài cây được nuôi cấy. Đối với cây táo, khi sử dụng giá thể gelrite chứa nhiều K⁺ và Mg²⁺ đã làm gia tăng hiện tượng thủy tinh thể (García-González *et al.*, 2010). Việc sử dụng chất làm khô để làm giảm độ ẩm tương đối của không khí bên trong các bình nuôi cấy sẽ giúp gia tăng lớp lông sừng ở lá cây cẩm chướng và cây cải bắp; sử dụng lớp lanolin phủ trên lớp agar làm giảm độ ẩm tương đối trong môi trường nuôi cấy đến 35%. Điều này cũng có thể đạt được bằng cách đặt bình nuôi cấy trên đĩa lạnh, vì khi sử dụng đĩa lạnh hơi nước sẽ ngưng tụ trên môi trường agar, do đó giảm được hiện tượng thủy tinh thể (Ziv, 1991).

Ngoài trạng thái vật lý của môi trường, nhiều thành phần hòa tan cũng có thể ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của cây. Sucrose là carbohydrate chính được cung cấp trong nuôi cấy *in vitro*. Đối với cây cẩm chướng, chồi đỉnh có số lá bị thủy tinh thể ít hơn khi lượng đường là 3%, thành phần sucrose nếu được thay thế bởi dung dịch mannitol cùng nồng độ thì lại cảm ứng sự mọng nước của lá.

Hiện tượng này xuất hiện theo mức độ khác nhau tùy từng loài cây và đáp ứng của chúng đối với sự gia tăng hàm lượng carbohydrate trong môi trường. Đối với cây *Philodendron*, việc bổ sung thêm mannitol làm gia tăng hàm lượng chlorophyll trong lá nhưng không cải thiện được sự sinh trưởng. Đối với cây hạnh nhân và cây ô liu, rất nhiều loại carbohydrate được thử nghiệm trong đó 4,5% fructose làm giảm đáng kể hiện tượng thủy tinh thể (Bahmani *et al.*, 2009). Môi trường giàu khoáng như môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) cho thấy có khả năng làm gia tăng hiện tượng thủy tinh thể ở một số loài cây. Dùng môi trường có hàm lượng khoáng thấp hơn hay chỉ bằng phân nửa khoáng MS sẽ cải thiện sự phát triển của cây cam chanh và cây dưa leo; giảm hàm lượng NH_4^+ trong môi trường làm gia tăng sự hóa gỗ và giảm hiện tượng thủy tinh thể ở cây liễu, cây mận, cây xương rồng. Gia tăng hàm lượng Ca^{2+} đã được chứng minh giúp giảm được hiện tượng thủy tinh thể ở cả loài cây thân thảo và cây thân gỗ, tuy nhiên, việc gia tăng nồng độ Ca^{2+} có thể cản trở sự hóa gỗ thông qua hoạt động của enzyme peroxidase và sẽ cảm ứng hình thành mô sẹo (Mayor *et al.*, 2003). Gần đây, các nghiên cứu đã cho thấy việc sử dụng nano bạc (AgNPs) cũng giúp hạn chế hiện tượng thủy tinh thể trong vi nhân giống một số loài cây trồng. AgNPs hạn chế hiện tượng thủy tinh thể trong vi nhân giống cây dâu tây (Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2014), cây hoa cúc (Luong Thien Nghia *et al.*, 2017), cây hoa đồng tiền (Hà Thị Mỹ Ngân *et al.*, 2019) đã được ghi nhận.

Quá trình tái sinh chồi *in vitro* và nhân giống đòi hỏi cung cấp chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy. Những chất điều hòa sinh trưởng thường được dùng là các chất thuộc nhóm auxin và cytokinin riêng rẽ hay dùng chung với tỉ lệ rất đa dạng phụ thuộc vào loài cây và loại mô dùng để nuôi cấy. Nghiên cứu trên cây cam chanh cho thấy benzyl amino purine (BA), kinetin (KIN) đã cảm ứng hiện tượng thủy tinh thể khi sử dụng ở nồng độ cao do gia tăng sự phân bào và thay đổi các quá trình biến dưỡng *in vitro*, đây là lý do vì sao mà

nhiều loài cây lại đáp ứng một cách khác nhau đối với các hàm lượng khác nhau của cytokinin. Mối liên hệ giữa auxin với hiện tượng thủy tinh thể ít được nghiên cứu và trong hầu hết các trường hợp, ảnh hưởng của chúng đều có mối liên hệ với cytokinin, sự mất cân bằng giữa auxin và cytokinin cũng có thể cảm ứng hiện tượng thủy tinh thể (Kharrazi *et al.*, 2011).

Cây nuôi cấy *in vitro* được cung cấp nguồn carbohydrate và vì thế chúng sống theo hình thức dị dưỡng. Tuy nhiên, chất lượng ánh sáng, thời gian và cường độ chiếu sáng cũng có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát sinh hình thái từ đó có vai trò trong quang hợp. Ánh sáng kiểm soát kích thước của lá và thân cũng như con đường phát sinh hình thái, vì vậy có ảnh hưởng tới việc hình thành các sắc tố và hiện tượng thủy tinh thể. Đối với cây phong lữ, cây hoa hồng và bạch diệp lá lớn trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* sự phát triển hình thái dị thường được cho là do cường độ ánh sáng thấp trong phòng nuôi cấy. Tăng cường độ chiếu sáng và làm giàu CO_2 trong phòng nuôi cấy có thể cải thiện được hiệu quả quang hợp. Sự sinh trưởng của một số loài thực vật được đẩy mạnh một cách rõ khi được đặt dưới điều kiện cường độ ánh sáng cao cùng với sự làm gia tăng lượng CO_2 trong không khí bao quanh phòng nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu về vai trò của cường độ ánh sáng cho thấy nó có liên quan đến giai đoạn cuối của giai đoạn thích nghi của cây (Da Silva *et al.*, 2013)

Các bằng chứng nêu trên về những bất thường trong cấu trúc của cây bị thủy tinh thể, cho thấy nhiều nhân tố và phức hợp trong môi trường nuôi cấy cũng như những mối quan hệ bên trong của nhiều con đường biến dưỡng đã cảm ứng sự dị thường trong cấu trúc và chức năng của lá. Hậu quả là giảm khả năng sống sót khi chuyển ra ngoài bầu đất, chúng đòi hỏi phải trải qua bước thích nghi kéo dài trong điều kiện *ex vitro* và kể cả việc tạo lá mới thay thế những lá cũ.

Hiện tượng vàng và rụng lá

Thực vật vi nhân giống thường xuyên chịu ảnh hưởng bởi những stress sinh học và phi sinh

học gây tác động xấu đến sự sinh trưởng, phát triển, sinh sản và giảm tỷ lệ sống khi chuyển ra vườn ươm từ đó làm giảm năng suất cây trồng. Bên cạnh hiện tượng thủy tinh thể, vi nhân giống một số loài thực vật còn gặp phải hiện tượng vàng và rụng lá (Hình 1D).

Sự rụng cơ quan là thuật ngữ được sử dụng để mô tả quá trình mà các bộ phận của thực vật bị tách rời, nó thường xảy ra ở các cơ quan như lá, hoa, quả hoặc hạt. Tiến trình này chịu tác động cả về thời gian lẫn không gian, ví dụ nếu thụ phấn thất bại thì toàn bộ hoa có thể bị rụng trong khi thụ phấn đạt hiệu quả sẽ xúc tác sự rụng của tơ bao phấn, cánh hoa và đài hoa. Những quan sát như vậy cho chúng ta biết rằng các dấu hiệu dẫn đến sự rụng một cơ quan nào đó phải được phối hợp chặt chẽ với các tín hiệu dẫn đến sự xáo trộn tại một số địa điểm trong khi kích hoạt quá trình này ở những nơi khác (Roberts *et al.*, 2002). Kết quả là sự tách rời của các cơ quan thường liên quan đến giai đoạn phát triển của cơ quan bị mất. Lá rụng ở các loài thực vật rụng lá cũng được liên kết với sự suy giảm của quang chu kỳ; tuy nhiên, hiện tượng này có thể xảy ra sớm bởi sự tác động của các yếu tố môi trường như hạn hán, mặn, thiếu chất dinh dưỡng hoặc sự tấn công của mầm bệnh. Trong tự nhiên, đặc biệt là trong nông nghiệp và khoa học cây trồng quá trình này cũng có vai trò hữu ích. Nếu như sự rụng sớm của hoa hoặc trái non do những tác động của môi trường có thể gây ra hậu quả nghiêm trọng đến năng suất thì sự rụng trái cây trưởng thành, thông qua việc áp dụng các hóa chất kích thích quá trình rụng như ethylene hay ethephone có thể tạo điều kiện cho việc thu hoạch sớm (Taylor, Whitelaw, 2001; Li *et al.*, 2006).

Trong vi nhân giống thực vật, rụng cơ quan đặc biệt là rụng lá ở các chồi nuôi cấy thường liên quan tới tác động của khí ethylene và auxin. Các tế bào chịu tác động dẫn đến khiếm khuyết trong sự hóa gỗ, trong điều kiện bất lợi sẽ kích thích sự tạo nên các enzyme phân hủy thành tế bào của tầng rời, làm tầng rời nhanh chóng xuất hiện. Tầng rời (2 - 3 lớp tế bào nối liền cơ quan thực vật với thân chính) gồm một số tế bào nhu

mô đặc biệt có đặc trưng là tế bào bé hơn, tròn, chất nguyên sinh đặc hơn, gian bào bé, không hóa suberin và lignin, hệ thống dẫn qua vùng này rất mỏng manh. Các cấu trúc trên làm cho vùng này yếu hơn các vùng tế bào khác. Khi có những điều kiện cảm ứng sự rụng thì tầng rời xuất hiện nhanh chóng. Các biến đổi xảy ra trong vùng tế bào này cũng rất mạnh đặc biệt là sự huy động các enzyme thủy phân như enzyme pectinase và cellulase sẽ phân huỷ thành tế bào làm các tế bào trở nên rời rạc, không dính nhau và lá chỉ còn giữ lại được bằng bó mạch mỏng manh và dễ dàng rụng (Phan, Letouze, 1983; Ngan *et al.*, 2020).

Ethylene là yếu tố quan trọng liên quan đến sự rụng lá, mặc dù nó không phải là yếu tố duy nhất điều khiển sự rụng cơ quan thực vật trong nhiều trường hợp, và trong một số trường hợp có thể thậm chí không quan trọng. Tuy nhiên trong vi nhân giống với điều kiện nuôi cấy trong bình kín, độ ẩm cao cùng với hình thức sinh dưỡng dị dưỡng của thực vật nuôi cấy thì sự tích tụ khí ethylene lại trở thành một trong những yếu tố chính điều khiển sự rụng lá (Agustí *et al.*, 2009). Tiến trình rụng lá đã được nghiên cứu rộng rãi và nhiều phân tích đã được thực hiện bằng cách cho các mô hoặc các mẫu cây tiếp xúc với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như ethylene hoặc auxin trong thời gian dài từ vài giờ đến vài ngày (González-Carranza *et al.*, 2002). Thông thường, những cây nuôi cấy trong môi trường ở độ ẩm cao rất nhạy cảm với tác động của ethylene và trong một số nghiên cứu cho thấy auxin nội sinh hoặc ngoại sinh từ môi trường nuôi cấy có khả năng ức chế sự rụng lá. Ở giai đoạn I sự rụng lá bị ức chế bởi các auxin và các tác động của ethylene không gây ra hiện tượng rụng. Sau đó, các tế bào ở vùng rụng trở nên nhạy cảm hơn với tốc độ sản sinh nhanh và nhiều hơn của ethylene và lúc này vai trò ức chế của auxin không được thể hiện vì dòng auxin từ lá đã bị giảm và cơ chế vận chuyển theo cực bị phá bỏ. Thực tế lá non là cơ quan sản sinh ethylene nhiều hơn nhưng sự rụng lại xảy ra nhiều nhất ở những lá già nhất, thấp nhất trên cây vì ethylene được cho là đã rút ngắn thời gian của giai đoạn I và ức chế

sự chuyển hóa auxin (Tucker *et al.*, 2007)

Nồng độ cao của ethylene cũng gây ra hiện tượng rụng cánh hoa hồng, nồng độ ethylene trong vùng rụng thường tăng ngay trước khi xảy ra sự phân tách cơ quan. Sự gia tăng nồng độ ethylene được cho là kích hoạt sự tiết ra và sự biểu hiện của các gen mã hóa cho các enzyme thủy phân thành tế bào, chẳng hạn như pectinase và cellulase (MacDonald *et al.*, 2011, Ngan *et al.*, 2020). Trong cà chua, khi hoa nở được tiếp xúc với ethylene khí quyển thì sự rụng cuống hoa xảy ra nhanh hơn so với trong môi trường không có ethylene. Ngược lại, khi các mẫu cây được tiên xử lý bằng amino-ethoxyvinyl glycine (AVG), một chất ức chế sinh tổng hợp ethylene, sự tách rời cơ quan đã bị kìm hãm; tương tự như vậy khi tiên xử lý các mẫu cây bằng một chất ức chế hoạt động ethylene khác là 1-metyl-cyclopropene (1-MCP) cũng giúp làm chậm gây chậm tiến trình rụng (Meir *et al.*, 2010).

Gần đây, công nghệ nano được biết đến như một lĩnh vực khoa học mới và những khám phá thuộc công nghệ nano có thể mở ra các nghiên cứu tiên tiến và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y học, môi trường, năng lượng, điện tử, khoa học đời sống và bao gồm cả khoa học cây trồng. Tác động tích cực của các hạt nano kim loại lên thực vật đã được chứng minh thông qua khả năng gia tăng tỉ lệ nảy mầm, tăng cường sinh trưởng và hoạt động sinh lý, hạn chế sự rụng các cơ quan sinh sản của thực vật, tăng sản lượng và năng suất cây trồng, tăng cường chuyển hóa các hợp chất thứ cấp trên nhiều cây trồng quan trọng (Nair *et al.*, 2010). Nano bạc (AgNPs) và nano cobalt (CoNPs) là hai nano kim loại có vai trò quan trọng trong khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, vàng và rụng lá cây trồng nuôi cấy *in vitro* thông qua khả năng ức chế sự sinh tổng hợp cũng như hoạt động của khí ethylene. AgNPs có thể ngăn ngừa hoạt động của khí ethylene bằng cách làm đảo lộn vùng bám dính ở thụ thể của ethylene thông qua việc thay thế Cu^{2+} bằng Ag^+ , điều này khiến cho thụ thể không thể liên kết với ethylene và ngăn ngừa các tín hiệu ức chế của ethylene lên thực vật (Kumar *et al.*, 2009). Bổ sung 3 mg/L

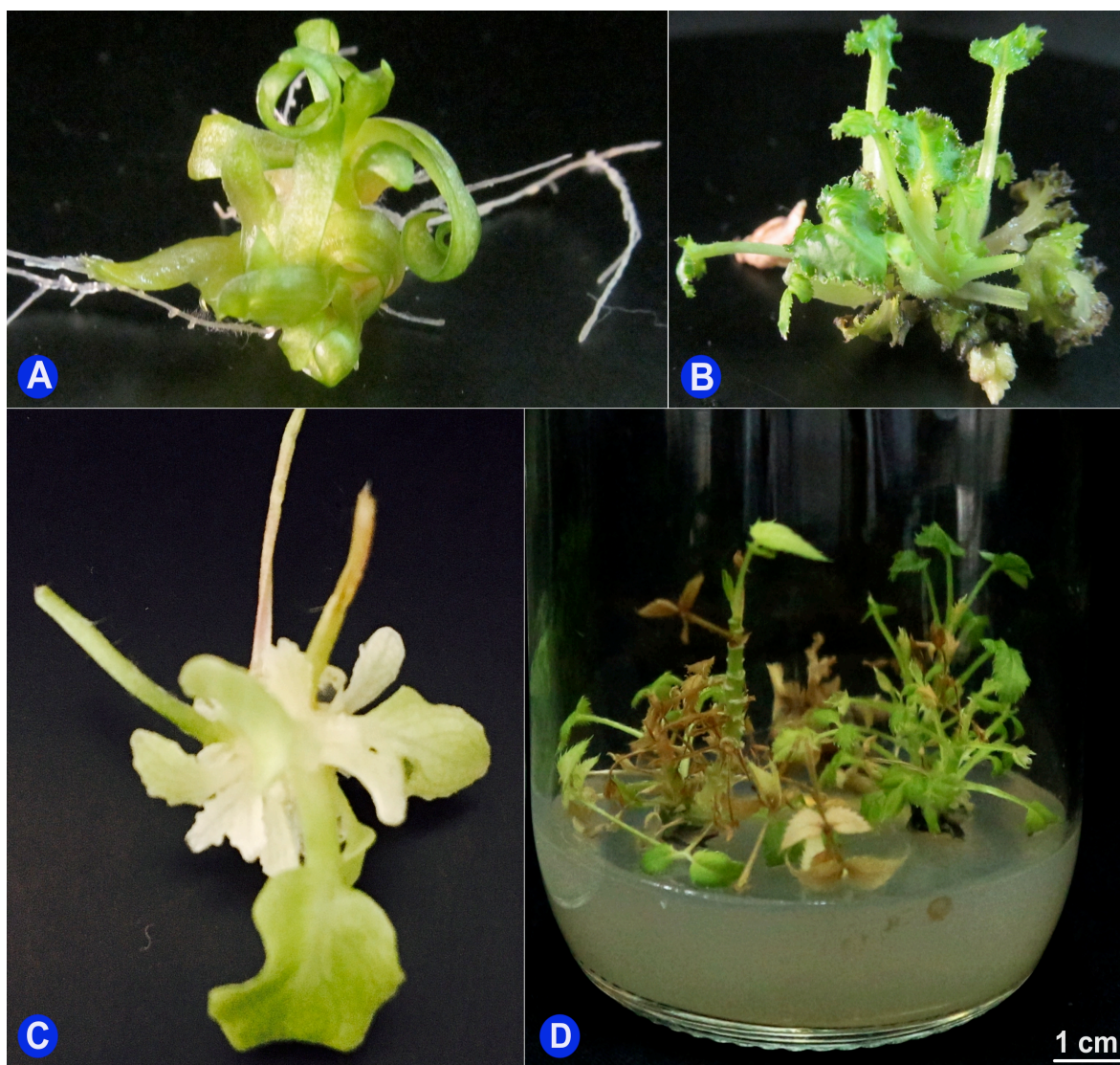
AgNPs vào môi trường nuôi cấy cây hoa hồng đã giúp hạn chế sự tích lũy khí ethylene bên trong bình nuôi cấy, giảm hoạt độ của các enzyme thủy phân và gia tăng chất lượng cây con *in vitro* (Hà Thị Mỹ Ngân *et al.*, 2019).

Bên cạnh đó, CoNPs lại đóng vai trò quan trọng trong ức chế sự sinh tổng hợp của khí ethylene thông qua ức chế enzyme l-aminocyclo-propane carboxylic acid (enzyme ACC) – enzyme quan trọng trong quá trình chuyển đổi ACC thành ethylene (Thao *et al.*, 2015). CoNPs ở nồng độ thích hợp đã được sử dụng để thay thế muối CoCl_2 trong môi trường nhân giống *in vitro* cây hoa hồng, kết quả ghi nhận được cho thấy CoNPs đóng vai trò quan trọng trong khắc phục hiện tượng vàng lá, rụng lá cũng như ức chế sự hình thành và hoạt động của khí ethylene trong vi nhân giống loài cây này (Ngan *et al.*, 2020). Từ đó cho thấy việc sử dụng các chất ức chế hoạt động cũng như sinh tổng hợp ethylene, thay đổi điều kiện môi trường nuôi cấy, sử dụng màng thoáng khí... có thể điều khiển được hiện tượng rụng lá trong nhân giống *in vitro*.

Trong hiện tượng rụng lá, auxin và ethylene đã được chỉ ra như là những tác nhân chính điều khiển quá trình này và có tác động qua lại với nhau, nồng độ auxin ở các vị trí xa và gần với vùng rụng lá có liên quan đến thời điểm rụng lá và sự phụ thuộc nồng độ này là không tuyệt đối. Nồng độ auxin sẽ thấp ở vị trí xa và nồng độ cao ở vị trí gần vùng rụng lá, trong khi sự rụng sẽ được trì hoãn khi nồng độ auxin cao ở xa vùng rụng lá. Do đó, các nhà nghiên cứu đã gợi ý rằng một dãy nồng độ auxin xung quanh khu vực rụng lá có khả năng điều chỉnh và cảm ứng sự rụng. Như vậy, việc giảm nồng độ auxin ở phía xa, sự tăng cường sinh tổng hợp ethylene và sự nhạy cảm của mẫu cây với ethylene đã gây ra hoạt động của các enzyme thủy phân làm suy yếu thành tế bào và tăng cường sự rụng và già hóa của lá. Trong các auxin thì acid indoleacetic (IAA) nội sinh đã được chứng minh làm trì hoãn quá trình phân tách cơ quan ở cây cà chua, tuy nhiên, auxin ngoại sinh lại không ảnh hưởng đến hình thái của hiện tượng này. Các kết quả cho thấy ngoài IAA thì NAA

và IBA cũng có thể làm hạn chế sự rụng tự nhiên tác dụng rất yếu và auxin có thể trì hoãn sự phân tách tế bào bằng cách ức chế sự biểu hiện của các enzyme phân hủy tế bào nhất định nhưng nó không ảnh hưởng đến sự biệt hóa cũng như hình thái giải phẫu của vùng rụng (Tucker *et al.*, 2002). Các nhà nghiên cứu cho rằng giảm lượng auxin ở vùng rụng lá làm gia tăng tín hiệu ethylene và ngược lại khi nồng độ auxin ở vùng này cao, sự phân tách tế bào bị ức

chế, do đó, auxin tự do trong tầng rời điều chỉnh độ nhạy với ethylene và khi có bất kỳ yếu tố nào điều tiết quá trình sinh tổng hợp auxin, hoặc sự vận chuyển auxin trong tầng rời cũng có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của các tế bào này với ethylene. Vì vậy, nghiên cứu về vai trò của ethylene và IAA là cần thiết để xác định chính xác cách thức chúng hoạt động để điều chỉnh thời gian rụng cơ quan (Taylor, Whitelaw, 2001; González-Carranza *et al.*, 2012).



Hình 1. Một số hiện tượng bất thường trong nhân giống *in vitro* thực vật. Thủy tinh thể chồi cây cảm chướng (A), chồi hoa hồng (B) và chồi đồng tiền (C). Hiện tượng vàng lá và rụng lá ở chồi hoa hồng nuôi cấy *in vitro* (D)

Nếu cả ethylene lẫn IAA đều không phải là yếu tố quyết định cho việc phân tách của tế bào, thì những tác nhân khác như acid abscisic (ABA) ban đầu được cho là một chất điều hòa sinh trưởng quan trọng, tuy nhiên, trong những năm gần đây vai trò của nó đã được thay đổi trở thành là một trong những tác nhân cảm ứng sự lão hóa của mô và sự sản xuất ethylene một cách nhanh chóng thậm chí ở những mô ở xa và có thể liên quan trực tiếp hơn với sự tách rời cơ quan thực vật; một số nghiên cứu khác cũng cho thấy methyl jasmonate cũng có chức năng điều chỉnh thời gian rụng (Patterson, 2001).

Hiện tượng nhiễm vi sinh trong vi nhân giống thực vật

Sự nhiễm vi sinh vật trong bình nuôi cấy là một vấn đề nghiêm trọng đối với bất kỳ phòng thí nghiệm nào, đặc biệt đối với phòng thí nghiệm thương mại vì nó có thể gây ra thiệt hại về kinh tế to lớn không chỉ do mất trực tiếp môi trường nuôi cấy mà còn làm chậm tiến độ sản xuất. Trong các phòng thí nghiệm thương mại được thiết lập tốt, vấn đề nhiễm được nhấn mạnh bởi thực tế là loại ô nhiễm thay đổi theo thời gian. Ban đầu, sự nhiễm do vi khuẩn, nấm, virus là do những bệnh liên quan đến thực vật, trong một vài trường hợp vấn đề nhiễm vi sinh vật nghiêm trọng hơn do vi khuẩn phát triển chậm và có thể mang trong mô thực vật mà không bị phát hiện và xuất hiện ở giai đoạn rất muộn khi mọi thứ dường như sạch sẽ (Bhojwani, Dantu, 2013).

Nhiễm vi sinh vật trong vi nhân giống được chia làm hai loại: ngoại sinh từ môi trường và nội sinh có nguồn gốc từ mẫu cấy, và dù ở dạng nào thì chúng đều có thể gây thiệt hại nghiêm trọng cho mẫu cấy ở từng giai đoạn sinh trưởng khác nhau (Hình 2A). Các vi sinh vật ngoại sinh có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng cách sử dụng các chất khử trùng bề mặt; nhưng sự nhiễm nội sinh không thể dễ dàng loại bỏ được và là một vấn đề nghiêm trọng trong vi nhân giống thực vật bởi vì vi khuẩn nội sinh có thể cư trú trong thực vật tại các cầu nối tế bào và trong không gian nội bào của tế bào nhu mô

vỏ. Nhiễm khuẩn nội sinh đặc biệt rắc rối vì chúng có thể không thể hiện rõ ràng khi mẫu thực vật được bắt đầu được đưa vào môi trường nuôi cấy nhưng sẽ xuất hiện vài tuần sau đó và tồn tại qua các lần cấy chuyển tiếp theo. Nhiễm vi sinh vật tiềm ẩn trong vi nhân giống có thể dẫn đến thay đổi sự tăng trưởng mẫu cấy, gây hoại tử mẫu, giảm sự gia tăng chồi và sự ra rễ (Bairu, 2008).

Hiện tượng nhiễm có thể xuất hiện nhanh chóng hoặc thường xuất hiện sau 2-4 tháng kể từ khi bắt đầu nuôi cấy (Oda *et al.*, 2003). Do đó, để đảm bảo hiệu quả của việc kiểm soát vi sinh vật những điều sau đây được khuyến nghị: môi trường nuôi cấy cần phải được tiệt trùng trước khi sử dụng; sử dụng nguồn mẫu sạch bệnh và khuyến cáo nên sử dụng các mô cấy non, mùa xuân và mùa đông là thời điểm thích hợp nhất để thu nhận mô cấy; đối với các mô bị nhiễm cần làm sạch bằng cách rửa trong nước cất vô trùng sau đó ngâm vào dung dịch kháng sinh trước khi cấy vào môi trường; dụng cụ nuôi cấy (dao cấy, kẹp, đĩa cấy, giấy...) cần được khử trùng trước khi đưa vào sử dụng ở 180°C/2 h (Alkhateeb, 2008). Trong vi nhân giống việc bổ sung kháng sinh vào môi trường cũng có thể được sử dụng để giảm hiện tượng nhiễm vi sinh vật. Zacchini, Agazio (2004) đã báo cáo rằng sử dụng thủy ngân clorua và sodium hypochloride trong bước khử trùng và kháng sinh bổ sung trong môi trường nuôi cấy đã giúp khắc phục tình trạng ô nhiễm nghiêm trọng trong nuôi cấy cây ô liu Nebbiar. AgNPs cũng được sử dụng như một chất khử trùng bề mặt trong nhân giống cây African violet, theo đó, sử dụng AgNPs ở nồng độ 0,05% trong 15 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất mà không có tác động xấu đến sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy so với khi sử dụng thủy ngân clorua và sodium hypochloride (Dương Tấn Nhật *et al.*, 2018). Sử dụng AgNPs ở nồng độ thích hợp giúp loại bỏ vi sinh vật gây nhiễm (nấm, vi khuẩn, ...) trong vi nhân giống thực vật trên nhiều đối tượng cây trồng (Spinoso-Castillo *et al.*, 2017). AgNPs ở nồng độ 7,5 mg/L có khả

năng ức chế 8 loài vi khuẩn (*Corynebacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. và *Micrococcus* sp.) và 3 loài nấm (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. và *Alternaria* sp.) trong nuôi cấy vi thủy canh cây hoa cúc trắng (Tung *et al.*, 2018). Ngoài ra để hạn chế sự nhiễm cần phải kiểm tra thường xuyên các vi khuẩn gây bệnh và cần phải loại bỏ ngay các nguồn mẫu bị nhiễm bệnh, hạn chế vào khu vực nuôi cấy, tiến hành khử trùng bằng formaldehyde hoặc thiobendazole thường xuyên để giảm tỷ lệ ô nhiễm... Tác động rõ nhất của sự nhiễm môi trường nuôi cấy là mất thời gian, tiền bạc, gây cản trở quá trình thí nghiệm, ảnh hưởng tiêu cực đến các môi trường nuôi cấy dẫn đến kết quả thực nghiệm không chính xác, sai lệch và mất mát những sản phẩm có giá trị. Vì vậy cần phải có những phương pháp hiệu quả hơn để hạn chế cũng như khắc phục tình trạng này (Bhojwani, Dantu, 2013).

Hiện tượng hoại tử mẫu cấy (chồi đỉnh, rễ, mẫu mô nuôi cấy)

Hiện tượng hoại tử chồi đỉnh hay hoại tử mẫu cấy cũng là một trở ngại lớn trong tiến trình nhân giống thành công của một số loài thực vật bằng nuôi cấy mô (Bairu *et al.*, 2009). Các triệu chứng của hiện tượng này là mẫu hóa nâu đen, chồi và lá non vàng dần hoại tử rồi chết (Hình 2C, D). Giả thiết đầu tiên khi thấy hiện tượng hoại tử chồi đỉnh là do thiếu hụt chất dinh dưỡng. Các triệu chứng thiếu hụt chất dinh dưỡng của các yếu tố ít di động như canxi (Ca) và boron (B) xuất hiện ở mô phân sinh và lá non, trong khi triệu chứng dư thừa của các khoáng chất này được quan sát thấy ở những lá già (Chiruvella *et al.*, 2012). Tuy nhiên, hiện tượng hoại tử mẫu hay chồi đỉnh vi nhân giống chịu tác động bởi sự kết hợp của nhiều yếu tố như thành phần muối, nồng độ và loại chất điều hòa sinh trưởng, nồng độ than hoạt tính bổ sung vào môi trường, nguồn và nồng độ đường, tần suất cấy chuyển, một số rối loạn sinh lý liên quan đến rễ, hàm lượng lưu huỳnh, tỷ lệ

$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ và sự biến động pH (Chiruvella *et al.*, 2012)

Nồng độ và loại chất điều hòa sinh trưởng thực vật là một trong những yếu tố chính gây nên hiện tượng hoại tử mẫu cấy, các nghiên cứu cho thấy rằng chồi nuôi cấy trên môi trường được bổ sung với isopentenyladenine (iP), thidiazuron (TDZ) hoặc kinetin có lá vàng và hoại tử quá mức ở nồng độ cao, do đó, cần giảm nồng độ cytokinin xuống mức rất thấp do hoạt động ức chế ra rễ của chúng (Piagnani *et al.*, 1996). Mặt khác có báo cáo cho rằng 6-benzylaminopurine (BA) lại không ảnh hưởng đến sự hoại tử chồi, Perez-Tornero và Burgos (2000) phát hiện ra rằng việc tiền xử lý các chồi vào dung dịch BA trước khi chuyển sang môi trường rễ đã giúp khắc phục tình trạng hoại tử đỉnh ở cây mai, cây hạt dẻ *in vitro*. Từ đó cho thấy tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên hiện tượng hoại tử mẫu cấy còn phụ thuộc vào kiểu gen của thực vật. Ngược lại với cytokinin, auxin lại tỏ ra hiệu quả với vai trò giúp hạn chế hiện tượng hoại tử, trong đó indole-3-butyric acid (IBA) bổ sung vào môi trường ra rễ giúp giảm sự thoái hóa đỉnh do đã làm thay đổi sự sản xuất hoặc tính sẵn có của các cytokinin nội sinh từ đó có thể ngăn chặn hiện tượng hoại tử mẫu (Perez, Burgos, 2000).

Canxi là một cation thiết yếu được tìm thấy với số lượng tương đối lớn trong các mô thực vật, Ca có mặt trong thành tế bào, màng tế bào, không bào và chiếm 10% tổng trọng lượng khô ở một số loài thực vật (Hirschi, 2004). Ca ngoài hoạt động như một chất mang thông tin còn đóng vai trò như một chất điều chỉnh sự tăng trưởng và phát triển của cây trồng, liên quan đến sự kéo dài và phân chia tế bào, ảnh hưởng đến độ pH của các tế bào, tăng cường tính ổn định của màng tế bào bằng cách kết nối các protein và lipid khác nhau ở bề mặt màng tế bào, cung cấp khả năng chịu stress (sinh học và phi sinh học) và ngăn chặn sự lão hóa sinh lý. Đây là lý do tại sao thiếu Ca trong thực vật, trong hầu hết các trường hợp, có liên quan đến bệnh lý và các vấn đề sau thu hoạch (Hepler, 2005; Hirschi, 2004). Có rất nhiều báo cáo về vai trò của Ca trong ngăn ngừa hoại tử chồi đỉnh

ở cả cây nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro*. Bổ sung Ca vào môi trường làm giảm sự hoại tử ở cây hạt dẻ, cây mẫu đơn *in vitro*. Việc sử dụng các nguồn cung cấp canxi khác nhau (calcium chloride, calcium acetate, calcium ammonium nitrate và calcium pantothenate) cũng tác động đến hiện tượng thoái hóa mẫu cấy, Ca cung cấp dưới dạng muối calcium chloride làm giảm hiện tượng thoái hóa và không ức chế sự nhân lên hoặc sự kéo dài chồi trong khi Ca được cung cấp dưới dạng calcium acetate gây ức chế nghiêm trọng đối với sự kéo dài chồi (Piagnani *et al.*, 1996; Wang, Van Staden, 2001). Qua đó cho thấy mặc dù Ca có ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và sự hoại tử của chồi, mẫu cấy tuy nhiên sự ảnh hưởng của Ca có thể thay đổi từ loài này sang loài khác và phụ thuộc rất nhiều vào kiểu gen thực vật.

Một số phương pháp khác cũng đã được sử dụng để khắc phục hiện tượng hoại tử mẫu cấy: thay đổi nồng độ môi trường nuôi cấy với sự giảm nồng độ các thành phần dinh dưỡng (khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin) có trong môi trường xuống còn một nửa hoặc một phần tư, sử dụng các nguồn cacbon khác nhau (glucose, fructose), nuôi cấy thoáng khí, sử dụng than hoạt tính với nồng độ thích hợp. Ngoài ra việc loại bỏ những lá, vùng mẫu bị vàng, nâu trước khi các chồi được sử dụng để nuôi cấy cũng có thể để làm giảm bớt hiện tượng này (Chiruvella *et al.*, 2012).

Hiện tượng hóa nâu mẫu và môi trường nuôi cấy

Trong vi nhân giống nhiều cây thân gỗ và một số loài thân thảo thường xuất hiện tượng hóa nâu mẫu cấy và hóa nâu môi trường. Đôi khi tình trạng hóa nâu trở nên nghiêm trọng đến mức mẫu cấy có màu nâu sẫm/đen, trở nên hoại tử và cuối cùng chết (Hình 2B, E). Các nhà khoa học cho rằng sự sản sinh phenol trong suốt quá trình nuôi cấy gây oxy hóa và làm cho mẫu cấy và môi trường bị hóa nâu (Bhojwani, Dantu, 2013). Tình trạng hóa nâu xảy ra tại vị trí mặt cắt ngay khi mẫu được cắt và phenol được sản xuất liên tục trong suốt quá trình nuôi cấy. Những phenol này trở nên độc hại với mẫu cấy

bằng cách liên kết ngược với những protein bằng liên kết hydro và quá trình oxy hóa của chúng tạo thành các quinon có hoạt tính cao, các quinon này sau đó được polymer hóa và oxy hóa protein để hình thành các hợp chất melanic được gọi là polyphenol có thể là độc tố đối với thực vật. Các enzyme oxy hóa phenol cũng có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường, sự hiện diện của ánh sáng và nhiệt độ cao làm tăng tỷ lệ hóa nâu bằng cách tăng hoạt động của các enzyme này. Trong tự nhiên, các hợp chất phenol được biết là đóng một vai trò quan trọng đối với thực vật trong đáp ứng với sự mất cân bằng các hormone thực vật, ngăn chặn, kháng bệnh và bảo vệ các mô bị tổn thương do nhiễm trùng. Các phenol này không chỉ có vai trò trong phòng thủ, bảo vệ mà còn có thể đóng vai trò như chất nguồn cho tổng hợp một số hợp chất khác như carbohydrate, amino acid và một số protein trong quá trình biệt hóa phát sinh hình thái của thực vật (Dobrąnski, Teixeira, 2010).

Mức độ hóa nâu phụ thuộc vào loài nuôi cấy, kiểu gen, độ tuổi của mô cấy (mô già hơn cho thấy khả năng bị hóa nâu cao hơn), mùa bắt đầu nuôi cấy (nhiều hơn vào mùa đông và mùa thu) và thành phần cũng như trạng thái môi trường (sự hóa nâu xuất hiện nhiều khi mẫu nuôi cấy trong môi trường lỏng) (Hình 2E). Một số phương pháp đơn giản để bảo vệ các mẫu cấy khỏi sự hóa nâu là cấy chuyển thường xuyên ở giai đoạn nuôi cấy ban đầu; hạn chế sự oxy hóa phenol bằng phương pháp nuôi cấy trong tối hoặc ở cường độ ánh sáng thấp ($3-4 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); giảm nồng độ muối của môi trường giúp làm giảm hiện tượng hóa nâu của mẫu cấy mô sẹo cây kiwi (*Actinidia arguta*) (Han *et al.*, 2010). Các khoáng kim loại trong môi trường nuôi cấy như Mn^{2+} , Cu^{2+} là các chất đồng dạng với các enzyme peroxidase và phenolase (trương ứng) nên được giảm hoặc loại bỏ để không kích thích các enzyme này oxy hóa các hợp chất phenol và ngăn ngừa hiện tượng hóa nâu của mẫu cấy (Bhojwani, Dantu, 2013). Bên cạnh các biện pháp nêu trên thì việc bổ sung các chất bổ trợ như acid ascorbic (AA), cystein-HCl hoặc

acid citric (chất chống oxy hoá), polyvinylpyrrolidone (PVP) và than hoạt tính cũng giúp hấp thụ phenol từ đó kiểm soát tình trạng hóa nâu của mẫu cấy cũng như môi trường nuôi cấy. Trong tái sinh chồi giống chuối Formosana, tình trạng hóa nâu gây chết 100% mẫu cấy, việc bổ sung thêm 0,01% AA vào môi trường không chỉ ngăn ngừa hiện tượng hóa nâu gây chết mẫu mà còn làm tăng đáng kể số lượng cây con được hình thành. Tuy

nhiên, AA chỉ có hiệu quả nếu nó được thêm vào bề mặt của môi trường, nó không hiệu quả nếu được thêm vào trong môi trường trước khi hấp khử trùng vì nhiệt độ sẽ làm mất hoạt tính và phân hủy AA (Bhojwani, Dantu, 2013). Một phương pháp hiệu quả nhất để chống lại các vấn đề về tình trạng hóa nâu trong mẫu lá của *Sideritis trojana* là sự kết hợp 100 mg/L của AA và 50 mg/L của acid citric (Çördük, Aki, 2011).



Hình 2. Một số hiện tượng bất thường trong nhân giống *in vitro* thực vật (tiếp theo). Hiện tượng nhiễm vi sinh vật (A), hóa nâu và hoại tử rễ cây hoa hồng (B), hoại tử chồi đỉnh hoa hồng (C), hoại tử toàn bộ mẫu cấy hoa hồng (D), hóa nâu mẫu cấy cây lan và cây đồng tiền (E).

Các chất bổ sung khác vào môi trường đã giúp ngăn ngừa hiện tượng hóa nâu là

polyvinylpyrrolidone (PVP), canxi pantothenate và than hoạt tính cũng có khả năng hấp thụ

phenol. PVP, một polyamide rất thường được sử dụng để hấp phụ trong sắc ký, nó còn được sử dụng để hấp thụ các hợp chất phenolic trong nuôi cấy mô. PVP hấp thụ phenol thông qua liên kết hydro, ngăn chặn quá trình oxy hóa và sự trùng hợp của chúng. Calcium pantothenate như một chất phụ gia trong môi trường đã được báo cáo giúp làm giảm màu nâu của các mô nuôi cấy. Mẫu được ngâm trong hồ hợp acid ascorbic và acid citric cho thấy màu nâu xuất hiện sau một thời gian trong nuôi cấy, và trong trường hợp này, nơi màu nâu tái phát, hiệu quả của canxi pantothenate trong việc giảm màu nâu đã được thử nghiệm. Canxi pantothenate được bổ sung vào môi trường đã giúp giảm sự hóa nâu đến một mức độ nhất định của mẫu cây khi sử dụng ở nồng độ cao (200 mg/L), nồng độ canxi pantothenate thấp tỏ ra không hiệu quả trong việc giảm mức độ hóa nâu. Khả năng của than hoạt tính để hấp thụ các chất ức chế cũng được ghi nhận. Bổ sung than hoạt tính đã được báo cáo giúp tránh sự tích tụ các hợp chất phenolic trong nuôi cấy mô, tuy nhiên hiệu quả đạt được không cao và phenol vẫn tiếp tục hình thành từ mẫu cây, mẫu vẫn tiếp tục hóa nâu và hoại tử (Bajaj, 1996).

Nhìn chung các chất hấp phụ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã giúp hạn chế hiện tượng hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy, tuy nhiên, các chất này cũng có thể hấp thụ các hợp chất hữu ích cần thiết cho thực vật từ môi trường và do đó việc sử dụng loại và nồng độ của chúng nên được lựa chọn một cách thận trọng (Bhojwani, Dantu, 2013).

Một số vấn đề khác

Nhiều loài thực vật không tuân theo quy trình nuôi cấy mô vì chúng không hoặc rất khó tái sinh trong ống nghiệm. Sự hạn chế này thể hiện rõ rệt hơn ở nhiều loài cây thân gỗ và có thể được khắc phục bằng cách sử dụng các mô, các bộ phận chưa trưởng thành hoặc còn non nhất của cây; bên cạnh đó, xử lý với cytokinin cũng có thể làm trẻ hóa mẫu cây, kích thích sự phát triển của các chồi non mới và cho phép sử dụng chúng như là nguồn mẫu để bắt đầu cho

quá trình nuôi cấy *in vitro*. Một số loài thực vật thân gỗ như *Prunus*, *Eucalyptus*, *Pinus* và *Sequoia* khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung cytokinin ở nồng độ thích hợp đã kích hoạt sự hình thành mô phân sinh. Sự thành công của phương pháp nhân giống *in vitro* trên đối tượng cây thân gỗ và cây ăn quả đã đóng một vai trò quan trọng trong công tác nhân giống, bảo tồn các nguồn gene quý hiếm và cũng góp phần phục vụ cho mục đích thương mại (Ahuja, 2013).

Một khía cạnh quan trọng cần được xem xét khi tái sinh cây từ phương pháp vi nhân giống là duy trì tính toàn vẹn di truyền đối với cây mẹ. Thuật ngữ 'biến dị soma' được đặt ra để chỉ sự biến đổi di truyền giữa các loại cây trồng, trong tự nhiên, sự đa dạng di truyền và sự thay đổi di truyền trong một quần thể được tạo ra thông qua các sự kiện tái tổ hợp. Trong vi nhân giống, sự tăng trưởng và sự tái sinh của các tế bào thực vật thành toàn bộ thực vật là một quá trình vô tính liên quan đến việc phân chia các tế bào. Trong quá trình này sự xuất hiện của các biến đổi tự phát là ngẫu nhiên và không kiểm soát được, biến dị soma đã được báo cáo ở các mức độ khác nhau (hình thái, tế bào học, sinh hóa và cấp độ phân tử). Điều kiện nuôi cấy, thành phần môi trường nuôi cấy, thời gian và chu kỳ nuôi cấy có thể gây đột biến và một số cơ quan nuôi cấy (mô sẹo, tế bào trần, phôi soma, ...) đôi khi có thể cho thấy sự biến đổi về cả kiểu hình lẫn kiểu gen. Thông thường, sự thay đổi này xảy ra một cách tự phát và có thể là kết quả của những thay đổi tạm thời hoặc thay đổi di truyền vĩnh viễn trong tế bào hoặc mô trong suốt quá trình nuôi cấy trong ống nghiệm. Những thay đổi tạm thời là kết quả từ các tác động không phụ thuộc kiểu gen (epigenetic) hoặc tác động sinh lý, những tác động này là không thể tránh khỏi và có thể phục hồi được. Ngược lại, những thay đổi vĩnh viễn liên quan đến di truyền và thường biểu thị sự biến đổi đã tồn tại từ trước trong cây mẹ hoặc là kết quả của những biến dị *de novo*. Sự xuất hiện biến dị soma là một vấn đề quan tâm lớn đối với bất kỳ hệ thống vi nhân giống nào, để đánh giá sự hiện diện của nó, một số chiến lược đã được sử dụng để phát hiện các

biến thể theo thời gian, dựa trên một hoặc nhiều yếu tố quyết định từ các đặc điểm hình thái hay phân tích tế bào (biến đổi số và cấu trúc trong nhiễm sắc thể), sử dụng các marker phân tử và phương pháp sinh hóa. Các nghiên cứu về biến dị soma cũng rất quan trọng với mục đích sản xuất giống cây trồng đồng nhất về mặt di truyền và cũng được sử dụng như một công cụ để tạo ra sự biến đổi di truyền có giá trị để cải thiện cây trồng thông qua việc lựa chọn các biến thể mới có khả năng kháng bệnh, cải thiện chất lượng, hoặc năng suất cao hơn (Leva *et al.*, 2012).

Bên cạnh đó, ngày nay với nhu cầu về cây giống sạch bệnh, đồng nhất cũng như đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng thì một số lượng lớn cây trồng có giá trị kinh tế cao bao gồm các loại rau, hoa, cây cảnh, cây ăn quả, cây rừng và cây dược liệu đã được nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô. Hơn một tỷ cây giống mỗi năm được sản xuất bằng phương pháp này, tuy nhiên, các cây trồng vi nhân giống thường đắt hơn các cây trồng bằng phương pháp truyền thống, bởi cần nhiều trang thiết bị vận hành, môi trường nuôi cấy đặc biệt, nhiều vật tư và hóa chất đòi hỏi cần được sử dụng trong suốt quá trình nuôi cấy. Do chi phí sản xuất cao nên kéo theo giá thành sản phẩm nuôi cấy cũng cao. Để giảm thiểu chi phí người ta thường giảm chi phí từ nhân công lao động và lượng điện năng tiêu thụ, nhân giống theo hợp đồng, rút ngắn và giảm bớt một số giai đoạn nuôi cấy trong tiến trình nhân giống *in vitro*, tự động hóa và mở rộng quy mô sản xuất ... (Tomar *et al.*, 2008).

KẾT LUẬN

Vi nhân giống thực vật là một quá trình phức tạp và đóng vai trò quan trọng trong công tác chọn tạo giống. Việc sử dụng phương pháp nuôi cấy mô để nhân nhanh các loài cây phục vụ cho mục đích thương mại thường có chi phí và giá thành cao là do tác động của các rủi ro bất thường khác nhau trong hoặc sau quá trình vi nhân giống. Các vấn đề chính gặp phải trong hầu hết các phòng thí nghiệm nuôi cấy mô đều có hai loại: bệnh lý (nhiễm vi sinh vật) và sinh

lý học (thủy tinh thể, vàng lá và rụng lá, hoại tử mầm cây, hóa nâu mầm cây, biến dị soma...). Việc nghiên cứu tìm ra nguyên nhân cũng như giải pháp khắc phục các hiện tượng bất thường này là việc làm mang tính cấp thiết để hạn chế những rủi ro, nâng cao hiệu suất và chất lượng cây vi nhân giống đồng thời hạ giá thành sản phẩm. Có lẽ sẽ không bao giờ có thể xác định cũng như khắc phục được tất cả các tác nhân, các hiện tượng bất thường, nhưng càng có thể xác định được nhiều hiện tượng thì càng có nhiều khả năng kiểm soát tốt hơn đối với quá trình vi nhân giống thực vật. Từ đó, có thể hạn chế, khắc phục, loại bỏ được những hiện tượng bất thường không mong muốn và tận dụng những hiện tượng hữu ích trong quá trình vi nhân giống thực vật.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của hạt nano kim loại lên khả năng tái sinh, sinh trưởng, phát triển và tích lũy hoạt chất trong quá trình nhân giống vô tính một số cây trồng có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam” thuộc Hợp phần IV: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15–18 và Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng (Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahuja MR (2013) *Micropropagation of woody plants*. Springer Science and Business Media.
- Alkhateeb AA (2008) A review the problems facing the use of tissue culture technique in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sci J King Faisal Univ Basic Appl Sci* 9: 85-104.
- Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M (2009) Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves. *BMC Plant Biol* 9: 1-20.

- Bairu M, Jain N, Stirk W, Doležal K, Van Staden J (2009) Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *S Afr J Bot* 75(1): 122-127.
- Bairu MW (2008) *Characterization and control of micropropagation problems in Aloe, Devil' claw and Banana*. Doctor of phisology. University of Kwazulu Natal.
- Bajaj Y (1996) *Biotechnology in agriculture and forestry 35. Trees IV*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bahmani R, Karami O, Gholami M (2009) Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. *Appl Sci* 6(11): 1513–1517.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, India.
- Chang C (2016) Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biol* 14: 1–7.
- Chiruvella KK, Mohammed A, Dampuri G, Ghanta RG (2012) *In vitro* shoot regeneration and control of shoot tip necrosis in tissue cultures of *soymida febrifuga* (Roxb.) A. Juss. *Plant Tiss Cult Biotechnol* 21(1): 11-25.
- Çördük N, Aki C (2011) Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* bornm., an endemic medicinal herb of Turkey. *Rom Biotechnol Lett* 16(6): 61-67.
- Da Silva JAT, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. *Vitr Cell Dev Biol Plant* 49: 1-16.
- Dương Tấn Nhựt, Dương Bảo Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoài Châu (2018) Khảo sát nano bạc làm chất khử trùng mẫu mới trong nhân giống vô tính cây african violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16(1): 87-98.
- Dương Tấn Nhựt, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Lê Kim Cương, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Nguyễn Xuân Tuấn, Nguyễn Việt Cường, Đỗ Mạnh Cường, Nguyễn Hoài Châu và Ngô Quốc Bưu (2014) Khảo sát ảnh hưởng của nano bạc lên sự sinh trưởng và phát triển của cây cúc, dâu tây, đồng tiền nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(1): 103-111.
- Dobránszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of apple - A review. *Biotechnol Adv* 28: 462-488.
- García-González R, Quiroz R, Carrasco B, Caligari P (2010) Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cien Inv Agr* 37(3): 5-30.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 37: 263–285.
- Gaspar TH, Kevers C, Debergh P, Maene L, Paques M, Boxus PH (1987) *Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects*. In Bonga JM, Durzan DJ, eds. *Cell and tissue culture in forestry, Vol 1*. Martinus Nijhoff, Dordrecht: 152-166.
- George EF, Hall MA, De Klert GJ (2008) *Plant propagation by tissue culture, 3rd edn, Vol 1, The background*. Springer, The Netherlands.
- González-Carranza ZH, Shahid AA, Zhang L, Liu Y, Ninsuwan U, Roberts JA (2012) A novel approach to dissect the abscission process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 160(3): 1342-1356.
- González-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA (2002) Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 128(2): 534-543.
- Han M, Gleave AP, Wang T (2010) Efficient transformation of *Actinidia arguta* by reducing the strength of basal salts in the medium to alleviate callus browning. *Plant Biotechnol Rep* 4(2): 129-138.
- Hà Thị Mỹ Ngân, Trần Đào Hồng Trinh, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Nhật Linh, Phan Lê Hà Nguyễn, Vũ Thị Hiền, Vũ Quốc Luận, Bùi Văn Lệ, Dương Tấn Nhựt (2019) Hạn chế hiện tượng thủy tinh thể và gia tăng tỷ lệ sống của cây con hoa Đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) nuôi cấy *in vitro* trong môi trường có bổ sung nano bạc. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(1): 115-124.
- Hà Thị Mỹ Ngân, Hoàng Thanh Tùng, Ngô Đại Nghiệp, Bùi Văn Lệ, Dương Tấn Nhựt (2019) Tác động của nano bạc lên sự hạn chế khí ethylene và hoạt độ enzyme thủy phân trong vi nhân giống cây

Tạp chí Công nghệ Sinh học **18**(1): 23-39, 2020

- hoa hồng (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love'). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 17(3): 505-517.
- Hepler PK (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 17(8): 2142-2155.
- Hirschi KD (2004) The calcium conundrum. Both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiol* 136(1): 2438-2442.
- Kharrazi IVM, Nemati H, Tehranifar A, Bagheri A, Sharifi A (2011) Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *J Biol Environ Sci* 5(13): 1-6.
- Kumar P, Lakshmanan P, Thorpe TA (1998) Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 34(2): 93-103.
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA (2009) AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron J Biotechnol* 12(2): 1-15.
- Leva A, Petruccelli R, Rinaldi L (2012) *Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive*. In Leva A, ed. *Recent advances in plant in vitro culture*. InTech: 123-150.
- Li C, Zhou A, Sang T (2006) Rice domestication by reducing shattering. *Sci* 311(5769): 1936-1939.
- Luong Thien Nghia, Hoang Thanh Tung, Nguyen Phuc Huy, Vu Quoc Luan, Duong Tan Nhut (2017) The effects of silver nanoparticles on growth of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. 'JIMBA' in different cultural systems. *Vietnam J Sci Technol* 55(4): 493-504.
- MacDonald MT, Lada RR, Dorais M, Pepin S (2011) Endogenous and exogenous ethylene induces needle abscission and cellulase activity in post-harvest balsam fir (*Abies balsamea* L.). *Trees* 25(5): 947
- Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003) Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72: 99-103.
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Sundaresan S, Selvaraj KV, Burd S, Ophir R, Kochanek B, Reid MS, Jiang C-Z, Lers A (2010) Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. *Plant Physiol* 154(4): 1929-1956.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15(3): 473-497.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Sci* 179(3): 154-163.
- Ngan HTM, Cuong DM, Tung HT, Nghiep ND, Le BV, Nhut DT (2020) The effect of cobalt and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 141(2): 393-405.
- Oda ML, de Faria RT, Fonseca ICB, Silva GL (2003) Fungicide and germicide on contamination escaping in the *in vitro* propagation of *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Ciênc Agrá* 24 (2): 273-276.
- Patterson SE (2001) Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126(2): 494-500.
- Perez-Tornero O, Burgos L (2000) Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant, Cell Tiss Org Cult* 63: 133-141.
- Phan C, Letouze R (1983) A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and 'vitreous' plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. *Plant Sci Lett* 31(2-3): 323-327.
- Piagnani C, Zocchi G, Mignani I (1996) Influence of Ca²⁺ and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. *Plant Sci* 118(1): 89-95.
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* 53(1): 131-158.
- Spinoso-Castillo J, Chavez-Santoscoy R, Bogdanchikova N, Pérez-Sato J, Morales-Ramos V, Bello-Bello J (2017) Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system.

Plant Cell Tiss Org Cult 129(2): 195-207.

Taylor JE, Whitelaw CA (2001) Signals in abscission. *New Phytol* 151(2): 323-340.

Thao NP, Khan MIR, Thu NBA, Hoang XLT, Asgher M, Khan NA, Tran L-SP (2015) Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal stress. *Plant physiol* 169 (1):73-84.

Tomar UK, Negi U, Sinha AK, Dantu PK (2008) Economics and factors influencing cost of microprop- agated plants. *My Forest* 44:135–147.

Tucker ML, Burke A, Murphy CA, Thai VK, Ehrenfried ML (2007) Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves. *J Exp Bot* 58(12): 3395-3406.

Tucker ML, Whitelaw CA, Lyssenko NN, Nath P (2002) Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine

zipper transcription factors. *Plant Physiol* 130(3): 1487-1496.

Tung HT, Nam NB, Huy NP, Luan VQ, Hien VT, Phuong TTB, Dung LT, Loc NH, Nhut DT (2018) A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. *Sci Hortic* 232: 153-161.

Wang H, Van Staden J (2001) Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies. *S Afr J Bot* 67(2): 358-361.

Yam TW, Arditti J (2009) History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnol Rep* 3: 1-56.

Zacchini M, Agazio M (2004) Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biol Plant* 48: 589-592.

Ziv M (1991) *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants*. In Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands: 45-69.

ABNORMAL SYMPTOMS IN MICROPROPAGATION AND STRATEGIES TO OVERCOME

Ha Thi My Ngan^{1,2}, Hoang Thanh Tung², Bui Van Le¹, Duong Tan Nhut²

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Nowaday, plant cell, tissue and organ culture has become a standard and popular propagation method for many crops including ornamental plants, medicinal plants, fruit trees and green vegetables. The advantage of this method is that it can generate a huge number of genetically identical seedlings, effectively control the pathogenicity in order to produce disease-free plants, become a tool for conservation and development of genetic sources and support study of physiological characteristics of plants. However, this method still has some limitations such as abnormal physiological morphology and anatomical structure; necrosis and deformities plants; stomata loss of function, etc. These abnormalities have great impacts on shoot multiplication as well as the growth and development of the plants after transplanted from the culture vessels to the nursery stage. The components of *in vitro* culture conditions such as culture system, composition and content of nutrients, plant growth regulators used in the culture medium, light, temperature and humidity, age and origin of explants, etc., are the main causes of the abnormalities. Therefore, optimization of culture system to improve the quality of seedlings has always been one of the main targets of commercial micropropagation. In this review, we focused on some frequently abnormal symptoms in micro - propagation such as

Tạp chí Công nghệ Sinh học **18**(1): 23-39, 2020

vitrification, yellowing and abscission of leaves; microbial contamination; necrosis of shoot-tip, roots and tissues culture; browning of explants and medium culture and other restrictions. More over, this report showed some the effective solutions to overcome these abnormal phenomena.

Keywords: *Abscission, browning, contamination, in vitro culture, necrosis explant, vitrification.*