

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY DÂU TÂY GIỐNG SMiA NHẬP NỘI TỪ MỸ

**Nông Thị Huệ\*, Phạm Thị Thu Hằng, Tưởng Thị Thanh Huyền,  
Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Lâm Hải, Nguyễn Thanh Hải**

**Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam**

*Email\**: nthue86sh@gmail.com

Ngày gửi bài: 20.09.2017

Ngày chấp nhận: 31.01.2018

### TÓM TẮT

SMiA là một giống dâu tây cảnh với những đặc điểm nổi trội như trái hình tim, chín đỏ mọng với mùi hương đặc biệt là sự hòa quyện giữa dâu tây, hoa hồng, dứa và vị ngọt của mật ong. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây dâu tây SmiA từ vật liệu ban đầu là chồi nảy mầm từ hạt. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất (7,8 chồi/mẫu) sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l BA. Môi trường thích hợp để tạo rễ cho chồi *in vitro* là môi trường bán lỏng MS bổ sung 0,25 mg/  $\alpha$ -NAA, tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 93,33%, số rễ trung bình đạt 12,36 rễ/chồi, chiều dài rễ trung bình đạt 1,49 cm sau 4 tuần nuôi cấy. Trên giá thể đất phù sa, tỷ lệ cây sống cao, sinh trưởng tốt. Chế độ bón phân NPK kết hợp Atonik thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của cây dâu tây SmiA *in vitro* với chiều cao cây trung bình đạt 19,13 cm sau 1 tháng chăm sóc. Hoa nở sau 20 - 25 ngày hình thành nụ và quả chín sau 30 - 35 ngày.

Từ khóa: Dâu tây, nhân nhanh, ra rễ, thích ứng cây ngoài tự nhiên.

### Study on Micropropagation of Strawberry “Smia”

#### ABSTRACT

Strawberry “Smia” is a potential variety with outstanding features such as heart-shaped fruit, dainty little red berries with an ambrosial flavor of strawberry, rose, pineapple and honey. This study was carried out to establish *in vitro* micropropagation protocol from *in vitro* germinated plants. The best shoot proliferation (7.8 shoots/explant) was obtained from explants grown on MS medium supplemented with 0.4 mg/l BA after 5 weeks. *In vitro* shoots were rooted on semi-solid MS medium with 0.25 mg/l  $\alpha$ -NAA, maximum rooting rate (93.33%) with 12.36 roots/shoot and average length (1.49 cm) of roots was achieved after 4 weeks. The plantlets were successfully acclimated and well developed in soil substrate with a high survival rate. NPK fertilizer combined with Atonik solution was most appropriate for growth and development of *in vitro* SmiA plantlets with the average height of 19.13 cm after 1 month. Flowering was observed after 20 - 25 days of flower-bud formation, and masses of dainty, sweet tasting berries were produced after 30 - 35 days.

Keywords: Strawberry, shoot multiplication, adventitious rooting, *in vitro* plant acclimatization.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dâu tây Alpine (*Fragaria vesca*) là một loài thực vật có hoa, kích thước nhỏ, thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae). Loại dâu tây này cho quả có kích thước nhỏ hơn nhiều so với các loại dâu tây trồng ăn quả hiện nay như dâu tây giống Nhật, dâu tây giống Mỹ, dâu tây giống Pháp và dâu tây giống New Zealand. Tuy nhiên, dâu tây Alpine hấp dẫn bởi dễ trồng, cây sinh trưởng tốt, có thể ra hoa và tạo quả quanh năm, hình dáng quả đẹp, màu sắc đa dạng, vị ngọt và đặc biệt có hương thơm quyến rũ.

Dâu tây SMiA (Alpine Strawberries Mignonette) là một giống thuộc nhóm dâu tây Alpine với những đặc điểm nổi trội như cây nhỏ xinh, bông chùm, trái đỏ mọng hình tim đẹp mắt và được nhập nội từ Mỹ. Theo Renee's Garden mô tả, hương vị dâu tây SMiA là sự kết hợp thần kì giữa tinh hoa của dâu tây, hoa hồng, dứa và cả mật ong (<https://www.reneesgarden.com/products/strawberry-alpine-mignonette>). Với những ưu điểm như trên, giống dâu SMiA là lựa chọn hàng đầu đáp ứng nhu cầu chơi hoa cây cảnh trang trí ngày càng cao của thị trường.

Mặt khác, trong các nghiên cứu về chuyển gen, đột biến, việc thiết lập một hệ thống tái sinh chồi hiệu quả là yêu cầu tiên quyết (Haymes & Davis,

1998; Zakaria *et al.*, 2014). Các giống dâu tây trồng hiện nay có hạn chế rất lớn trong việc xây dựng quy trình tái sinh chồi cũng như chuyển gen do độ bội thể tương đối lớn. Trong khi đó, dâu tây Alpine là loài lưỡng bội có độ bội thấp  $2n = 2x = 14$ , có bộ genome kích thước nhỏ (khoảng 250 Mb), lại có chu kỳ sinh sống tương đối ngắn. Do đó, loại dâu tây này được xem là một cây mô hình hiệu quả trong nghiên cứu genome, di truyền phân tử của họ Hoa hồng (Oosumi *et al.*, 2006; Slovin *et al.*, 2009), đồng thời cũng là một mục tiêu để nghiên cứu tạo đột biến, chuyển gen cũng như phát triển các chương trình lai chọn tạo giống (Mansouri *et al.*, 1996; Haymes *et al.*, 1997).

Tuy nhiên, SmiA là giống dâu tây nhập nội nên giá thành hạt giống SmiA cao, hạt giống có kích thước rất nhỏ, tỷ lệ nảy mầm thấp và thời gian nảy mầm rất chậm. Đây là những hạn chế rất lớn trong quá trình phát triển giống dâu tây phục vụ cho mục đích nghiên cứu cũng như cung cấp cho thị trường. Để khắc phục những hạn chế đó, phương pháp nhân giống *in vitro* được xem là biện pháp kỹ thuật phù hợp cho phép nhân nhanh tạo ra số lượng cây lớn, đồng nhất về mặt di truyền, sạch bệnh đáp ứng được nhu cầu về số lượng cây giống chất lượng cao, ổn định cho sản xuất. Từ những lý do trên, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu tìm ra các thông số kỹ thuật thích hợp cho quy trình nhân giống *in vitro* cây dâu tây SMiA làm cơ sở cho việc nhân nhanh các nguồn gen ưu tú phục vụ cho công tác chọn tạo giống mới bằng kỹ thuật lai tạo và chuyển gen.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Hạt giống dâu tây SMiA (Alpine Strawberries Mignonette) được cung cấp bởi công ty Renee's Garden, Mỹ.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Khử trùng mẫu hạt

Hạt giống dâu tây được rửa bằng nước xà phòng loãng và rửa lại dưới vòi nước chảy. Tiếp theo, hạt được khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây, khử trùng tiếp bằng  $\text{Ca}(\text{HClO})_2$  0,5 % trong 30 phút, rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần, mỗi lần 1 phút. Thấm khô hạt bằng giấy thấm vô trùng trước khi cấy hạt vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 0,5 mg/l BA để kích thích sự nảy mầm của hạt.

#### 2.2.2. Tái sinh chồi

Chồi dâu tây thu được sau khi nảy mầm được cắt ra và tái sinh trên môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA sau 4 tuần. Các chồi sau tái sinh này sẽ được sử dụng để bố trí các thí nghiệm nhân nhanh.

#### 2.2.3. Nhân nhanh

Chồi tái sinh có chiều cao 2 - 2,5 cm, lá xanh bóng, sinh trưởng khỏe mạnh được đặt trên các môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất điều tiết BA,  $\alpha$ -NAA riêng rẽ và phối hợp ở các nồng độ khác nhau.

#### 2.2.4. Tạo rễ cho chồi *in vitro*

Các chồi có chiều cao 3 - 3,5 cm, sinh trưởng và phát triển tốt được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA với các kiểu nuôi cấy (lông, đặc, bán lông) để kích thích tạo rễ. Trong đó môi trường đặc là môi trường có bổ sung 7,0 g/l agar; môi trường lông, không bổ sung agar và môi trường bán lông là môi trường bổ sung 3,5 g/l agar. Môi trường nuôi cấy *in vitro* MS cơ bản + 30 g/l sucrose + 7,0 g/l agar được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở áp suất 1,1 atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: 16 h sáng/8 h tối, cường độ ánh sáng 2.000 - 2.500 lux, nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.5. Thích nghi cây ngoài vườn ươm

Cây *in vitro* hoàn chỉnh, chiều cao 3 - 4 cm, có 4 - 5 lá, bộ rễ tốt được chuyển ra vườn ươm (để nguyên trong bình) để tập nắng trong 2 - 3 ngày. Sau đó, cây được lấy ra khỏi bình, rửa sạch môi trường bám trên rễ và cấy vào vỉ xốp có chứa các loại giá thể khác nhau bao gồm đất (100%); đất: trấu hun (1:1); đất: xơ dừa (1:1); đất: trấu hun: xơ dừa (1:1:1); xơ dừa (100%). Thí nghiệm ra cây *in vitro* được tiến hành vào vụ hè thu (đầu tháng 9), cây được che 60% nắng trực tiếp bằng lưới đen thoáng từ 9 h - 17 h. Tưới nước giữ ẩm 3 lần/ngày trong tháng đầu tiên và 2 lần/ngày từ tháng thứ 2. Đồng thời bước đầu đánh giá được ảnh hưởng của một số loại phân bón đến khả năng sinh trưởng, phát triển của cây dâu tây *in vitro* trong điều kiện nhà lưới.

#### 2.2.6. Bón phân

Dựa trên khuyến cáo sử dụng và các phương pháp bón phân phổ biến cho dâu tây, chúng tôi đã sử dụng chế độ bón phân như sau: NPK: trộn cùng giá thể khi trồng cây, cách 1 tuần bổ sung quanh gốc cây 1 lần; Atonik: pha với nước, phun qua lá 1 tuần phun 1 lần, bắt đầu từ thời điểm bắt đầu trồng cây đến khi cây đậu quả; Phân bón lá "Đầu Trâu": pha với nước, phun qua lá 1 tuần 1 lần. Loại 501: bắt đầu từ thời điểm trồng cây đến khi cây ra hoa; Loại 507: từ khi cây ra hoa đến khi cây đậu quả.

#### 2.2.7. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm trong phòng thí nghiệm được bố trí nhắc lại 3 lần mỗi công thức, mỗi lần 10 mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi được quan sát và đo đếm sau 5 tuần đối với các thí nghiệm nhân nhanh và 4 tuần với các thí nghiệm ra rễ. Các thí nghiệm ngoài vườn ươm

được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu, theo dõi cho đến khi đậu quả. Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình Excel và IRRISTART 4,0.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Nhân nhanh chồi dâu tây SmlA

##### 3.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng nhân nhanh chồi dâu tây

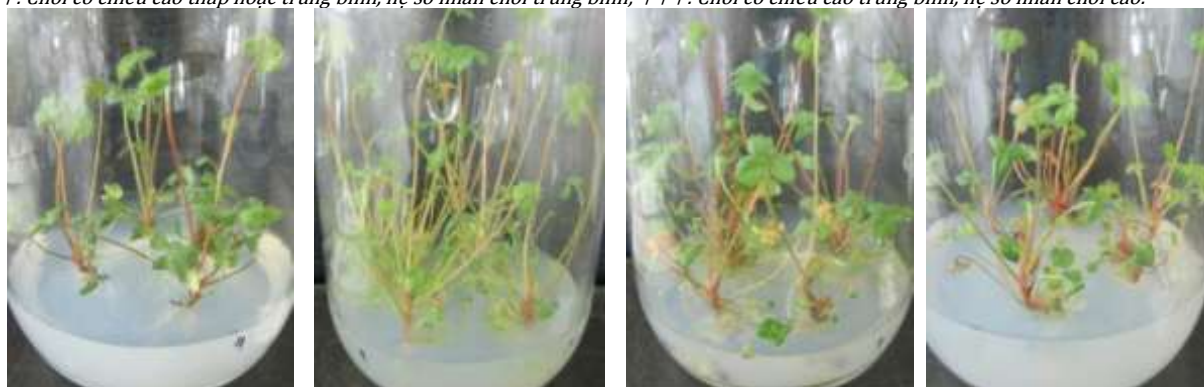
Trong môi trường *in vitro*, hàm lượng cytokinin cao sẽ làm giảm số lượng chồi/cụm chồi cũng như

chất lượng chồi, trong nhiều trường hợp dẫn đến hiện tượng thủy tinh hóa của cụm chồi (Wang *et al.*, 1984). Theo Kang *et al.* (1994), BA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp nhất trong việc nhân chồi từ mô lá của dâu tây *Fragaria × ananassa*. Kết quả tương tự cũng được báo cáo bởi Bhatt & Dhar (2000), BA có hiệu quả tốt nhất trong việc kích thích phát sinh chồi *in vitro* đối với dâu tây so với 2-ip và kinetin. Trong thí nghiệm này, dải nồng độ thấp của BA từ 0,1 mg/l đến 0,6 mg/l được bổ sung vào môi trường nuôi cấy MS để theo dõi khả năng nhân nhanh cũng như sinh trưởng của chồi dâu tây SmlA. Kết quả sau 5 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng nồng độ BA đến khả năng nhân nhanh chồi dâu tây *in vitro* sau 5 tuần nuôi cấy**

CT	Nồng độ BA (mg/l)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao TB (cm)	Nhận xét
CT1 (ĐC)	0,0	2,17	4,80	+
CT2	0,1	6,90	3,07	+
CT3	0,2	7,17	2,82	+
CT4	0,3	7,14	2,57	++
CT5	0,4	7,80	2,63	+++
CT6	0,5	7,37	2,43	+++
CT7	0,6	7,33	2,40	++
CV (%)		0,60	1,60	
LSD <sub>0,05</sub>		0,44	0,54	

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30 g/l Succrose + 7,0 g/l Agar, pH = 5,7 - 5,8; +: Chồi mảnh, chủ yếu phát triển về chiều cao, lá xanh nhạt; ++: Chồi có chiều cao thấp hoặc trung bình, hệ số nhân chồi trung bình; +++: Chồi có chiều cao trung bình, hệ số nhân chồi cao.

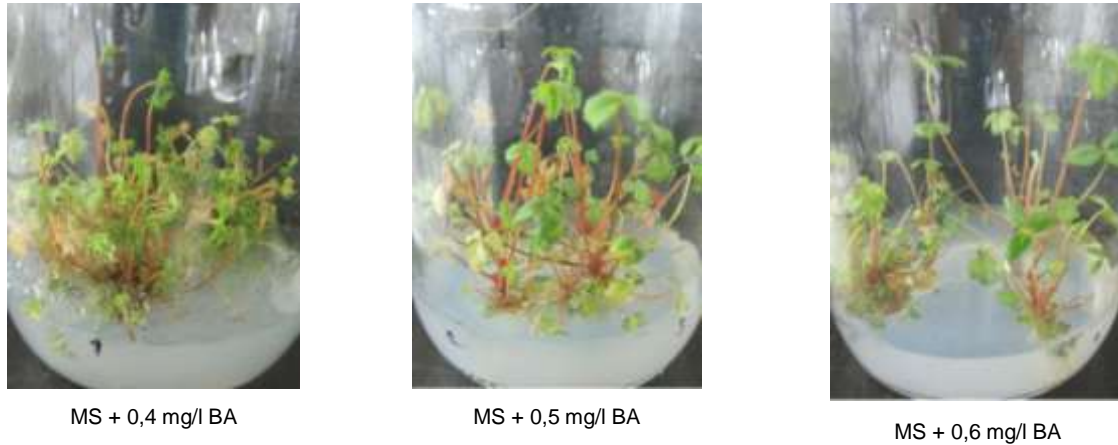


MS (ĐC)

MS + 0,1 mg/l BA

MS + 0,2 mg/l BA

MS + 0,3 mg/l BA



Hình 1. Chồi dâu tây *in vitro* trên môi trường chứa BA sau 5 tuần nuôi cấy

Kết quả ở thu được ở bảng 1 cho thấy BA có ảnh hưởng tốt đến hiệu quả nhân chồi trên giống dâu tây SMiA. Tất cả các công thức có bổ sung BA thì hệ số nhân chồi đều cao hơn so với công thức đối chứng 2 - 3 lần. Hệ số này tăng lên khi tăng nồng độ BA từ 0 - 0,4 mg/l, tuy nhiên chững lại và giảm nhẹ khi nồng độ BA tăng lên đến 0,5 - 0,6 mg/l. Công thức môi trường có bổ sung 0,4 mg/l BA cho hệ số nhân cao nhất (7,8 chồi/mẫu), chồi có chiều cao đồng đều, cây chắc khỏe. Bên cạnh đó, chiều cao chồi có xu hướng giảm khi nồng độ BA tăng (Bảng 1).

Ảnh hưởng nồng độ thấp BA đến khả năng nhân nhanh của cây dâu tây đã được công bố trong nhiều báo cáo (Marcotrigiano *et al.*, 1984; Mahmood *et al.*, 1994; Ashirafuzzaman *et al.*, 2013). Các kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra rằng nồng độ thấp của BA (0,5 mg/l) mang lại hiệu quả nhân chồi dâu tây tốt hơn so với nồng độ BA cao ở mức 2 - 3 mg/l khi sử dụng đoạn thân chứa mắt. Kết quả nghiên cứu của Phạm Xuân Tùng và Phạm Thị Lan (2009) trên chồi đỉnh giống dâu tây Angelique (Mỹ đá) cho thấy nồng độ BA 0,4 - 0,6 mg/l kích thích tốt sự tạo chồi. Trong công bố gần đây, Nguyễn Trần Đông Phương và Bùi Thị Thu Hằng (2017) cũng đã chỉ ra nồng độ 0,6 mg/l BA thích hợp cho sự tạo chồi có nguồn gốc từ hạt dâu tây New Zealand. Kết quả của các tác giả đưa ra đều có mức nồng độ BA tương đồng hoặc cao hơn một chút với kết quả nghiên cứu hiện tại (0,4 mg/l BA). Mặt khác, Sakila *et al.* (2007) và Ara *et al.* (2013) lại chỉ ra rằng hệ số nhân chồi dâu tây cao nhất đạt được trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BA khi sử dụng thân bò có chứa mắt làm vật liệu nuôi cấy. Sự khác biệt này có thể là do phản ứng giống (genotype) và điều kiện sinh lý khác nhau của mẫu cấy. Việc tìm ra công thức với nồng độ BA thấp (0,4 mg/l) mà vẫn cho hệ số nhân chồi cao đã giúp giảm đáng kể chi phí trong bước nhân nhanh cây dâu tây *in vitro*. Do vậy, 0,4 mg/l được lựa chọn là

nồng độ BA tốt nhất để nhân chồi dâu tây và được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.

### 3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BA và $\alpha$ -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi dâu tây

Hầu hết ở cơ thể sinh vật, các chất điều hòa sinh trưởng thường tương tác với nhau để tạo ra những ảnh hưởng cuối cùng trong mọi quá trình sinh trưởng, phát triển (Gaspar *et al.*, 1996). Sự kết hợp giữa BA và  $\alpha$ -NAA thúc đẩy cảm ứng tạo chồi và nhân chồi đã được công bố ở nhiều loại cây như hoa hồng (Carelli *et al.*, 2002; Pati *et al.*, 2006); một số cây thảo dược như *Rauwolfia tetraphylla* (Faisal & Anis 2002); *Psoralea corylifolia* (Anis & Faisal 2005); *Asteracantha longifolia* (Panigrahi *et al.*, 2007). Theo nghiên cứu của Bhatt & Dhar (2000) và Hasan *et al.* (2010) môi trường nhân nhanh chồi dâu tây tốt nhất đạt được trên môi trường có bổ sung BA kết hợp  $\alpha$ -NAA. Trên cơ sở đó, nồng độ 0,4 mg/l BA tốt nhất thu được ở nghiên cứu trước được kết hợp với  $\alpha$ -NAA ở nồng độ thấp từ 0 - 0,5 mg/l. Việc bổ sung  $\alpha$ -NAA vào các công thức thí nghiệm làm giảm hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi một cách rõ rệt. Về cơ bản, các thông số đã giảm theo chiều tăng của nồng độ  $\alpha$ -NAA từ 0 - 0,5 mg/l. Cụ thể, hệ số nhân giảm dần từ 3,03 chồi/mẫu công thức bổ sung 0,4mg/l BA và 0,1 mg/l  $\alpha$ -NAA xuống còn 1,94 chồi/mẫu ở công thức 0,4 mg/l BA và 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA, các chồi hình thành có xu hướng hình thành cụm nhỏ, không phát triển về chiều cao và đặc biệt có sự hình thành callus ở gốc (Hình 3).

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy rằng việc kết hợp BA và  $\alpha$ -NAA không đem lại hiệu quả trong nhân nhanh chồi dâu tây SMiA. Kết quả này trái với những nhận định của Uppadhaya & Chandra (1983) rằng BA kết hợp với auxin thúc đẩy sự hình thành chồi ở nhiều loại cây. Sự khác biệt này có thể do

hiều nguyên nhân như phản ứng đặc thù của giống hoặc sự hình thành callus là một trong các nguyên nhân ức chế sự nhân chồi ở giống dâu tây SmiA. Theo kết quả nghiên cứu của Biswas *et al.* (2007), tỷ lệ hình thành mô sẹo tỷ lệ thuận với việc tăng nồng độ  $\alpha$ -NAA trong môi trường nuôi cấy. Ara *et al.* (2012) cũng thu được kết quả tương tự, phản ứng tạo mô sẹo tốt nhất đạt được trên môi trường bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA khi quá trình nhân chồi.

### 3.2. Tạo cây hoàn chỉnh

#### 3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của $\alpha$ -NAA đến khả năng ra rễ của chồi dâu tây

Sự phát triển khỏe mạnh của hệ rễ cây con trong nuôi cấy *in vitro* là điều kiện thiết yếu cho sự phát triển tốt của cây con trong điều kiện nhà

**Bảng 2. Ảnh hưởng của BA kết hợp  $\alpha$ -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi cây dâu tây sau 5 tuần**

Công thức	Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ $\alpha$ -NAA (mg/l)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi TB (cm)	Nhận xét
CT1 (ĐC)	0,4	0,0	7,80	2,63	++
CT2	0,4	0,1	3,03	0,83	+
CT3	0,4	0,2	2,61	0,68	+
CT4	0,4	0,3	2,61	0,74	+
CT5	0,4	0,4	2,52	0,71	+
CT6	0,4	0,5	1,94	0,77	+
CV (%)			1,80	1,50	
LSD <sub>0,05</sub>			0,85	0,24	

Ghi chú: Nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar, pH = 5,7 - 5,8; + Chồi mảnh, hệ số nhân chồi thấp, xuất hiện callus ở gốc chồi; ++ Chồi mảnh, hệ số nhân chồi cao, lá xanh, không xuất hiện callus



0,4 mg/l BA      0,4 mg/l BA + 0,1 mg/l  $\alpha$ -NAA      0,4 mg/l BA + 0,2 mg/l  $\alpha$ -NAA      0,4 mg/l BA + 0,3 mg/l  $\alpha$ -NAA      0,4 mg/l BA + 0,4 mg/l  $\alpha$ -NAA      0,4 mg/l BA + 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA

**Hình 2. Chồi dâu tây trên môi trường chứa BA và  $\alpha$ -NAA sau 5 tuần**

lưới và trên đồng ruộng. Vật liệu thí nghiệm này là những chồi đơn, cao 2,5 - 3,5 cm được tách ra từ những cụm chồi nhân nhanh. Ảnh hưởng của  $\alpha$ -NAA và IBA ở nồng độ 0 - 0,75 mg/l đến khả năng ra rễ của chồi dâu tây SmiA đã được nghiên cứu. Tuy nhiên, trên môi trường có bổ sung IBA, tất cả các thông số liên quan đến sự hình thành rễ đều thấp. Cụ thể tỷ lệ chồi ra rễ đạt từ 19,44 - 54,78%; các rễ hình thành ngắn (nhỏ hơn 1 cm); số rễ trung bình ít, điều này sẽ ảnh hưởng đến khả năng sống sót của cây con ngoài vườn ươm (số liệu không được chỉ ra ở bài báo này).

Ở thí nghiệm này, các chồi dâu tây không tạo rễ trên môi trường nền MS. Tất cả các công thức có bổ sung  $\alpha$ -NAA từ nồng độ 0,25 - 0,75 mg/l đều cho tỷ lệ tạo rễ đạt 100% sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 3). Tuy nhiên, số rễ trung bình, chiều dài rễ trung bình có xu hướng giảm khi nồng độ  $\alpha$ -NAA tăng. Như vậy, nồng

độ  $\alpha$ -NAA cao trong môi trường sẽ ức chế khả năng hình thành rễ dâu tây SmiA. Môi trường nuôi cấy bổ sung 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA cho số rễ trung bình và chiều dài rễ trung bình đạt cao nhất tương ứng 9,23 rễ/chồi và 1,64 cm. Về đặc điểm bộ rễ, trên môi trường chứa  $\alpha$ -NAA, các rễ hình thành tương đối muộn, chiều dài trung bình rễ tương đối ngắn, các chồi đều xuất hiện callus ở gốc (Hình 3). Kết quả thu được cho thấy dâu tây SmiA có phản ứng rất nhạy cảm với sự có mặt của  $\alpha$ -NAA, gợi ý rằng một nồng độ  $\alpha$ -NAA thấp hơn 0,25 mg/l trong môi trường nuôi cấy có thể giảm hiện tượng hình thành callus ở gốc chồi.

#### 3.2.2 Nghiên cứu ảnh hưởng của các phương thức nuôi cấy đến khả năng ra rễ của chồi dâu tây *in vitro*

Để thuận tiện cho quá trình ra cây ngoài nhà lưới, hạn chế tối đa tổn thương rễ trong việc loại bỏ



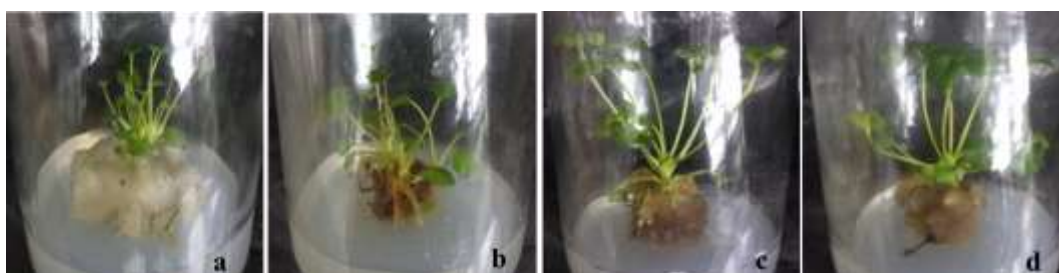
agar, nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra phương thức nuôi cấy phù hợp đối với sự ra rễ *in vitro*. Nền môi trường MS bổ sung 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA

được sử dụng với các phương thức nuôi cấy trên môi trường đặc, bán lỏng và

**Bảng 3. Ảnh hưởng của  $\alpha$ -NAA đến khả năng ra rễ của chồi dâu tây sau 4 tuần**

Công thức	Nồng độ $\alpha$ -NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài TB (cm)	Nhận xét
CT1 (ĐC)	0	0	-	-	-
CT2	0,25	100	9,23	1,64	++
CT3	0,5	100	8,96	1,52	++
CT4	0,75	100	8,16	0,67	+
CV (%)				2,70	
LSD <sub>0,05</sub>				0,19	

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30 g/l Succrose + 7,0 g/l Agar; - Không xuất hiện rễ; + Rễ ngắn, mảnh, xuất hiện khá muộn; ++ Rễ to, khỏe



**Hình 3. Sự hình thành callus trên môi trường nhân nhanh và ra rễ cây dâu tây SMIA**

Ghi chú: (a; b) Môi trường nhân nhanh (a) 0,4 mg/l BA + 0,1 mg/l  $\alpha$ -NAA; (b) 0,4 mg/l BA + 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA (c; d) Môi trường ra rễ (c) 0,5 mg/l  $\alpha$ -NAA; (d) 0,4 mg/l BA + 0,75 mg/l  $\alpha$ -NAA

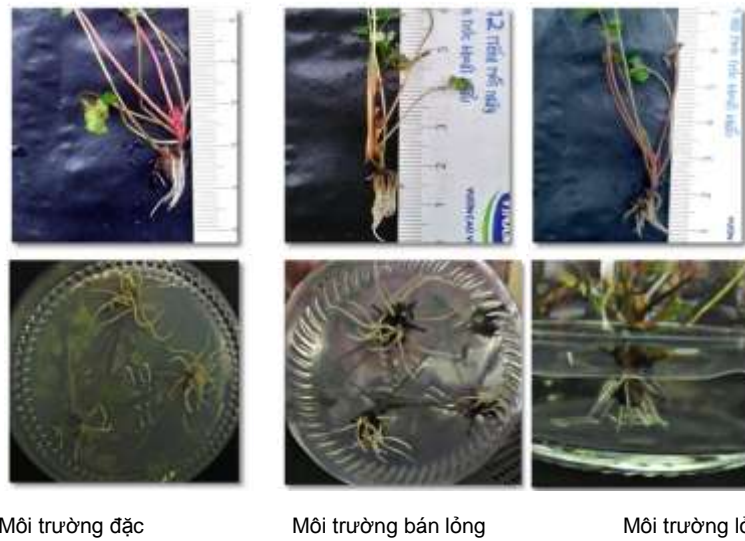
lông. Kết quả bảng 4 chỉ ra, tất cả các công thức đều cho tỷ lệ ra rễ khá cao trên 80%, trên môi trường đặc và bán lỏng tỷ lệ ra rễ đạt 100%. Kiểu nuôi cấy trên môi trường bán lỏng cho số lượng rễ trung bình cao nhất (12,37 rễ/mẫu) và chất lượng rễ tốt nhất, rễ xuất hiện sớm, to, khỏe và phát triển

nhanh hơn so với hai công thức còn lại, hơn nữa hạn chế được sự xuất hiện callus ở gốc rễ. Chất lượng rễ giảm khi môi trường hoàn toàn không có agar, rễ ngắn, mảnh, số lượng rễ thấp nhất (7,72 rễ/mẫu) (Hình 4).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của các phương thức nuôi cấy đến khả năng ra rễ của chồi dâu tây *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy**

CT	Phương thức nuôi cấy	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài TB (cm)	Nhận xét
CT1 (ĐC)	Môi trường rắn	100	9,47	1,52	++
CT2	Môi trường bán lỏng	100	12,36	1,49	+++
CT3	Môi trường lỏng	83,33	7,83	0,91	+
CV (%)				2,1	
LSD <sub>0,05</sub>				0,54	

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA; + Rễ ngắn, mảnh; ++ Rễ to, khỏe, +++ Rễ xuất hiện sớm, to, khỏe.



Hình 4. Rễ và chồi dâu tây *in vitro* ở các phương thức nuôi cấy khác nhau sau 4 tuần

### 3.3. Đánh giá khả năng sinh trưởng, phát triển của cây dâu tây ngoài nhà lưới

#### 3.3.1 Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỉ lệ sống và sự phát triển của cây dâu tây ngoài nhà lưới

Giá thể để trồng cây là một yếu tố rất quan trọng trong việc tạo điều kiện thích nghi cho cây ngoài vườn ươm. Cây *in vitro* đạt tiêu chuẩn chiều cao từ 3,0 - 3,5 cm, có từ 4 - 5 lá, bộ rễ khỏe, sinh trưởng tốt thì bắt đầu chuyển ra ngoài nhà lưới.

Tỷ lệ sống sót của cây dâu tây *in vitro* sau khi thích nghi ngoài vườn ươm khá cao, từ 86,67 - 93,33% sau 1 tháng ra cây (Bảng 5). Cây dâu tây sinh trưởng phát triển tốt trên hầu hết các giá thể. Trên giá thể xơ dừa, cây con đạt chiều cao cây trung bình thấp nhất (3,16 cm). Tuy tỷ lệ sống sót của cây con trên CT4 (1 Xơ dừa : 3 Xỉ than: 2 Đất phù sa) và CT5 (1 Đất phù sa : 1 Trấu tươi) thấp hơn 3 công thức trước đó, nhưng các cây sống sót sinh trưởng phát

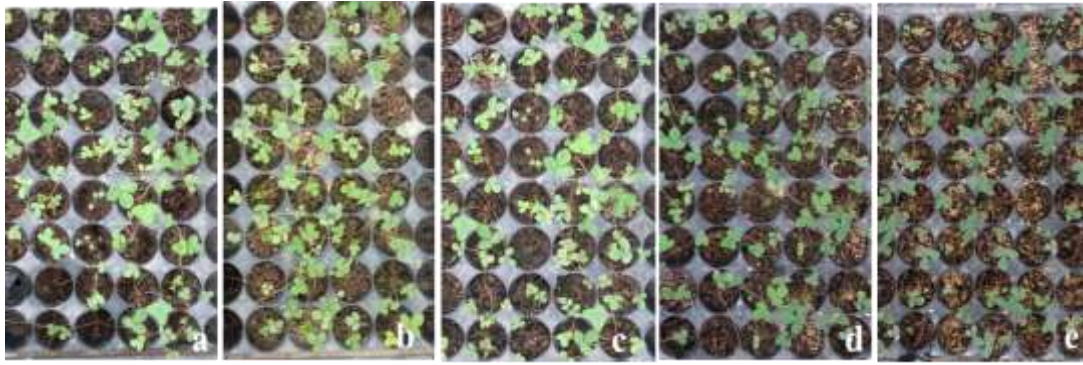
triển tốt với chiều cao lần lượt là 4,44 cm và 4,21 cm. Do vậy để thuận tiện cho việc ra cây cũng như để giảm chi phí, ra cây trên giá thể đất phù sa là phù hợp. Moradi *et al.* (2011) ghi nhận kết quả 100% cây dâu tây *in vitro* sống sót sau khi chuyển ra ngoài điều kiện tự nhiên. Giá thể đất cũng được Ara *et al.* (2013) sử dụng để thích ứng cây ngoài nhà lưới (Hình 5).

#### 3.3.2 Ảnh hưởng của các loại phân bón đến sức sống và sự phát triển của cây dâu tây

Cây dâu tây sau giai đoạn thích ứng ngoài điều kiện tự nhiên muốn sinh trưởng và phát triển tốt cần được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng. Nghiên cứu ảnh hưởng của các loại phân bón đến sức sống và sự phát triển của cây dâu tây được tiến hành nhằm tìm ra được loại phân bón và chế độ bón phân thích hợp. Cây dâu tây khỏe mạnh sau 1 tháng ra cây ở nghiên cứu trước được tiến hành chuyển sang trồng

Bảng 5. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỉ lệ sống và sự phát triển của cây dâu tây ngoài nhà lưới sau 1 tháng ra cây

Công thức	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây TB (cm)
CT1 (ĐC)	Xơ dừa	93,33	3,16
CT2	Đất phù sa	93,33	4,43
CT3	Xơ dừa : Đất phù sa (1:1)	93,33	4,22
CT4	Xơ dừa : Xỉ than: Đất phù sa (1:3:2)	90,00	4,44
CT5	Đất phù sa : Trấu tươi (1:1)	86,67	4,21
CV (%)			0,3
LSD <sub>0,05</sub>			0,23



**Hình 5. Cây dâu tây giá thể đất khác nhau sau 1 tháng ra cây**

Ghi chú: (a) Xơ dừa (b) Đất phù sa (c) Xơ dừa : đất phù sa (d) Xơ dừa : xỉ than : đất phù sa (e) Đất phù sa : Trấu tươi.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của các loại phân bón đến sức sống và sự phát triển của cây dâu tây**

Công thức	Loại phân bón	Chiều cao cây TB (cm)
CT1 (ĐC)	Không bón phân	5,52
CT2	NPK	10,00
CT3	NPK kết hợp Phân bón lá Dầu trầu	14,90
CT4	NPK kết hợp Atonik	19,13
CV (%)		0,6
LSD <sub>0,05</sub>		0,14



**Hình 6. Cây dâu tây giống SMiA ngoài nhà lưới**

Ghi chú: (a) Cây dâu tây sau 1 tháng ra cây (b) Cây dâu tây sau 1 tháng chăm sóc (c) Phân hóa hình thành nụ hoa (d) Hoa nở sau 20-25 ngày (e) Quả hình thành (f) Quả chín sau 30-35 ngày

chậu vào tháng 10. Sau 1 tháng chăm sóc, các cây ở các công thức có bón phân sinh trưởng nhanh, khỏe hơn so với công thức đối chứng (không bón phân). Ở các công thức phân bón khác nhau thì sự phát triển của cây biến đổi rõ rệt. Cây phát triển tốt nhất ở công thức có bón phân NPK kết hợp Atonik với chiều cao cây trung bình đạt 19,13 cm và bắt đầu có hiện tượng phân hóa hình thành nụ hoa. Hoa nở sau 20 - 25 ngày phân hóa nụ hoa và quả chín sau 30 -

35 ngày với hình thái như mong đợi, quả hình tim, đỏ mọng và thơm.

#### 4. KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l BA cho hiệu quả nhân nhanh chồi dâu tây SMIa tốt nhất hệ số nhân chồi cao nhất đạt 7,8 chồi/mẫu sau 5 tuần. Sử dụng môi trường MS bán lỏng bổ sung 0,25 mg/l  $\alpha$ -NAA, cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, trung bình có 12,36



rễ/chồi, chiều dài trung bình rễ đạt 1,49 cm, rễ hình thành sớm, to, khỏe. Giá thể tiếp nhận cây *in vitro* thích hợp là đất phù sa cho tỷ lệ sống sót của cây là 93,33% sau 4 tuần, cây sinh trưởng, phát triển khỏe mạnh. Cây phát triển tốt nhất ở công thức có bón phân NPK kết hợp Atonik, với chiều cao cây trung bình đạt 19,13 cm. Hoa nở sau 20 - 25 ngày hình thành nụ và quả chín sau 30 - 35 ngày.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Học viện, mã số T2017- 12- 78.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anis M, Faisal M. (2005). *In vitro* regeneration and mass multiplication of *Psoralea corlyifolia*- an endangered medicinal plant. Indian J Biotechnol., 4: 261-264.
- Ara T., Karim MR., Aziz MA, Karim R., Islam R., Hossain M. (2013). Micropropagation and field evaluation of seven strawberry genotypes suitable for agro-climatic condition of Bangladesh. African Journal of Agricultural Research, 8(13): 1194-1199.
- Ara T., Karim R., Karim MR., Islam R., Hossain M. (2012). Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). International Journal of Biosciences, 2(10): 93-100.
- Ashrafuzzaman M., Faisal S.M., Yadav D., Khanam D., and Raihan F. (2013). Micropropagation of strawberry (*fragaria ananassa*) through runner culture. Bangladesh J. Agril. Res., 38(3): 467-472.
- Ashrafuzzamanm, M., S. Faisal, D. Yadav, D. Khanam and F. Raihan (2013). Micropropagation of strawberry (*Fragaria X Ananassa*) through runner culture, 38: 467- 472.
- Bhatt ID., and Dhar U. (2000). Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 83-88.
- Biswas MK., Hossain M., Ahmed MB., Roy UK., Karim R., Razvy MA., Salahin M., and Islam R. (2007). Multiple Shoots Regeneration of strawberry under various colouril Illuminations. American Eurasian Journal of Scientific Research, 2: 133-135.
- Carelli BP, and Echeverrigaray S. (2002). An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Scientia Horticulturæ 92: 69 -74.
- Faisal M, Anis M. (2002). Rapid *in vitro* propagation of *Rauvolfia tetraphylla* L. - an endangered medicinal plant. Physiol Mol Biol Plants, 8: 295-299.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H and Reid DM (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 32(4): 272-289.
- Hasan M.N., Nigar S., Rabbi M.A.K., Mizan S.B., Rahman M.S. (2010). Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Int. J. Sustain. Crop Prod., 5(4): 36-41.
- Haymes KM., and Davis TM. (1998). Agrobacterium-mediated transformation of 'Alpine' *Fragaria vesca*, and transmission of transgenes to R1 progeny. Plant Cell Reports, 17: 279-283.
- Haymes KM., Henken B., Davis T., Van de Weg WE. (1997) Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (Rpf1) in the cultivated strawberry. Theoretical and applied genetics, 94: 1097-1101.
- Kang KY, Ha SH, Jeong HB, Jeong JS & Lee SS (1994). Study on the tissue culture of strawberry (*Fragaria x ananassa*) 2. Organ differentiation and virus free stock production from petiole tissue culture. R.D.A. J. Agricul. Sci. Biotechnol., 36(2): 193-198.
- Mahmood, S., H. Rashid, A. Quraishi, N. Iqbal, S.S. Arjumand (1994). Clonal propagation of strawberry through tissue culture. Pakistan J. Agric Res., 15(1).
- Mansouri IE., Mercado JA., Valpuesta V., Lopez-Aranda JM., PliegoAlfaro F., Quesada MA. (1996). Shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. Plant Cell Reports, 15: 642 - 646.
- Marcotrigiano M, Swartz HJ; Gray SE; Tokarcik D and Popenoe J (1984). The effect of benzylamino purine on the *in vitro* multiplication rate and subsequent field performance of tissue culture-propagated strawberry plants, Adv, Strawberry Prod, 3: 23-25.
- Marcotrigiano, M., H.J. Swartz, S.E. Gray, D.Tokaricky and J. Popenoe (1984). The effect of benzylaminopurine on the *in vitro* multiplication rate and subsequent field performance of tissue culture propagation strawberry plant. Adv. Strawberry Prod., 3 (Spring): 23-25.
- Moradi K., Otroshy M., and Azimi MR. (2011). Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. Journal of Agricultural Technology, 7(6): 1755-1763.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth bioassaywith tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-479.
- Nguyễn Trần Đông Phương và Bùi Thị Thu Hằng (2017). Bước đầu nhân giống cây dâu tây New Zealand *fragaria ananasa* L. từ hạt. Tạp chí Khoa học, Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh, 55(4).

- Oosumi T., Gruszewski HA, Blischak LA, Baxter AJ, Wadl PA, Shuman JL, Veilleux RE, Shulaev V. (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223: 1219-1230.
- Panigrahi J, Behera M, Maharana S, Mishra RR. (2007). Biomolecular changes during *in vitro* organogenesis of *Asteracantha longifolia* (L.) Nees--a medicinal herb. *Indian J Exp Biol.*, 45(10): 911-9.
- Pati PK, Path SP, Sharma M, Sood A, and Ahura PS. (2006). *In vitro* propagation of rose - a review. *Biotechnology Advances*, 43: 95-100.
- Phạm Xuân Tùng, Phạm Thị Lan (2009). Ảnh hưởng của biện pháp xử lý khử trùng mẫu và các yếu tố môi trường trong nhân nhanh giống dâu tây *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 7(3): 112-117.
- Sakila S., Ahmed MB., Roy UK., Biswas MK., Karim R., Razvy MA., Hossain M., Islam R., Hoque A. (2007). Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2: 151-154.
- Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, Jaiswal P, Mockaitis K, Liston A, Mane SP, Burns P, Davis TM, Slovin JP, Bassil N, Hellens RP, Evans C, Harkins T, Kodira C, Desany B, Crasta OR, Jensen RV, Allan AC, Michael TP, Setubal JC, Celton JM, Rees DJ, Williams KP, Holt SH, Ruiz Rojas JJ, Chatterjee M, Liu B, Silva H, Meisel L, Adato A, Filichkin SA, Troggio M, Viola R, Ashman TL, Wang H, Dharmawardhana P, Elser J, Raja R, Priest HD, Bryant DW Jr, Fox SE, Givan SA, Wilhelm LJ, Naithani S, Christoffels A, Salama DY, Carter J, Lopez Girona E, Zdepski A, Wang W, Kerstetter RA, Schwab W, Korban SS, Davik J, Monfort A, Denoyes-Rothan B, Arus P, Mittler R, Flinn B, Aharoni A, Bennetzen JL, Salzberg SL, Dickerman AW, Velasco R, Borodovsky M, Veilleux RE, Foltá KM (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Natural Genetic*, 43(2): 109-16. doi: 10.1038/ng.740.
- Slovin JP., Schmitt K., & Foltá KM. (2009). An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the *Rosaceae*. *Plant Methods*, 5: 15.
- Uppadhyaya S & Chandra N (1983). Shoot and plantlets formation in organ and callus cultures of *Albizia lebbek* Benth. *Ann. Botany*, 52: 421-424.
- Wang DY., Wergin WP., and Zimmerman RH. (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *Horticultural Science*, 19: 71-72.
- Zakaria H., Hussein GM., Abdel Hadi A Abdel Hadi, and Abdallah NA (2014). Improve regeneration and transformation protocols for three strawberry cultivar. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, 5: 1, 27-35.