

ÁNH HƯỚNG CỦA CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG VÀ HÀM LƯỢNG CO₂ LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG IN VITRO VÀ EX VITRO CÂY DÂU TÂY (*FRAGARIA ANANASSA DUCH.*)

Nguyễn Trí Minh¹, Nguyễn Thị Quỳnh², Nguyễn Văn Uyên²

¹Viện Sinh học Tây Nguyên, Đà Lạt

²Viện Sinh học Nhiệt đới, thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Chồi dâu tây (*Fragaria ananassa Duch.*) *in vitro* có ba lá và khối lượng tươi trung bình 80 mg được dùng làm mẫu để tách dinh sinh trưởng, nhân chồi và tạo rễ. Mẫu được cấy vào hộp Magenta chứa 80 ml môi trường MS không đường, không vitamin và giá thể là vermiculite. Thí nghiệm bao gồm hai mức thay đổi của nồng độ CO₂ (400 và 1000 µmol/mol) và cường độ ánh sáng (100 và 200 µmol/m²/s) thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng là 22 ± 2°C, độ ẩm 75 ± 5%, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Sau 28 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* các cây dâu tây được chuyển sang giai đoạn *ex vitro* để tiếp tục khảo sát các chỉ tiêu về sinh trưởng. Kết quả cho thấy khối lượng tươi của chồi, rễ và tỷ số khối lượng tươi của rễ/chồi vào các ngày thứ 14, 21 và 28 đều tăng một cách có ý nghĩa ở các nghiệm thức có nồng độ CO₂ cao so với các nghiệm thức có nồng độ CO₂ thấp. Khối lượng tươi, khối lượng khô, số lượng thân bò và chiều dài thân bò ở giai đoạn *ex vitro* vào các ngày thứ 14, 21 và 28 đạt lớn nhất ở các nghiệm thức có nồng độ CO₂ cao (1000 µmol/mol) và cường độ ánh sáng cao (200 µmol/m²/s).

Từ khóa: Cường độ ánh sáng, dâu tây, *ex vitro*, *in vitro*, môi trường nuôi cấy không đường, nồng độ CO₂, thân bò

MỞ ĐẦU

Khả năng quang hợp và sinh trưởng của cây *in vitro* bị hạn chế bởi nồng độ khí CO₂ cung cấp cho cây trong bình nuôi cấy không đủ trong suốt thời gian chiếu sáng (Desjardins *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 1987; Kozai, 1991). Sự sinh trưởng của *Phaleanopsis* (Doi *et al.*, 1989), dâu tây (Fujiwara *et al.*, 1988; Kozai *et al.*, 1991; Kozai, Sekimoto, 1988), khoai tây trong điều kiện không đường (quang tự dưỡng) tốt hơn trong điều kiện có đường (Kozai *et al.*, 1988). Nuôi cây mô trên môi trường không đường đã cải tiến được sự sinh trưởng của cây *in vitro*, giảm được tỷ lệ tạp nhiễm và chi phí chăm sóc trong nhà ươm (Kozai, 1991; Kozai, Hoshi, 1989). Sự gia tăng trao đổi khí qua bình nuôi cấy và sử dụng các giá thể có đặc tính xốp, giữ nước đã thúc đẩy quá trình hình thành rễ thứ cấp đồng thời gia tăng khả năng quang hợp ở lá. Những nghiên cứu trên đã mở ra một ý tưởng là cần cải tiến sự sinh trưởng cây dâu tây *in vitro* và rút ngắn thời gian chăm sóc cây con ở giai đoạn *ex vitro* nhằm hướng tới xây dựng một hệ thống nhân giống vô tính cây dâu tây tại Đà Lạt.

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát tác

động của sự biến đổi nồng độ CO₂ và cường độ ánh sáng lên khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* và *ex vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

Vật liệu ban đầu là chồi *in vitro* của cây dâu tây (*Fragaria ananassa Duch.*) có ba lá và khối lượng tươi trung bình 80 mg. Hộp nuôi cấy là hộp Magenta GA-7 có thể tích là 370 ml được làm bằng nhựa polycarbonate, trên nắp hộp có lỗ tròn (Ø = 10 mm) gắn 2 màng Millipore để trao đổi khí (Millipore, Tokyo, Japan) với kích thước lỗ thông khí của màng là 0,5 µm. Hệ số trao đổi khí của hộp là 2,3 lason/h được đo theo phương pháp của Kozai và đồng tác giả (1986).

Các mẫu được nuôi trong điều kiện ánh sáng 50 µmol/m²/s áp dụng từ ngày thứ nhất đến ngày thứ 8 và sau ngày thứ 8 có hai mức độ ánh sáng 100 và 200 µmol/m²/s, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày (chu kỳ 24 h), nhiệt độ 22 ± 2°C, ẩm độ

75% và nồng độ CO₂ có hai mức 400 và 1000 μmol/mol.

Môi trường nuôi cây

Môi trường nuôi cây là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) không dùng đường và vitamin. Giá thể là vermiculite được bổ sung vào môi trường nuôi cây (10 g/hộp Matgenta).

Phương pháp nghiên cứu

Chồi cây dâu tây *in vitro* được loại bỏ phần gốc và các lá già, chọn 4 chồi có kích thước đồng đều cấy vào hộp Matgenta. Các mẫu cây được thực hiện trong điều kiện vô trùng, sau khi cấy xong các mẫu được đặt trong điều kiện có cường độ ánh sáng, nồng độ CO₂ như trong bảng 1. Cứ sau 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần các mẫu cây được lấy ra khỏi hộp Matgenta để tính toán trọng lượng chồi, rễ và tỷ số của rễ/chồi. Sau bốn tuần nuôi cây các chồi ban đầu đã phát triển thành các cây dâu tây hoàn chỉnh. Các cây dâu tây con được chuyên sang các bầu đất và trồng trong điều kiện vườn ươm. Trong những ngày đầu cây dâu tây con được giữ ẩm

bằng cách tưới phun sương 3 lần/ngày và che sáng 50% bằng lưới đen. Sau 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần các cây dâu tây con được nhổ ra khỏi bầu đất và đếm tính các chỉ tiêu về khối lượng tươi, số lượng thân bò và chiều dài thân bò.

Cách bố trí thí nghiệm và xử lý thống kê

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với hai yếu tố khác biệt là nồng độ CO₂ và cường độ ánh sáng, mỗi yếu tố có hai mức độ. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 9 hộp Magenta, được lặp lại 3 lần, mỗi hộp gồm 4 chồi. Các chỉ tiêu theo dõi trong điều kiện *in vitro* bao gồm khối lượng tươi của chồi, rễ và của toàn cây; khối lượng khô của cây ở các ngày nuôi cây thứ 14, 21 và 28. Các chỉ tiêu theo dõi ở điều kiện *ex vitro* bao gồm khối lượng tươi của cây dâu tây, số lượng thân và và chiều dài của thân bò mới hình thành. Số liệu được xử lý bằng chương trình thống kê Minitab (Minitab 14, Stata College, PA, 2003). Giá trị trung bình và sai số có ý nghĩa được tính theo phương pháp thống kê mô tả. So sánh sự tương quan các giá trị trung bình được tính theo phương pháp của Turkey's Simultaneous Test ($P \leq 0,05$).

Bảng 1. Mô tả thí nghiệm.

Nghiệm thức	Cường độ ánh sáng (μmol/m ² /s)	Nồng độ CO ₂ (μmol/mol)	Hệ số trao đổi khí (lần/h)	Số hộp/nghiệm thức (hộp)	Số mẫu/nghiệm thức (mẫu)
LL	100	400	2,3	27	108
LH	100	1000	2,3	27	108
HL	200	400	2,3	27	108
HH	200	1000	2,3	27	108

Chú thích: LL: Cường độ ánh sáng 100 μmol/m²/s và nồng độ CO₂ 400 μmol/mol, LH: Cường độ ánh sáng 100 μmol/m²/s và nồng độ CO₂ 1000 μmol/mol, HL: Cường độ ánh sáng 200 μmol/m²/s và nồng độ CO₂ 400 μmol/mol, HH: Cường độ ánh sáng 200 μmol/m²/s và nồng độ CO₂ 1000 μmol/mol.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sự sinh trưởng của chồi và rễ cây dâu tây *in vitro*

Các giá trị trung bình về khối lượng tươi của chồi (C), rễ (R), tỷ số R/C và khối lượng khô của cây dâu tây *in vitro* vào các ngày thứ 14, 21 và 28 được trình bày trong bảng 2.

Kết quả bảng 2 cho thấy các giá trị về KLT chồi và KLT rễ, KLK cây và tỷ số R/C của cây dâu tây *in vitro* đều tăng dần theo thời gian và tăng từ nghiệm thức LL đến HH. Đặc biệt, ở các nghiệm thức có cùng

cường độ ánh sáng nhưng khác nhau về nồng độ CO₂ thì nghiệm thức nào có nồng độ CO₂ cao hơn sẽ đạt các giá trị nêu trên cao hơn. Kết quả này đã chỉ ra rằng nồng độ CO₂ rất quan trọng đối với sự sinh trưởng của cây dâu tây *in vitro* và có ý nghĩa trong thực tế ứng dụng vào việc sản xuất cây giống cây mỗ.

Tỷ số R/C đạt thấp nhất (0,29) là ở nghiệm thức LL vào ngày thứ 14 và đạt cao nhất (0,91) ở nghiệm thức HH vào ngày thứ 28. Sự gia tăng tỷ số R/C từ 0,29 tiến gần đến 1 (0,91) cho thấy rằng cây dâu tây *in vitro* vào ngày thứ 28 đã phát triển một cách cân đối giữa thân và rễ, đồng thời cho biết đây là thời

diễm thích hợp để chuyển cây dâu tây từ giai đoạn *in vitro* sang giai đoạn *ex vitro*.

Các giá trị của KLK ở nghiệm thức LL và HH đều khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê. Điều này, cho thấy nuôi cây chồi cây dâu tây trong điều kiện có nồng độ CO₂ khoảng 400 μmol/mol thì sự tăng cường ánh sáng cao là không hiệu quả vì cây không sử dụng hết lượng ánh sáng cung cấp. Cây dâu tây chỉ sử dụng ánh sáng một cách có hiệu quả khi có nồng độ CO₂ thích hợp. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Buddendorf-Joosten, Woltering (1994), các nhà khoa học này đã chứng minh bằng thực nghiệm rằng nồng độ CO₂ trong hộp nuôi cây lúc bắt đầu bật đèn là 300 μmol/mol với cường độ ánh sáng từ 80 - 250 μmol/m²/s thì chỉ sau vài giờ nồng độ CO₂ lập tức giảm xuống chỉ còn 100 μmol/mol. Sự thiếu hụt CO₂ trong giai đoạn chiếu sáng làm hạn chế sự quang hợp của

cây *in vitro*.

Sự tăng trưởng của lá cây dâu tây *in vitro*

Các giá trị trung bình của diện tích lá cây dâu tây *in vitro* vào ngày thứ 14, 21 và 28 được minh họa trên hình 1.

Các giá trị diện tích lá của tất cả các nghiệm thức tăng từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28 và đều đạt cao nhất ở nghiệm thức HH và ngược lại thấp nhất ở nghiệm thức LL. Trong thí nghiệm này sự tăng nồng độ CO₂ và cường độ ánh sáng là có ý nghĩa quan trọng trong việc gia tăng diện tích lá cây dâu tây. Điều này giúp cho cây dâu tây con thích nghi nhanh và gia tăng khả năng sống sót khi chuyển sang điều kiện *ex vitro*. Dựa vào đặc điểm này chúng ta có thể giải thích vì sao trong nuôi cây mô truyền thống cây con khi chuyển sang điều kiện *ex vitro* thường có tỷ lệ chết cao và sinh trưởng chậm trong những ngày đầu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các nồng độ CO₂ và cường độ ánh sáng lên sự gia tăng khối lượng tươi của chồi, rễ, tỷ lệ khối lượng tươi rễ/khối lượng tươi chồi (R/C) và khối lượng khô của cây dâu tây *in vitro* vào các ngày thứ 14, 21 và 28.

Nghiệm thức	LL	HL	LH	HH
NGÀY THỨ 14				
KLT chồi (mg) ^z	178,5 ± 5,6a ^y	185,7 ± 6,5ba	213,5 ± 7,5b	277,6 ± 9,7c
KLT rễ (mg)	54,5 ± 2,4a	68,6 ± 3,8b	76,6 ± 5,3ba	124,3 ± 3,6c
R/C	0,29 ± 0,02a	0,36 ± 0,02ab	0,37 ± 0,02b	0,4 ± 0,01c
KLK (mg)	16,6 ± 0,6a	19,9 ± 0,9a	24,5 ± 0,8b	31,0 ± 1,1c
NGÀY THỨ 21				
KLT chồi (mg)	364,4 ± 12,2a	396,3 ± 8,8a	488,4 ± 8,4b	561,5 ± 8,1c
KLT rễ (mg)	198,9 ± 8,2a	254,7 ± 8,6b	307,7 ± 11,7b	427,7 ± 9,9c
R/C	0,54 ± 0,02a	0,59 ± 0,02ab	0,63 ± 0,02b	0,76 ± 0,12c
KLK của cây (mg)	42,8 ± 1,2a	44,2 ± 0,9a	55,4 ± 0,7b	68,0 ± 0,8c
NGÀY THỨ 28				
KLT chồi (mg)	569,8 ± 12,2a	766,3 ± 8,8b	843,4 ± 8,4c	904,5 ± 8,1d
KLT rễ (mg)	362,9 ± 8,2a	475,2 ± 8,6ab	590,7 ± 11,7b	822,7 ± 7,9c
R/C	0,55 ± 0,02a	0,62 ± 0,01b	0,7 ± 0,01c	0,91 ± 0,02d
KLK (mg)	77,7 ± 1,9a	84,3 ± 2,1a	103,3 ± 1,3b	118,7 ± 2,2c

Chú thích: R/C khối lượng tươi của rễ/khối lượng tươi của chồi; KLT: khối lượng tươi; KLK: khối lượng khô;

^z: Trong mỗi cột biểu thị giá trị trung bình của nghiệm thức ± sai số chuẩn; ^y: Các ký tự giống nhau trong mỗi hàng biểu thị sự khác nhau không có ý nghĩa, các ký tự khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% theo phân hạng Turkey's Simultaneous Test (P ≤ 0,05) trong cùng ngày theo dõi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ CO₂ và cường độ ánh sáng lên sự gia tăng khối lượng tươi (KLT), chiều dài thân bò và số lượng thân bò của cây dâu tây trong giai đoạn *ex vitro* vào các ngày thứ 14, 21 và 28.

Thí nghiệm	LL	HL	LH	HH
Ngày thứ 14				
KLT cây (g)	4,6 ± 0,3a	5,9 ± 0,1b	7,5 ± 0,2c	9,9 ± 0,3d
Chiều dài thân bò (cm)	2,3 ± 0,2a	5,2 ± 0,2b	3,8 ± 0,2c	7,2 ± 0,2d ²
Số lượng thân bò (thân)	2,2 ± 0,2a	2,4 ± 0,2ab	3,0 ± 0,2b	3,7 ± 0,2c ^y
Ngày thứ 21				
KLT cây (g)	12,4 ± 0,5c	14,4 ± 0,7c	20,7 ± 0,6a	26,3 ± 0,6b
Chiều dài thân bò (cm)	6,2 ± 0,3a	13,9 ± 0,4b	8,4 ± 0,4c	15,9 ± 0,3d
Số lượng thân bò (thân)	3,3 ± 0,2a	3,7 ± 0,2b	4,9 ± 0,2c	5,7 ± 0,2d
Ngày thứ 28				
KLT cây (g)	25,9 ± 0,5a	27,4 ± 1,0a	29,0 ± 0,5b	34,8 ± 1,0c
Chiều dài thân bò (cm)	11,0 ± 0,3a	17,4 ± 0,3b	13,4 ± 0,5c	21,9 ± 0,5d
Số lượng thân bò (thân)	5,5 ± 0,2a	5,8 ± 0,2ab	6,4 ± 0,2b	7,9 ± 0,3c

Chú thích: ²: Trong mỗi cột biểu thị giá trị trung bình của nghiệm thức và ± sai số chuẩn, ^y: Các ký tự giống nhau trong mỗi hàng biểu thị sự khác nhau không có ý nghĩa, các ký tự khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% theo phân hạng Turkey's Simultaneous Test ($P \leq 0,05$) trong cùng ngày theo dõi.

Sự tăng trưởng của cây dâu tây ở giai đoạn *ex vitro*

Sự tăng trưởng của cây dâu tây *in vitro* tiếp tục được khảo sát khi chuyển cây con sang giai đoạn *ex vitro*, các giá trị trung bình về khối lượng tươi, chiều dài thân bò và số lượng thân bò vào các ngày thứ 14, 21 và 28 được tóm tắt trong bảng 3.

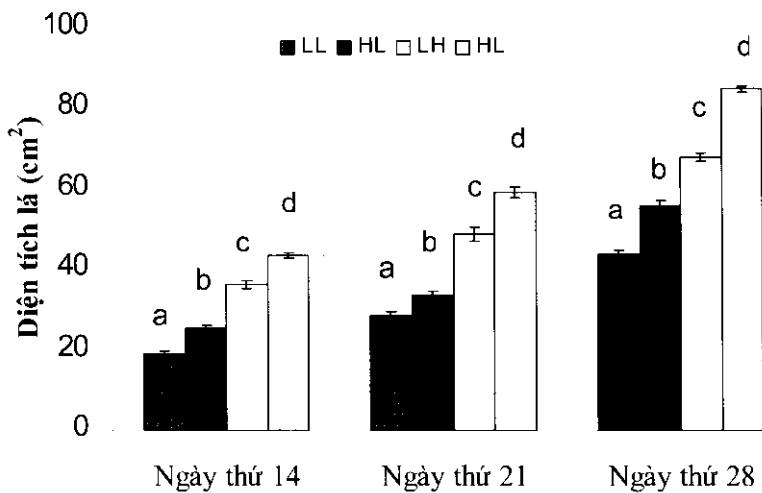
Chiều dài thân bò

Giá trị chiều dài của thân bò đạt lớn nhất ở nghiệm thức HH vào ngày thứ 28 (Bảng 3, Hình 2). Cường độ ánh sáng cao kích thích sự tăng trưởng chiều dài của thân bò. Các thân bò này ngày càng phát triển dài ra và tạo nhiều đốt thân, trên mỗi đốt thân lại hình thành chồi và rễ mới. Nếu các đốt thân này được uốn cong và đặt vào bầu đất thì bộ rễ mới sẽ phát triển hoàn chỉnh như cây dâu trưởng thành. Và đoạn thân bò mới này được tách rời để trồng thu lấy quả dâu tây. Kết quả này sẽ mang lại hiệu quả

cao khi áp dụng vào sản xuất thân bò dâu tây ở giai đoạn *ex vitro* từ cây cấy mô trong điều kiện quang tự dưỡng.

Số lượng thân bò

Số lượng thân bò tăng dần từ ngày thứ 14 đến ngày thứ 28 (Hình 3) ở tất cả các nghiệm thức, giá trị cao nhất đều được ghi nhận ở nghiệm thức HH. Trường hợp làm giàu CO₂ trong nghiệm thức (LH) không mang lại hiệu quả cao có thể là do lượng proton cần thiết không đủ để sử dụng hết nguồn CO₂ được cung cấp. Chỉ tiêu về số lượng thân bò là rất quan trọng trong việc sản xuất cây giống dâu tây vì thân bò vừa có thể tách rời cây mẹ để trồng mới và vừa có thể dùng để nhân nhanh cây dâu con. Nghiên cứu này sẽ mở ra những nghiên cứu tiếp theo về hệ thống nhân giống cây dâu tây cấp hai ở giai đoạn *ex vitro* nhằm nhân nhanh số lượng và giảm chi phí sản xuất cây giống dâu tây cây mô tại Đà Lạt.



Hình 1. Tác động của cường độ ánh sáng và nồng độ CO₂ lên sự tăng trưởng diện tích lá của cây dâu tây *in vitro* vào ngày thứ 14; 21 và 28.



Hình 2. Cây dâu tây *in vitro* vào ngày thứ 28 chuẩn bị chuyển sang giai đoạn *ex vitro*.



Hình 3. Cây dâu tây *ex vitro* ngày thứ 28 theo thứ tự các nghiệm thức từ trái sang phải là LL, LH, HL và HH.

KẾT LUẬN

Cây dâu tây sinh trưởng tối ưu ở điều kiện nồng độ CO₂ 1000 μmol/mol và cường độ ánh sáng 200 μmol/m²/s, sau 28 ngày nuôi cây trong điều kiện *in vitro* cây dâu tây đã đạt các chỉ tiêu sinh trưởng trung bình như sau: Khối lượng tươi của chồi là 904,5 mg; khối lượng tươi của rễ là 822,7 mg; tỷ số của rễ/chồi là 0,91 và khối lượng khô của cây là 118,7 mg. Sau 28 ngày chuyển sang điều kiện *ex vitro* cây dâu tây đã đạt được khối lượng tươi trung bình là 34,8 g với 7,9 thân bò và chiều dài của mỗi thân bò là 21,9 cm. Kết quả này đã mở ra một triển vọng về ứng dụng nuôi cây mô quang tự dưỡng trong việc sản xuất cây giống dâu tây ở quy mô công nghiệp.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của tổ chức IABA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Buddendorf-Joosten J, Woltering E (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. In: Lumsden P, Nicholas J, Davies J. (eds.) *Physiology, Growth and Development of Plant in Culture*. Kluwer Acad Pub, Dordrecht, the Netherlands: 165-194.

Desjardins Y, Laforge F, Lussier C, Gosselin A (1988) Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort* 230: 45-47.

Doi M, Oda H, Asahira T (1989) In vitro atmosphere of cultured C₃ and CAM plants in relation to day-length. *Environ Contr Biol* 27: 9-13.

EFFECTS OF CO₂ CONCENTRATIONS AND LIGHT INTENSITIES ON THE GROWTH OF *IN VITRO* AND *EX VITRO* STRAWBERRY PLANTLETS (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.)

Nguyen Tri Minh^{1,*}, Nguyen Thi Quynh², Nguyen Van Uyen²

¹Tay Nguyen Institute of Biology, Dalat

²Institute of Tropical Biology, Hochiminh city

SUMMARY

Fragaria ananassa Duch. shoots with three leaves and 80 mg of weight were cultured *in vitro* for 4 weeks on MS sugar-free medium with different light intensities (100 μmol/m²/s and 200 μmol/m²/s)

* Author for correspondence: Tel: 84-63-3831056; Fax: 84-63-3831028; E-mail: triminh10@yahoo.com

Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I (1988) Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort* 230: 153-158.

Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I (1987) Fundamental studies on environments in plant tissue culture. Measurements of carbon dioxide gas concentration in close vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plants. *Agr Meteorol* 43: 21-30.

Kozai T (1991) Photoautotrophic micropagation. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 27: 47-51.

Kozai T, Hoshi T (1989) Intelligent information systems for production management in agriculture and horticulture. *Future Generation Computer Systems* 5: 131-136.

Kozai T, Iwabuchi T, Watanabe K, Watanabe I (1991) Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 25: 107-115.

Kozai T, Sekimoto K (1988) Effects of the number of air changes per hour of the stoppered vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of strawberry plantlets *in vitro*. *Environ Contr Biol* 26: 21-29.

Kozai T, Yokohama Y, Watanabe I (1988) Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux density. *Acta Hort* 230: 121-127.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

under CO₂ enriched (1000 µmol/mol) and non-enriched (400 µmol/mol) conditions. *In vitro* plantlets were then transferred to the *ex vitro* condition for 4 weeks. Under the *in vitro* CO₂ enrichment the growth shown by fresh weight of root, shoot, plant and total dry weight of *in vitro* plantlets increased, significantly. The growth of *in vitro* plantlets was the highest in high light intensity conditions. The fresh weight, length and number of runner were highest in the CO₂ enriched and high light intensity. There was difference no significant in the percent age of dry matter of *ex vitro* plantlets among treatments on days 14, 21 and 28.

Keywords: CO₂ concentration, *ex vitro*, *in vitro*, light intensity, runner, strawberry, sugar free medium