

NHÂN NHANH IN VITRO DÂU TÂY (*Fragaria* × *ananassa* Duch) GIỐNG “SUNRAKU” NHẬP NỘI TỪ NHẬT BẢN

Nguyễn Xuân Trường^{1,2}, Trần Thị Mỹ Duyên², Đỗ Thị Mai¹, Nguyễn Thanh Hải^{2*}

¹*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: nthaicnsh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 02.03.2021

Ngày chấp nhận đăng: 19.07.2021

TÓM TẮT

Với mục đích tạo cây giống sạch bệnh, đồng đều với số lượng lớn để cung cấp cho sản xuất trong thời gian ngắn, nghiên cứu này đánh giá sự ảnh hưởng của HgCl₂ (mercuri chloride), BA (N⁶-benzyladenine), Pic (picloram), TDZ (thidiazuron), kinetin, IBA (indole-3-butanoic acid), α-NAA (α-naphthaleneacetic acid) ở các nồng độ khác nhau đến khả năng nhân nhanh *in vitro* của giống dâu tây Sunkaru. Kết quả nghiên cứu cho thấy khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch bệnh là 100% sau khi đưa vào nuôi cấy trên môi trường MS, môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/l BA kết hợp 0,3 mg/l IBA cho hệ số nhân chồi cao nhất (23,1 chồi/mẫu) với chất lượng tốt. Môi trường ½ MS kết hợp với 0,3 mg/l α-NAA là tốt nhất cho chồi ra rễ (18,6 rễ/chồi). Nghiên cứu cũng cho thấy cây *in vitro* có tỷ lệ sống cao nhất (đạt 100%) và phát triển tốt khi trồng trên hỗn hợp giá thể (1 đất : 2 trấu hun : 1 xơ dừa). Số lượng nhiễm sắc thể ($2n = 8x = 56$) của cây tái sinh tương tự cây mẹ.

Từ khóa: Dâu tây, Sunraku, nhân nhanh, nhiễm sắc thể, tay bò.

In Vitro Micropropagation of Strawberry CV. Sunraku Introduced from Japan

ABSTRACT

With the aim of creating disease-free, homogeneous seedlings for growers in large quantity in a short time, this study evaluates the effect of the HgCl₂ (mercury chloride), BA (N⁶-benzyladenine), Pic (picloram), TDZ (thidiazuron), kinetin, IBA (indole-3-butanoic acid), and α-NAA (α-naphthaleneacetic acid) at different concentrations on *in vitro* propagation of strawberry cv. Sunraku. Research results showed that using 0.1% HgCl₂ for five minutes gave 100% disease-free samples on the MS medium. MS medium supplemented with 0.75 mg/l BA and 0.3 mg/l IBA gave the highest shoot number (23.1 shoots per explant) and good quality. Half MS medium combined with 0.3 mg/l α-NAA was the best medium for rooting (18.6 roots per shoot). The research also showed that *in vitro* seedlings have the highest survival rate (100%) and best development when they were grown on a mixed substrate (1 soil : 2 burn rice husks : 1 coconut fiber). The number of chromosomes ($2n = 8x = 56$) of regenerated plants was similar to that of the mother plant.

Keywords: Shromosome, micropropagation, runner, strawberry, cv. Sunraku.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây dâu tây (*Fragaria* × *ananassa* Duch) hay còn gọi là dâu đất thuộc họ Hoa hồng (*Rosacea*). Quả dâu tây cung cấp nhiều chất dinh dưỡng như canxi, sắt, photpho, kali, và các loại vitamin cần thiết cho cơ thể con người như vitamin A, B1, B2 và đặc biệt là lượng vitamin C khá cao, hơn cả cam, dưa hấu (Nehra & cs., 1994). Ngoài ra, dâu

tây còn chứa hai nhóm chất oxy hóa rất tốt là flavonoid và anthocyanine, do đó, quả dâu tây có khả năng giúp tăng sức đề kháng, giảm stress, chống nhiễm trùng, nhiễm độc, cảm cúm (Cocco & cs., 2015).

Dâu tây có 2 loại khác nhau, một loại phản ứng với ngày ngắn (*short day* = *SD*, tức là cây chỉ ra hoa trong điều kiện ngày ngắn), một loại phản ứng trung tính với ánh sáng

(*neutral-day* = *ND*, tức là cây ra hoa không phụ thuộc vào thời gian chiếu sáng trong ngày). Do vậy những giống dâu tây phản ứng với ngày ngắn chỉ ra hoa được một lần/năm, ngược lại những giống phản ứng trung tính với ánh sáng có thể ra hoa nhiều lần/năm (Douglas & Thomas, 2005; Ruan & cs., 2009). Một đặc điểm nổi trội nữa là những giống phản ứng trung tính với ánh sáng còn có thể sinh trưởng phát triển tốt ở nhiệt độ cao và ẩm. Việc du nhập và nhân nhanh các giống dâu tây có phản ứng trung tính với ánh sáng vào trồng ở nước ta là điều cần thiết, nhất là ở những vùng có khí hậu nóng ẩm như đồng bằng sông Hồng.

Dâu tây có thể được nhân giống bằng tay bò hoặc nuôi cấy mô. Cây giống nhân bằng tay bò có giá thành thấp, nhưng hệ số nhân thấp và tiềm ẩn nhiều rủi ro về bệnh (Dijkstra, 1993; Quiroz & cs., 2017). Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô trong nhân nhanh dâu tây đã đem lại cuộc cách mạng về sản xuất dâu tây trên toàn cầu ở quy mô công nghiệp (Boxus, 1989; Martinelli, 1992; Kikas & cs., 2006; Palei & cs., 2015). Tuy nhiên, khi cây nuôi cấy mô được đưa ra ngoài trồng cũng có một số biểu hiện không bình thường như chiều cao cây thấp, cuống lá ngắn, lá không mở, hoa ra sớm, hạt phấn không nảy mầm, quả méo mó (Larkin & Scowcroft, 1981; Patnaik & cs., 1999; Kaushal & cs., 2004). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng trong quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật, cây tái sinh có sự thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể (Larkin & Scowcroft, 1981; Kaeppler & cs., 2000; Neelakandan & Wang, 2012; Kovarik & cs., 2012). Cây tái sinh có thể thay đổi đội bội so với cây mẹ, hoặc nhiễm sắc thể bị mất đoạn, thêm đoạn (Hang & Bregitzer, 1993; Al-Zahim & cs., 1999; Joachimiak & Ilnicki, 2003; Arora & cs., 2006; Gernand & cs., 2007). Nguyên nhân có thể là do môi trường nuôi cấy, nồng độ chất điều tiết sinh trưởng, tuổi của mẫu cấy, loại mô đưa vào nuôi cấy (Peschke & Phillips, 1992; Truong & cs., 2012; Kim & cs., 2019; Kim & cs., 2020).

Giống dâu tây Sunraku có nguồn gốc từ Nhật Bản thuộc loại phản ứng trung tính với ánh sáng, giống có sức sinh trưởng khỏe, chống chịu nấm phấn trắng, quả có màu đỏ tươi, thịt

quả chắc và ngọt. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh *in vitro* cũng như sự đồng nhất của cây tái sinh so với cây mẹ thông qua đếm nhiễm sắc thể.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống dâu tây Sunraku được trang trại Nông Trang Xanh (Vân Hồ, Mộc Châu, Sơn La) nhập nội từ Nhật Bản năm 2017 và trồng trong nhà có mái che tại Mộc Châu, Sơn La.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Tay bò được lấy từ cây mẹ 2 năm tuổi trồng trong nhà màn có mái che, sau đó được rửa sạch dưới vòi nước và làm khô bằng giấy thấm trước khi đưa mẫu vào khử trùng. Mẫu có chứa chồi được rửa bằng nước xà phòng, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng, tiếp theo mẫu được ngâm trong cồn 70 độ trong thời gian 1 phút, sau đó rửa bằng nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu tiếp tục được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% ở các thời gian khác nhau (2 phút, 3 phút, 4 phút, 5 phút và 7 phút), sau đó rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu được thấm khô bằng giấy thấm vô trùng, sau đó mẫu được tách bỏ phần lá bao bên ngoài bằng dao trước khi cấy vào môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 2% sucrose (được sản xuất bởi công ty mía đường Miền Bắc) và 0,45% agar (được sản xuất bởi Công ty TNHH Sản xuất Thương mại Dịch vụ Phan Trần), pH 5,7.

2.2.2. Tái sinh và nhân nhanh chồi

Lựa chọn các chồi đơn có chiều cao trung bình 2-3cm, sinh trưởng khỏe, lá xanh đậm sau đó cấy trên môi trường MS + 2% sucrose + 4,5% agar và các chất điều tiết sinh trưởng khác nhau (BA, Pic, TDZ, kinetin, BA, IBA), ở các nồng độ khác nhau (0,0 mg/l; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0).

2.2.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Sau 4 tuần nuôi, các chồi đơn có chiều cao trung bình 2,5-3 cm, có từ 3-4 lá, lá xanh đậm

được tách riêng rẽ và cấy vào môi trường MS ở các nồng độ khác nhau (1 MS; MS; MS) cũng như bổ sung α -NAA ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,3, 0,5 mg/l).

2.2.4. Thích nghi cây ở vườn ươm

Cây cấy mô cao từ 3-4cm, có 3-5 lá và có từ 3-5 rễ được lựa chọn để đưa ra ngoài vườn ươm từ 2-3 ngày (giữ cây trong bình) nhằm mục đích tạo sự thích nghi của cây với điều kiện bên ngoài. Sau đó cây *in vitro* được lấy ra khỏi bình và được rửa sạch môi trường nuôi cấy dưới vòi nước chảy, tiếp theo cây được xử lý bằng thuốc Ridomil Gold 68WG (được sản xuất bởi Công ty Syngenta) để phòng nấm khuẩn. Cây được trồng trên các loại giá thể khác nhau (đất phù sa; xơ dừa; trấu hun) với tỷ lệ phối trộn khác. Thí nghiệm được tiến hành vào đầu tháng 10, cây được che nắng và tưới nước 3 lần/ngày đến khi cây xuất hiện lá mới.

2.2.5. Kiểm tra nhiễm sắc thể của cây tái sinh

Xác định số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh được tiến hành theo phương pháp của Nguyen & cs. (2015). Đầu rễ của cây tái sinh ở vườn ươm được lấy vào lúc 5 giờ chiều. Đầu rễ được ngâm vào dung dịch 8-hydroxyquinoline 2 mMol trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau được tiếp tục giữ ở nhiệt độ 4°C trong 15 tiếng. Đầu rễ được rửa sạch bằng nước cất từ 4-5 lần, sau đó được ngâm trong dung dịch etanol + acetic acid (tỷ lệ 3:1 theo thể tích) ở nhiệt độ phòng trong thời gian 40 phút. Tiếp theo, đầu rễ được ngâm trong HCl 1N trong 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ngâm trong bể ổn nhiệt 60°C trong 10 phút, sau đó rửa bằng nước cất từ 2 đến 3 lần. Tiếp đầu rễ (dài 2-3mm) được ngâm trong dung dịch enzyme (0,3% cellulose + 0,2% macerozyme + 0,1% pectolyase + 1mM ethylene diamine tetra-acetic acid; pH 4,0) ở 42°C trong 40 phút. Sau đó đầu rễ được rửa bằng nước cất và tiếp tục được ngâm trong dung dịch cồn - acetic acid (tỷ lệ 3:1 theo thể tích) ở nhiệt độ âm 20°C trong 5 phút. Tiếp theo đầu rễ được đặt lên lam kính và được tán nhỏ bằng panh cùng với dung dịch etanol + acetic acid (tỷ lệ 3:1 theo thể

tích), sau đó để khô ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Lam kính có chứa mẫu được nhuộm trong dung dịch giemsa 4% + dung dịch đệm phosphate 1/15 M (tỷ lệ 1:1 theo thể tích) từ 3 đến 5 phút, sau đó tráng nhanh qua nước cất và để khô ở nhiệt độ phòng. Số lượng nhiễm sắc thể của ít nhất 10 tế bào được quan sát và đếm dưới kính hiển vi phản pha ở độ phóng đại 60X (Eclipse E400, Nikon, Japan). Nhiễm sắc thể của tế bào rễ được chụp ảnh bằng máy ảnh có kết nối với máy tính.

2.3. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

- Điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy cơ bản: MS + 2% sucrose + 4,5% agar. Môi trường nuôi cấy chuẩn về pH 5,7 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ từ 22-25°C dưới 16 giờ chiếu sáng/8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2.500-3.000lux.

- Các thí nghiệm trong phòng, mỗi công thức được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 10 mẫu, các chỉ tiêu theo dõi được quan sát và đo đếm sau 4 tuần nuôi cấy. Các thí nghiệm ở vườn ươm được bố trí theo khối ngẫu nhiên, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 cây. Số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh xác định bằng cách lấy ngẫu nhiên 10 cây, mỗi cây lấy 10 đầu rễ, mỗi đầu rễ đếm số lượng nhiễm sắc thể của 10 tế bào.

- Xử lý số liệu: Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố bằng phần mềm thống kê SAS 9.3 (2013). Kiểm tra sự sai khác giữa các giá trị trung bình bằng phép ước lượng và sử dụng tiêu chuẩn LSD (Least Significant Difference) ở độ tin cậy 95%. Kiểm tra độ biến động của thí nghiệm được biểu hiện qua chỉ số CV% (coefficient of variation).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Để tiến hành xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* thì giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu là tiền đề quan trọng để quyết định sự thành công của nghiên cứu, vì vậy tay bò được xử lý trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% ở các thời gian khác nhau. Kết quả quan sát được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1%

Công thức thí nghiệm	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%)
CT1	2	100,0	0,0
CT2	3	100,0	20,0
CT3	4	100,0	26,6
CT4	5	80,0	100,0
CT5	7	13,3	100,0

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% có tác dụng trong quá trình khử trùng mẫu cấy trước khi đưa vào nuôi cấy *in vitro*. Công thức cho mẫu sạch bệnh cao nhất là chế độ khử trùng trong 5 phút với tỷ lệ mẫu sạch bệnh là 100%, trong khi ở thời gian 2 hoặc 3 phút mẫu bị nấm và khuẩn với tỷ lệ rất cao (> 80%), ở thời gian khử trùng 4 phút tỷ lệ mẫu sạch bệnh cũng chỉ đạt 26,6%. Khi tăng thời gian lên 7 phút thì tỷ lệ mẫu sạch bệnh đạt 100% nhưng tỷ lệ mẫu sống lại rất thấp (13,3%). Vì vậy chúng tôi cho rằng, với mẫu tay bò thu thập từ Trang Trại Xanh (Vân Hồ, Mộc Châu, Sơn La) thì chế độ khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút là hợp lý nhất, tỷ lệ mẫu sống đạt 80,0% và tỷ lệ mẫu sạch bệnh là 100,0%.

Tạo mẫu sạch bệnh và có tỷ lệ sống cao hay thấp phụ thuộc nhiều vào nguồn lấy mẫu ban đầu, chế độ trồng trọt của cây mẹ, cũng như chất khử trùng và thời gian khử trùng. La Việt Hồng & cs. (2019) cho rằng xử lý tay bò bằng nước Javen 10% trong thời gian 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch bệnh đạt 28,0%, tuy nhiên các tác giả không nói rõ cây mẹ được trồng theo phương thức nào. Đỗ Mạnh Cường & cs. (2018) đã dùng lá của cây dâu tây trồng trong nhà lưới để tạo vật liệu khởi đầu cho nhân nhanh *in vitro*, kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu sạch đạt 77,7% khi khử trùng lá trong dung dịch nano bạc 0,5 g/lít trong thời gian 20 phút. Các nghiên cứu của Anuradha & cs. (2016); Sunita & cs. (2018) cho thấy sử dụng tay bò là tốt nhất để tạo vật liệu khởi đầu trong nhân nhanh *in vitro* cây dâu tây. Thời gian khử trùng cũng như chất khử trùng và nồng độ khử trùng tương tự với các kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

3.2. Nghiên cứu nhân nhanh

Sự phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như: ánh sáng; nhiệt độ; độ ẩm; môi trường nuôi cấy; chất điều hòa sinh trưởng; hàm lượng đường, trong đó, chất điều tiết sinh trưởng là nhân tố quyết định đến kết quả nuôi cấy, nó có vai trò quan trọng trong việc điều khiển đường hướng tái sinh của mẫu cấy cũng như sự sinh trưởng, phát triển của chồi hay mô sẹo tạo thành. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sự ảnh hưởng của BA, Pic, TDZ, kinetin, IBA đến sự phát sinh hình thái và nhân nhanh chồi dâu tây là rất cần thiết.

3.2.1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng phát sinh hình thái mẫu nuôi cấy.

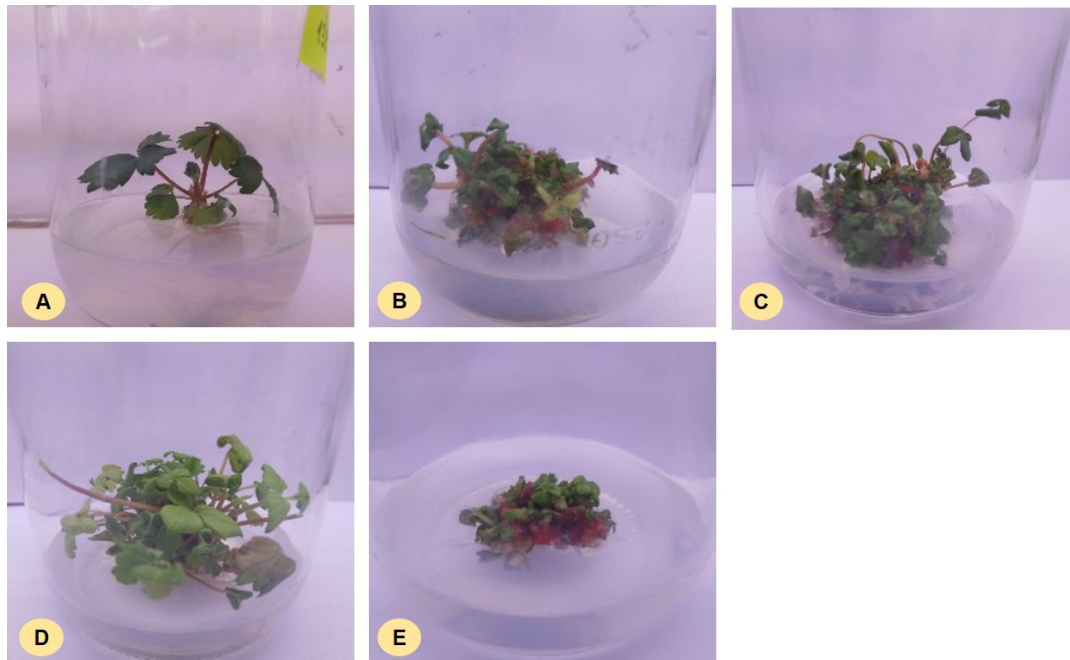
Trong nhân giống *in vitro*, BA là một trong những chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm cytokinin, có vai trò trong việc kích thích sự hình thành chồi non, quyết định hệ số nhân và chất lượng chồi. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của BA ở các nồng độ khác nhau đến hệ số nhân và chất lượng của chồi được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả trình bày ở bảng 2 và hình 1 cho thấy, BA có tác dụng tích cực trong việc nhân nhanh dâu tây trong nuôi cấy *in vitro*. Với việc bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy cho hệ số nhân chồi dâu tây cao hơn so với đối chứng không bổ sung BA (Hình 1A), công thức cho hệ số nhân cao nhất là 0,75 mg/l BA với hệ số nhân đạt 20,4 chồi/mẫu (Hình 1D) và có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 95% so với các công thức khác. Hệ số nhân cũng như chất lượng chồi bị giảm khi tăng nồng độ BA lên 1 mg/l (Hình 1E), ở công thức này chồi phát triển dị dạng, lá xoắn lại, các chồi dính kết lại với nhau.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA khác nhau đến khả năng phát sinh hình thái mẫu nuôi cấy (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Nồng độ BA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm/mẫu)	Hệ số nhân TB (chồi/mẫu)	Chất lượng chồi
CT1 (đ/c)	0,00	3,24	1,40	+
CT2	0,25	2,04	11,60	++
CT3	0,50	2,36	16,20	++
CT4	0,75	2,44	20,40	+++
CT5	1,00	1,54	10,40	++
CV (%)		2,4	3,7	
LSD _{0,05}		0,75	0,60	

Ghi chú: đ/c: đối chứng; (+) Chồi có hệ số nhân thấp, chủ yếu phát triển về chiều cao; (++) Chồi có hệ số nhân chồi cao, chiều cao trung bình; (+++) Chồi có hệ số nhân chồi cao, chồi phân tách rõ, chiều cao trung bình.



Ghi chú: A: 0,0 mg/l BA; B: 0,25 mg/l BA; C: 0,5 mg/l BA; D: 0,75 mg/l BA; E: 1,0 mg/l BA.

Hình 1. Nhân nhanh chồi dâu tây trên môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau (sau 6 tuần nuôi cấy)

Ảnh hưởng của BA đến hệ số nhân của cây dâu tây đã được các nghiên cứu trước đây khảo sát ở nhiều nồng độ khác nhau cũng như mẫu giống khác nhau. Ashrafuzzaman & cs. (2013) cho biết nồng độ 0,5 mg/l BA là tối ưu cho nhân nhanh chồi dâu tây từ tay bò, ở nồng độ này hệ số nhân đạt 7 chồi/mẫu. Nông Thị Huệ & cs. (2018) cũng chỉ ra rằng sử dụng BA ở nồng độ 0,4 mg/l cho hệ số nhân cao nhất (7,3 chồi/mẫu) từ nguồn mẫu là hạt. Những kết quả này thấp

hơn nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi khi dùng cùng nồng độ (hệ số nhân đạt 16,2 chồi/mẫu). Điều này cho thấy, hệ số nhân giống *in vitro* của cây dâu tây không những phụ thuộc vào nồng độ của BA mà còn phụ thuộc vào giống và cơ quan đưa vào nuôi cấy. Nghiên cứu của Kim & cs. (2019; 2020) cho thấy tỷ lệ cây biến dị tăng khi nồng độ BA vượt ngưỡng 1 mg/l, các tác giả cũng kết luận rằng nồng độ BA tối thích cho nhân nhanh *in vitro* là từ 0,5-0,75 mg/l.

3.2.2. So sánh ảnh hưởng của BA, Pic, TDZ, kinetin cùng nồng độ (0,75 mg/l) đối với sự phát sinh hình thái mẫu nuôi cấy

Các cytokinin được biết đến là nhóm chất điều tiết sinh trưởng có tác dụng quyết định đến sự phát sinh chồi của các mẫu nuôi cấy. Ngoài các cytokinin thường được sử dụng như BA, kinetin, thì một số cytokinin tự nhiên cũng được sử dụng nhiều như TDZ, Pic, 2-ip, các chất điều tiết sinh trưởng này được tổng hợp từ tự nhiên nên có giá thành cao, tuy nhiên hiệu quả của chúng trong việc phát sinh chồi rất lớn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, các cytokinin có tác động tốt trong việc phát sinh chồi mẫu nuôi cấy, nhưng đối với Pic lại tỏ ra không có tác dụng đến phát sinh chồi của dâu tây, chồi dâu tây nuôi cấy ban đầu từ xanh chuyển thành trắng, sau đó chuyển dần sang màu nâu vàng (Hình 2B). Đối với TDZ, mẫu dâu tây cho hệ số

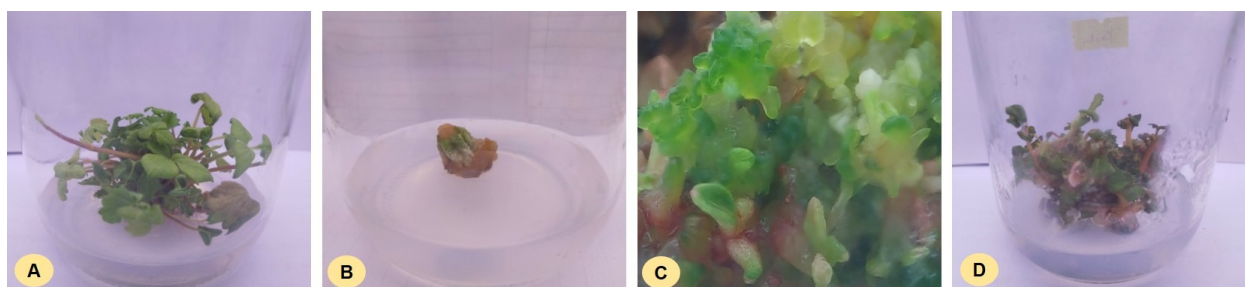
nhân đạt 15,9 chồi/mẫu, chồi phát triển tốt và dễ dàng tách, lá ngắn (Hình 2C). Ngược lại, chồi và lá của dâu tây ở công thức xử lý kinetin phát triển dài hơn, lá mảnh hơn (Hình 2D). Tuy nhiên, hệ số nhân chồi khi sử dụng TDZ và kinetin đều thấp hơn ở mức có ý nghĩa thống kê (95%) so với BA. Các chỉ tiêu (số chồi, chất lượng chồi, chiều cao chồi) ở công thức 0,75 mg/l BA đều tốt hơn các công thức khác (Hình 2A).

Nhiều tác giả đã đánh giá ảnh hưởng của các loại cytokinin khác nhau đến sự phát sinh hình thái của cây dâu tây trong nuôi cấy mô. Nehra & cs. (1989) đã thu được 100% mẫu tái sinh từ đĩa lá khi sử dụng BA ở nồng độ 0,5 ml/l, trong khi đó Passey & cs. (2003) cho biết sử dụng kinetin ở nồng độ 0,5 mg/l đã làm tăng tỷ lệ của mẫu tạo chồi lên 88,5% trên giống Chandler. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy BA có tác dụng thúc đẩy tái sinh chồi và hệ số nhân chồi hơn kinetin ở cùng nồng độ.

Bảng 3. Ảnh hưởng riêng rẽ của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng phát sinh hình thái mẫu nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng	Chiều cao chồi (cm/mẫu)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chất lượng chồi
CT1 (đ/c)	BA	2,44	20,4	+++
CT2	Pic	1,26	0,0	-
CT3	TDZ	1,34	15,9	++
CT4	kinetin	2,48	9,2	++
CV (%)		3,0	4,5	
LSD _{0.05}		0,77	0,56	

Ghi chú: (-) Không phát sinh chồi; (++) Chồi phát triển bình thường, hệ số nhân và chiều cao trung bình; (+++) Chồi có hệ số nhân chồi cao, chồi phân tách rõ, chiều cao trung bình.



Ghi chú: A: BA; B: Pic; C: TDZ; D: Kinetin.

Hình 2: Ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến hệ số nhân của cây dâu tây (sau 6 tuần nuôi cấy)

Việc sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng có nguồn gốc tự nhiên như TDZ và Pic nhằm thúc đẩy quá trình tái sinh chồi, tăng hệ số nhân chồi của cây dâu tây cũng đã được Oosumi & cs. (2006) và Landi & Mezzett (2006) nghiên cứu. Kết quả cho thấy có thể sử dụng TDZ ở nồng độ 1 mg/l để kích thích tái sinh chồi từ mô lá với tỷ lệ từ 23,1 đến 25,8% tùy thuộc vào giống, hay sử dụng Pic ở nồng độ từ 1-2 mg/l đã làm tăng sự tạo phôi vô tính từ 21,0% đến 37,7% tùy vào mẫu nuôi cấy ban đầu (Karimi & Karami, 2008; Mohammad & MaJid, 2013; Roberto & cs., 2016). Azmi & Hossein (2010) cho biết có thể dùng kết hợp TDZ với BA để tái sinh chồi dâu tây từ chồi đỉnh, trong khi đó nghiên cứu của chúng tôi chỉ thành công đối với TDZ, đối với Pic, mẫu cấy hoàn toàn không phát sinh hình thái. Sự khác biệt này rất có thể là do nguồn mẫu đưa vào nghiên cứu của chúng tôi chỉ duy nhất là chồi đỉnh. Kết quả này cũng tương tự như báo cáo của Debnath (2005).

Từ kết quả nghiên cứu trên cho thấy có thể sử dụng TDZ hoặc kinetin cho mục đích nhân

nhân *in vitro* cây dâu tây giống Suraku. Tuy nhiên, cần đánh giá chi tiết hơn về nồng độ sử dụng, cách sử dụng (riêng rẽ hay phối hợp với các chất điều tiết sinh trưởng khác) để khẳng định hiệu quả của TDZ và kinetin. Chúng tôi sẽ tiến hành ở các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA với IBA đến khả năng nhân nhanh mẫu nuôi cấy

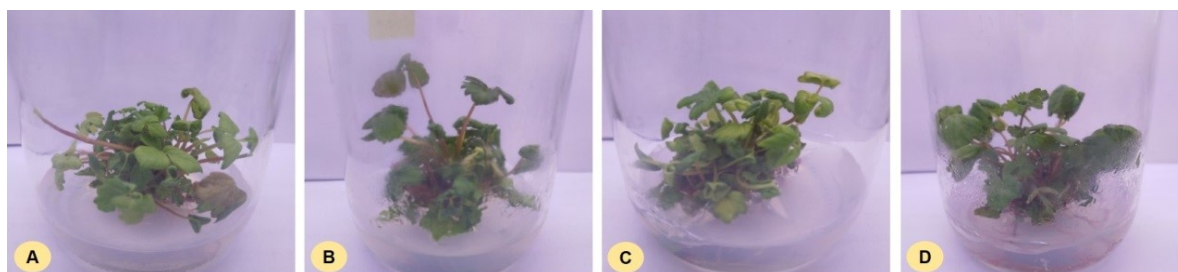
BA là một chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin thường được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô. IBA là chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cụ thể là auxin nhân tạo, có hoạt tính mạnh trong việc phân chia tế bào. Việc nghiên cứu kết hợp giữa chúng với nhau để thúc đẩy sự nhân nhanh chồi được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, hệ số nhân tốt nhất khi kết hợp BA 0,75 mg/l với IBA ở nồng độ 0,3 mg/l, hệ số nhân đạt 23,6 chồi/mẫu và chiều cao trung bình đạt 2,76 cm/mẫu, chồi khỏe, phát triển tốt.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và IBA đến khả năng nhân nhanh của mẫu nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Chiều cao chồi (cm/mẫu)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chất lượng chồi
	BA	IBA			
CT1	0,75	0,0	2,44	20,4	+
CT2		0,1	2,5	20,8	+
CT3		0,3	2,76	23,1	++
CT4		0,5	2,84	21,6	++
CV (%)			1,7	2,5	
LSD _{0,05}			0,60	0,75	

Ghi chú: (+) Chồi phát triển tốt, hệ số nhân cao, chiều cao trung bình; (++) Chồi mập, cao, hệ số nhân cao.



Ghi chú: A: 0,75 mg/l BA + 0,0 mg/l IBA; B: 0,75 mg/l BA + 0,1 mg/l IBA; C: 0,75 mg/l BA + 0,3 mg/l IBA; D: 0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA.

Hình 3. Ảnh hưởng của BA và IBA đến hệ số nhân của mẫu nuôi cấy (sau 6 tuần)

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường MS đến khả năng ra rễ của mẫu nuôi cấy

Công thức thí nghiệm	Nồng độ môi trường	Số rễ TB (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ TB (cm/mẫu)	Nhận xét
CT1	1	13,6	4,06	++
CT2	½	16,4	3,84	+++
CT3	¼	10,6	6,08	+
CV (%)		3,6	1,3	
LSD _{0,05}		0,70	0,88	

Ghi chú: (+) Rễ ít, dài, mảnh và yếu; (++) Rễ phát triển bình thường; (+++) Rễ phát triển tốt, nhiều rễ phụ, mập; chiều dài trung bình.



Ghi chú: A: MS; B: 1/2 MS; C: 1/4 MS.

Hình 5. Sự ra rễ của cây dâu tây ở nồng độ dinh dưỡng MS khác nhau (sau 4 tuần)

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường nuôi cấy đến khả năng ra rễ của mẫu cấy

Môi trường MS là khởi đầu cho mọi quá trình nuôi cấy mô do giàu và cân bằng về chất dinh dưỡng. Môi trường MS cung cấp đầy đủ các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng cho cây sinh trưởng và phát triển. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng độ MS đến khả năng ra rễ của dâu tây được thể hiện ở bảng 5. Ở công thức 1/2 MS có số lượng rễ 16,4 rễ/chồi cao hơn hẳn công thức đối chứng MS 13,6 rễ/mẫu, tuy rễ ngắn hơn

nhưng chồi mập, khỏe và có nhiều rễ phụ. Khi giảm nồng độ MS xuống thấp hơn thì việc tạo rễ của mẫu giảm, rễ dài hơn nhưng mảnh và yếu. Do đó, việc áp dụng công thức 1/2 MS trong tạo cây hoàn chỉnh dâu tây để tiết kiệm chi phí, thời gian và công sức mà vẫn đảm bảo rễ khỏe mạnh, phát triển tốt khi đưa ra vườn ươm.

3.3.2. Ảnh hưởng của tổ hợp 1/2 MS kết hợp α -NAA đến khả năng ra rễ của mẫu cấy

Trong nuôi cấy, nếu sử dụng auxin với hàm lượng thích hợp có tác dụng kích thích mẫu cấy hình thành rễ. Kết quả đánh giá khả năng ra rễ

của α -NAA ở các nồng độ khác nhau trên nên môi trường 1/2 MS được thể hiện ở bảng 6.

Kết quả thu được từ bảng 6 cho thấy, ở các công thức thí nghiệm chồi đều tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy. Đối với nồng độ 0,3 mg/l α -NAA cho số rễ/chồi nhiều nhất (18,6 rễ/chồi) cao hơn so với công thức đối chứng 1/2 MS (16,4 rễ/chồi), tuy mức độ xuất hiện rễ phụ không đồng đều như ở công thức 1/2 MS nhưng rễ dài, mập, to, khỏe và số lượng rễ tạo ra nhiều. Khi bổ sung α -NAA với nồng độ cao hơn thì tỷ lệ tạo rễ của chồi giảm dần, rễ mảnh, ít rễ phụ, giảm khả năng sống khi đưa ra vườn ươm.

Theo nghiên cứu của Đỗ Trí Trung (2013), ở nồng độ 0,25 mg/l α -NAA tỷ lệ ra rễ 100%, số rễ

trung bình tạo ra 15,4 rễ/chồi thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi ở nồng độ 0,1 mg/l α -NAA tạo ra 16,6 rễ/chồi và tỷ lệ ra rễ là 100%.

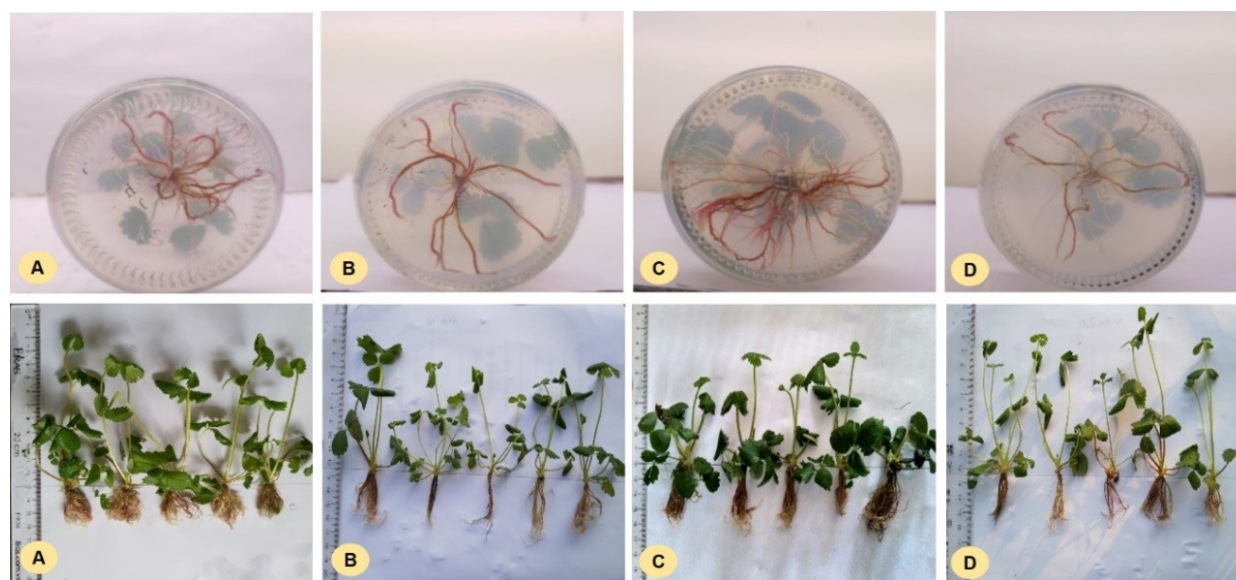
3.4. Thích ứng cây ở vườn ươm và kiểm tra số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh

Trước khi tiến hành đưa dâu tây ra trồng ngoài nhà lưới, bình cây được để ở nơi có nhiệt độ cao hơn so với phòng nuôi cấy mô khoảng 5-7°C trong thời gian từ 3-5 ngày, sau đó cây dâu tây được lấy ra khỏi bình và trồng trên giá thể (đất phù sa, xơ dừa và trấu hun) với các tỷ lệ khác nhau để khảo sát sự phát triển của cây. Kết quả theo dõi sau 6 tuần được thể hiện ở bảng 7.

Bảng 6. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng ra rễ của mẫu nuôi cấy

Công thức	α -NAA (mg/l)	Số rễ trung bình (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ trung bình (cm/mẫu)	Nhận xét
CT1 (đ/c)	0,0	16,4	3,8	+
CT2	0,1	16,6	3,8	+
CT3	0,3	18,6	4,3	++
CT4	0,5	17,0	5,0	+
CV (%)		3,4	1,3	
LSD _{0.05}		0,80	0,76	

Ghi chú: (+) Rễ phát triển tốt, chiều dài trung bình; (++) Rễ phát triển tốt, mập, nhiều rễ phụ, dài rễ tốt.



Ghi chú: A: 0,0 mg/l (đối chứng); B: 0,1 mg/l; C: 0,3 mg/l; D: 0,5 mg/l.

Hình 6. Sự ra rễ của cây dâu tây ở các nồng độ α -NAA khác nhau

Bảng 7. Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây ngoài vườn ươm

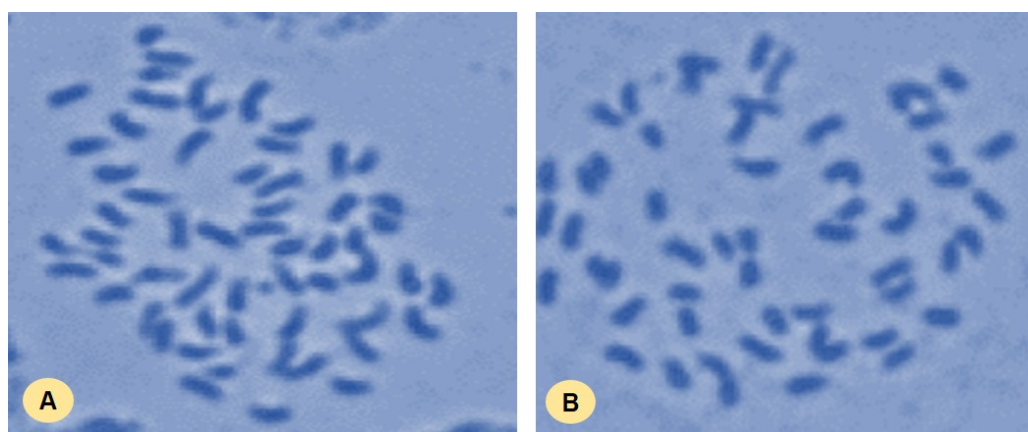
Công thức thí nghiệm	Giá thể		Tỷ lệ sống (%)	Cao cây (cm)	Số lá (lá/cây)	Nhận xét
	Thành phần	Tỷ lệ (%)				
CT1	Đất phù sa	100	91,6	4,5	4,1	+
CT2	Đất : xơ dừa : trấu hun	50:25:25	100,0	4,4	4,7	+
CT3	Đất : xơ dừa : trấu hun	25:25:50	90,0	6,4	5,7	++
CT4	Đất : xơ dừa : trấu hun	25:50:25	83,3	5,6	6,1	+

Ghi chú:(+) Cây phát triển khỏe mạnh, sinh trưởng bình thường; (++) Cây sinh trưởng, phát triển tốt; phát triển tay bò sớm.



Ghi chú: A: Cây trồng trên giá thể khác nhau (sau 30 ngày); B: Cây ra hoa tạo quả (sau trồng 60 ngày).

Hình 7. Cây dâu tây cấy mô ngoài vườn ươm



Ghi chú: A: cây mẹ; B: cây tái sinh.

Hình 8. Nhiễm sắc thể ($2n = 8x = 56$) của cây dâu tây

Kết quả ở bảng 7 và hình 7 cho ta thấy, ở công thức 3 với đất : xơ dừa : trấu hun (1:1:2) là giá thể thích hợp nhất cho cây dâu tây trồng ngoài nhà lưới với tỷ lệ sống đạt 90%, tuy tỷ lệ sống thấp hơn công thức 2 (2 đất : 1 xơ dừa : 1 trấu hun) là 100% nhưng lại cho chất lượng cây

tốt hơn nhiều, chiều cao cây trung bình đạt 6,4 cm/cây, với số lá trung bình đạt 5,7 lá/cây, và xuất hiện tay bò sau trồng 18 ngày. Cây tái sinh được trồng ở vườn sản xuất (sau 2 tháng) đã ra hoa và lứa quả đầu tiên cho thu hoạch sau trồng 80 ngày (Hình 7B).

Theo Dương Tấn Nhựt (2004), khi chuyển các cây nuôi cấy mô ra ngoài vườn ươm, giá thể thích hợp nhất là xơ dừa với tỷ lệ sống trên 88,3%, nhưng phải sau 2 tuần thì cây bắt đầu phát triển rễ mới, cứng cáp hơn. Trong khi đó, các tác giả (Nông Thị Huệ & cs., 2018; La Hồng Việt & cs., 2019) cho biết giá thể (xơ dừa + đất phù sa) theo tỷ lệ 1:1 là tốt nhất khi ra cây dâu tây *in vitro*.

Số lượng nhiễm sắc thể của cây mẹ và cây tái sinh ở vườn ươm (sau trồng 30 ngày) được thể hiện ở hình 8. Kết quả cho thấy số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh tương tự như cây mẹ ($2n = 8x = 56$), điều này chứng tỏ rằng không có sự khác biệt về di truyền của cây tái sinh khi được nhân giống bằng nuôi cấy mô. Bimal & cs. (2016) cho biết không có sự sai khác về số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh và cây mẹ trên đối tượng nghiên cứu của mình (cây hoa sim-*Melastoma malabatricum* Linn). Tương tự, số lượng nhiễm sắc thể của cây hành hoa (*Allium fistulosum*) tái sinh và cây mẹ không có sự sai khác (Patryk & cs., 2014). Tuy nhiên, Fluminhan & cs. (1960) cho biết nhiễm sắc thể số 7 bị gãy trên cây ngô tái sinh từ nuôi cấy callus. Kiểm tra 75 cây tỏi (*Allium sativum* L) tái sinh từ callus, Al-Zahim & cs. (1999) cho biết có 9,3% là cây tứ bội, 4% là cây lệch bội. Chính vì vậy, việc kiểm đến số lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh cũng là một trong các phương pháp hữu hiệu để sàng lọc những cá thể biến dị xuất hiện trong quá trình nuôi cấy mô.

4. KẾT LUẬN

Đối với giống dâu tây Sunraku, sử dụng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút để khử trùng mẫu đưa vào nuôi cấy là tốt nhất. Sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/l BA + 0,3 mg/l IBA cho hệ số nhân cao nhất (đạt 23,6 chồi/ mẫu). Môi trường ra rễ thích hợp nhất của mẫu *in vitro* là 1/2 MS kết hợp 0,3 mg/l α -NAA, tỷ lệ ra rễ đạt 100% và số rễ trung bình đạt 18,6 rễ/mẫu sau 2 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ thành phần giá thể thích hợp nhất cho cây dâu tây ra ngoài vườn ươm là 1 đất : 2 trấu hun : 1 xơ dừa cho tỷ lệ sống 90%, cây sinh trưởng, phát triển tốt. Kiểm tra số

lượng nhiễm sắc thể của cây tái sinh cũng tương tự như cây mẹ. Cây ra hoa và cho thu hoạch quả sau trồng 80 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Zahim M.A., Ford-Lloyd B.V. & Newbury H.J. (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*. 18: 473-477.
- Anuradha Sehrawat S.K., Poonia A.K., Kajla S. & Bhat S. (2016). Production of Strawberry plant by *in vitro* propagation. *Res. on Crops*. 17(3): 545-549.
- Arona D.K., Suri S.S. & Ramawat K.G. (2006). Assesments of Variability in the Renegerants from long-term cultures of 'safed musli' (*Chlorophytum birivilianum*). *India Journal of Biotechnology*. 5: 527-534.
- Ashrafuzzaman M., Faisal S.M., Khanam D. & Raihan F. (2013). Micropropagation of Strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner cultur". *Bangladesh J. Agril. Res.* 38(3): 467-472.
- Azmi A.R & Hossein K. (2010). Micropropagation of strawberry cv. Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine. *Hortscience*. 45(3): 453-456.
- Bimal K.G., Seong E.S., Truong X.N., Chang Y.Y., Kim S.H. & Chung I.M. (2016). *In vitro* regeneration of Melastoma malabatricum Linn. through organogenesis and assessment of clonal and biochemical fidelity using RAPD and HPLC. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 124: 517-529.
- Boxus P. (1989). Review on strawberry mass propagation. *Acta Horti*. 265: 309-320.
- Cocco C., Magnani S., Maltoni, M.L, Quacquarelli I., Cacchi M., Antunes L.E.C., D'Antuono L.F., Faedi W. & Baruzzi G (2015). Effects of site and genotype on strawberry fruits quality traits and bioactive compounds. *Journal of Berry Research*. 5: 145-155.
- Debnath S.C. (2005). Strawberry sepal: Another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In vitro Cell*. 41: 671- 676.
- Dijkstra J. (1993). Research on strawberries focusses on healthy plant material. Expensive cultural method requires excellent material. *Fruittelt-Den-Hang*. 83(34): 14-15.
- Dương Tấn Nhựt, Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Hồng Vũ, Nguyễn Văn Bình, Nguyễn Trí Minh & Nguyễn Thị Thanh Hằng (2004). Cải tiến hệ thống nhân giống dâu tây bằng nuôi cấy trong túi nylon. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2(2): 227-234.

- Douglas V. & Thomas R.F. (2005). Complex segregation analysis of day-neutrality in domestic strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *Euphytica*. 145: 331-338.
- Đỗ Mạnh Cường, Trương Thị Bích Phương & Dương Tấn Nhật (2018). Ảnh hưởng của Nano bạc lên khả năng cảm ứng mô sẹo từ mẫu lá cây dâu tây (*Fragaria × ananassa*) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*. 127(1C): 61-70. doi: 10.26459/hueni-jns.v127i1C.4893.
- Đỗ Trí Trung (2013). Xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* giống dâu tây Mỹ Đá và bước đầu tiết kế và chế tạo thiết bị trồng cây dâu tây. Khóa luận tốt nghiệp. Trường Đại học Nông nghiệp, Hà Nội.
- Fluminhan A., Aguiar-Perecin M.L.R. & Dossantos J.A. (1996). Evidence for Heterochromatin Involvement in Chromosome Breakage in Maize Callus Culture. *Annals of Botany*. 78: 73-81.
- Gernand D., Golczyk H., Rutten T., Ilnicki T., Houben A. & Joachimiak A. (2007). Tissue culture triggers chromosome alterations, amplification and transposition of repeat sequences in *Allium fistulosum*. *Genome*. 50: 435-442.
- Hang A. & Bregitzer P. (1993). Chromosomal variations in immature embryo-derived calli from six barley cultivars. *J. Hered.* 84: 105-108.
- Joachimiak A. & Ilnicki T. (2003). Nuclear morphology, polyploidy, and chromatin elimination in tissue culture of *Allium fistulosum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 72: 11-17.
- Karimi K.G. & Karami O. (2008). Picloram-Induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanic*. 50(1): 69-72.
- Kaushal K., Nath A.K., Kaundal P. & Sharma D.R. (2004). Studies on Somaclonal Variation in Strawberry (*Fragaria × Dutch*) Cultivars. *Acta Hort*. 662: 269-275.
- Kim H.J., Choi M.J., Lee J.N., Suk J.T., Kim K.D., Kim Y.H., Hong S.Y., Kim S.J., Hwang B.S. & Jeong H.N (2020). Occurrence and identification of genetic variation and variation continuity in strawberry tissue culture caused by benzyladenine treatment. *J Plant Biotechnol*. 47: 46-52.
- Kim H.J., Lee J.N., Choi M.J. & Suk J.T. (2019). Comparison of *in vitro* propagation and occurrence of morphological and genetic variation in strawberry tissue culture with various plant hormone treatments. *J Plant Biotechnol*. 46: 106-113.
- Kikas A., Libek A. & Vasar V. (2006). Influence of micropropagation on the production of strawberry runner plants, yield and quality. *Acta horticulturae*. 708: 241-244.
- La Hồng Việt, Chu Đức Hà, Mai Thị Hồng & Nguyễn Trung Hoạch (2019). Nhân nhanh giống dâu tây Nhật Bản từ đốt thân bằng kỹ thuật cấy mô. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. tr. 505-510.
- Landi L. & Mezzetti B. (2006). TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. 25: 281-288.
- Larkin P.J. & Scowcroft S.C. (1981). Somaclonal Variation: A Novel Source of Variability from Cell Culture for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Martinelli A. (1992). Micropropagation of strawberry (*Fragaria* spp.). In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 18: 354-370.
- Mohammad G. & MaJid Z. (2013). The effect of Picloram on somatic embryogenesis of different explant of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch). *British Biotechnology Journal*. 3(2): 133-142.
- Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Nehra N.S., Stushnoff C. & Kartha K.K. (1989). Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 114: 1014-1018.
- Nehra N.S., Kartha K.K. & Giles K.L. (1994). Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of strawberry cultivars. *Euphytica*. 76: 107-115.
- Nông Thị Huệ, Phạm Thị Thu Hằng, Tưởng Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Lâm Hải & Nguyễn Thanh Hải (2018). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dâu tây giống Smia nhập nội từ Mỹ. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 15(12): 1670-1679.
- Nguyen X.T., Song Y.S. & Park S.M. (2015). Androgenesis induction through anther culture in day-neutral strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) cv. ‘Everest’. *J. Sci. & Devel*. 13(2): 279-290.
- Osumi T., Gruszewski H.A., Blischak L.A., Baxter A.L., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., & Vladimir S. (2006). High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*. 223: 1219-1230.
- Palei S., Das A. & Rout G. (2015). *In vitro* studies of strawberry-an important fruit crop: a review. *J. Plant Sci. Res*. 31: 115-131.
- Passey A., Barrett K., & James D. (2003). Adventitious shoot regeneration from seven commercial

- strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types. Plant cell reports. 21(5): 397-401.
- Patnaik J., Sahoo S. & Debata B.K. (1999). Somaclonal Variation in Cell Suspension Culture-derived Regenerants of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia*. Plant Breed. 118: 351-354.
- Patryk M., Dagmara K. & Tomasz I. (2014). DNA stability contrasts with chromosome variability. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica. 56/1: 66-72.
- Peschke V.M. & Phillips R.L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. Advances in Genetics. 30: 41-75.
- Quiroz K.A., Berríos M., Carrasco B., Retamales J.B., Caligari P.D.S. & García-González R. (2017). Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). Biol. Res. 50: 1-11.
- Roberto C., Silvia S. & Mezzetti B. (2016). The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. Scientia Horticulturae. 207: 117-124.
- Ruan J.W., Murti R., Lee Y.H. & Yeoung Y.R. (2009). Strategy for late summer and autumn fruit production system of June bearing strawberry cultivars by highland short day treatment. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27 (Suppl. I): 55. (Abstr.).
- Sunita J., Dashora L.K., Singh J., Bhatnagar P., Kumar A. & Arya C.K. (2018). *In vitro* propagation of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 7(10): 3030-3035.
- Truong X.N., Song Y.S. & Park S.M. (2012). Haploid plant production through anther culture in day-neutral strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) cv. Albion. Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 18(1): 173-184.