

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY LAN HUỆ MẠNG *HIPPEASTRUM RETICULATUM* HERB.VAR. *STRIATIFOLIUM* HERB

Study on Micropropagation of *Hippeastrum reticulatum* Herb.var. *striatifolium* Herb.

Ninh Thị Thảo¹, Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Nguyễn Hạnh Hoa²

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên hệ: ntthao@hua.edu.vn

Ngày gửi đăng: 09.03.2010; Ngày chấp nhận đăng: 22.03.2010

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm ra các thông số thích hợp để hướng tới xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Lan huệ mạng (*H. reticulatum* var. *striatifolium*). Kết quả cho thấy: Trên môi trường MS có chứa 3 mg/l BA, 100% mẫu tái sinh tạo chồi và củ nhỏ. Chồi và củ nhỏ tạo ra được sử dụng cho thí nghiệm nhân nhanh. Hệ số nhân đạt được cao nhất khi sử dụng chồi *in vitro* làm vật liệu nhân nhanh là 1,50 chồi/mẫu trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l IBA, trong khi đó sử dụng củ nhỏ để nhân nhanh trên môi trường chứa 5 mg/l BA thì hệ số nhân đạt được là 7,17 chồi/mẫu. Đa số các chồi đều ra rễ (83,33%) trên môi trường chứa 1 mg/l IBA. Các cây *in vitro* hoàn chỉnh được đưa ra thích nghi với điều kiện *in vivo* trên giá thể cát và trấu hun theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Tỷ lệ cây sống sót là 100%, cây sinh trưởng phát triển khoẻ mạnh.

Từ khoá: BA, hệ số nhân, *Hippeastrum reticulatum* Herb.var. *striatifolium* Herb., IBA, Lan huệ mạng, nhân giống vô tính *in vitro*, α - NAA.

SUMMARY

This study was conducted in order to establish a preliminary protocol for rapid propagation of *H. reticulatum* var. *striatifolium*. Results indicated that 100% twin scale explants regenerated on MS medium containing 3 mg/l BA. The most suitable material for shoot proliferation was small bulbs with the average rate of shoot propagation was 7.17 shoots/explant when cultured on MS supplemented with 1.5 mg/l IBA. Adding 1 mg/l IBA to MS medium promoted the root induction of the shoots with the rooting rate of 83.33%. Well - rooted plantlets were successfully transplanted to sand and rice husk substrate (1:1). The rate of plants survival was 100% and plants grew and developed well.

Key words: BA, *Hippeastrum reticulatum* Herb.var. *striatifolium* Herb., micropropagation, α - NAA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hippeastrum là một trong những chi có tiềm năng phát triển của họ *Liliaceae*. Chi *Hippeastrum* có 90 loài và 600 dạng lai, đa dạng, phong phú về hình thái, màu sắc hoa, rất thích hợp để sử dụng làm hoa cắt cành. Trong củ của các loài thuộc chi này có chứa các biệt được giá trị như các loại alkaloids, các lectins có hoạt tính chống siêu vi trùng, chống sưng viêm, chống ung thư, chữa bệnh Alzheimer, cầm máu và chữa vết thương (Funganti, 1975).

Lan huệ mạng, có tên khoa học là *H. reticulatum* var. *striatifolium*, là loài có hoa và lá nổi bật trong chi *Hippeastrum*. Các cánh hoa có màu hồng nhạt với những sọc màu hồng đậm hình xương cá, phiến lá cứng, bên và bóng, màu xanh đậm, gân giữa lá màu trắng. Đáng chú ý, thời gian ra hoa của cây lan huệ mạng kéo dài, khoảng 158 ngày và ra hoa trong vụ hè thu là thời điểm mà các giống lan huệ khác thuộc chi *Hippeastrum* đã kết thúc ra hoa. Do vậy

trồng lan huệ mạng có thể cung ứng liên tục cho nhu cầu sử dụng hoa trang trí.

Để nhân giống lan huệ mạng có thể sử dụng phương pháp gieo hạt, tách chồi hoặc củ nhỏ từ cụm cây mẹ (Siddique và cs., 2007) hoặc sử dụng phương pháp nhân giống *in vitro* (Husey, 1975; Seabrook và cs., 1976; De Bruyn, 1992; Chieh Li Huang và cs., 2005...). Mặc dù đơn giản nhưng hiệu quả khi nhân giống bằng phương pháp truyền thống không cao do thời gian nhân giống dài, hệ số nhân thấp, cây không đồng nhất. Trong khi đó, phương pháp nhân giống *in vitro* có rất nhiều ưu điểm như tạo được cây con trẻ hóa và sạch bệnh nên cho cây có tiềm năng sinh trưởng, phát triển và năng suất cao. Đồng thời phương pháp này có thời gian nhân giống ngắn, hệ số nhân giống cao, cây đồng nhất, do vậy đáp ứng được nhu cầu về số lượng giống có chất lượng cao, ổn định cho sản xuất trên quy mô rộng. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tìm ra các thông số kỹ thuật thích hợp cho quy trình nhân giống *in vitro* cây lan huệ mạng làm cơ sở cho việc nhân nhanh các nguồn gen ưu tú phục vụ công tác chọn tạo giống mới bằng kỹ thuật đột biến và chuyển gen *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cây lan huệ mạng (*H. reticulatum* var. *striatifolium*).

Vật liệu sử dụng cho thí nghiệm là vảy củ đôi gồm 2 vảy có kích thước dài x rộng là 10 mm x 10 mm dính phần đế củ có kích thước 4 mm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp nuôi cấy mô hiện hành, trên nền môi trường cơ bản MS bổ sung 30 g/l saccarose, 6,5 g/l agar và các chất điều tiết sinh trưởng, pH môi trường được chỉnh về 5,7 trước khi được hấp vô trùng ở 121°C, 1,5 atm trong 20 phút. Quá trình nuôi cấy được tiến hành ở

hiệu suất 242°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ ngày.

Mẫu cấy được khử trùng theo quy trình: Củ lan huệ mạng được làm sạch bề mặt dưới vòi nước chảy mạnh, ngâm trong xà phòng 10 phút, sau đó rửa sạch. Trong buồng cấy vô trùng, ngâm củ trong cồn 70°C trong 30 giây, tráng lại bằng nước cất vô trùng 1 - 2 lần, mỗi lần trong 1 phút. Tiếp theo ngâm củ trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút, rửa lại 4 - 5 lần bằng nước cất vô trùng, mỗi lần 1 phút. Sau đó cắt phần đế củ mang 2 vảy củ và cấy vào môi trường nuôi cấy.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần 6 bình, mỗi bình 2 mẫu.

Các chỉ tiêu theo dõi định kỳ 1 tuần/ lần trong nghiên cứu bao gồm tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm), hệ số nhân chồi (số chồi/mẫu), trạng thái chồi, tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm), tỷ lệ cây sống (%).

Các số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm Excel, so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định Duncan và LSD ở mức ý nghĩa 1%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

3.1.1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi

Để nhân nhanh *in vitro* các loài thuộc chi *Hippeastrum*, rất nhiều nguồn vật liệu ban đầu có thể sử dụng như vảy củ không dính đế củ (Seabrook và cs., 1977), phần đế củ mang một vảy củ và phần đế củ mang 2 vảy củ (De Bruyn và cs., 1992), đế củ (Bapat & Narayanaswamy, 1976) hay các bộ phận của hoa (Seabrook & Cumming, 1976; De Bruyn và cs., 1992), chồi *in vivo* hoặc củ *in vitro* nhỏ (Husey, 1975; De Bruyn và cs., 1992)... Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh cũng như hệ số nhân đạt cao nhất khi sử dụng vảy củ đôi (Chieh Li Huang và cs., 2005). Chính vì vậy, nghiên cứu này đã sử dụng vảy củ đôi làm vật liệu vào mẫu ban đầu. Kết quả sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi

BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
0	66,67	1,25	0,43
1	94,44	1,65	0,64
2	100,00	1,75	0,61
3	100,00	1,91	0,87
4	94,44	1,50	0,63
5	100,00	1,67	0,46
LSD 5%		0,22	0,07
CV (%)		6,80	6,10

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến sự tái sinh chồi từ vảy củ đôi sau 5 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
0	0	72,22	1,23	0,54
3	0,1	100,00	1,56	0,55
3	0,25	100,00	1,78	0,73
3	0,5	88,89	1,76	1,00
3	1	50,00	1,17	0,85
LSD 5%			0,29	0,06
CV%			10,50	4,70

Có thể thấy rằng, BA có ảnh hưởng khá rõ đến khả năng tái sinh của vảy củ đôi cây lan huệ mạng. Cụ thể, khi không bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo chồi là 66,67%, chồi cao trung bình 0,43 cm và đạt 1,25 chồi/mẫu cấy. Trong khi đó nếu bổ sung BA với dải nồng độ từ 1 - 5 mg/l thì tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt từ 94,44% đến 100%, chiều cao chồi dao động từ 0,46 - 0,87 cm, đạt 1,50 - 1,91 chồi/ mẫu cấy. Nồng độ 3 mg/l BA cho hiệu quả tái sinh cao nhất với 100% mẫu tạo chồi và 1,91 chồi/mẫu. Các chồi tạo ra cao, mập, lá có màu xanh đậm, sinh trưởng phát triển khỏe mạnh.

3.1.2. Ảnh hưởng của BA và α -NAA đến khả năng tái sinh chồi từ vảy củ đôi

Sự kết hợp auxin và cytokinin với một tỷ lệ nhất định đôi khi không những cải thiện được khả năng tái sinh mà còn làm tăng sự sinh trưởng của chồi. Do vậy, nghiên cứu này đã sử dụng nồng độ BA tốt nhất ở thí nghiệm trên (3 mg/l) phối hợp với α -NAA ở các nồng độ khác nhau nhằm tăng hiệu quả vào mẫu

và chất lượng chồi tạo ra.

Tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu và chiều cao chồi thu được trên môi trường chứa BA và α -NAA cao hơn so với công thức đối chứng. Kết quả thu được cao nhất ở công thức bổ sung 3 mg/l BA và 0,25 mg/l α -NAA với 100% mẫu tạo chồi và 1,78 chồi/mẫu. Tuy nhiên khả năng tái sinh của vảy củ đôi trên môi trường chỉ chứa 3 mg/l BA (Bảng 1) cao hơn so với trên môi trường có bổ sung kết hợp giữa BA và α -NAA (Bảng 2). Như vậy, môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA là môi trường nuôi cấy khởi động thích hợp cho vảy củ đôi cây lan huệ mạng.

Nghiên cứu của O'Rourke và cs. (1979) trên loài *Hipeastrum hybridum* "Apple Blossom" cũng cho kết luận tương tự. Các tác giả đã sử dụng củ nhỏ, vảy củ đôi và chồi đỉnh làm vật liệu vào mẫu và nuôi cấy trên môi trường bổ sung BA và kết hợp giữa BA với các chất thuộc nhóm auxin. Hiệu quả tái sinh đạt cao nhất trên môi trường bổ sung 2 - 5mg/l BA.



A B
Hình 1. Vảy củ đôi (A) và sự tạo chồi và củ nhỏ tái sinh từ vảy củ đôi trên môi trường MS + 3 mg/l BA sau 5 tuần nuôi cấy (B)

3.2. Nhân nhanh

3.2.1. Nhân nhanh từ chồi *in vitro*

Các chồi tái sinh trong các thí nghiệm trên được tách rời, cấy chuyển qua môi trường nhân nhanh. Các kết quả nghiên cứu trên chi *Hippeastrum* đã chỉ ra hiệu quả nhân nhanh trên môi trường có bổ sung kết hợp các chất thuộc nhóm cytokinin và auxin cao hơn so với khi sử dụng riêng rẽ các chất này (O'Rourke và cs., 1991; Janet và cs., 1977).

Việc bổ sung kết hợp giữa BA và α -NAA vào môi trường nuôi cấy đã nâng cao hiệu quả nhân nhanh từ chồi cây lan huệ mạng (Bảng 3). Tuy nhiên sự sai khác giữa các công thức là không rõ ràng. Nếu quan tâm đến chỉ tiêu hệ số nhân thì công thức bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l α -NAA cho kết quả tốt nhất với hệ số nhân là 1,50 chồi/mẫu.

3.2.2. Nhân nhanh chồi từ củ con *in vitro*

Từ kết quả trên cho thấy, hệ số nhân từ chồi *in vitro* cây lan huệ mạng chưa cao, chỉ đạt cao nhất 1,50 chồi/mẫu. Đây chính là khó khăn trong quá trình nhân nhanh *in vitro* các loài thuộc chi *Hippeastrum*. Hệ số nhân từ chồi của loài *Hippeastrum hybridum* "Apple Blossom" mà O'Rourke và cs. (1979) thu được cao nhất chỉ đạt 3,5 chồi/mẫu. Để cải thiện hệ số nhân, một số tác giả đã nghiên cứu thay đổi một số thành phần môi trường, loại, nồng độ và tỷ lệ chất điều tiết sinh trưởng, điều kiện nuôi cấy cũng như sử dụng nguồn vật liệu khác. Khi sử dụng

callus làm vật liệu nhân nhanh loài *Hippeastrum spp. Hybrids*, Janet và cs. (1977) đã thu được 10 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần nuôi cấy.

Nhân nhanh bằng phương pháp cắt lát củ đã được rất nhiều nhóm tác giả nghiên cứu cả trong điều kiện *in vivo* và *in vitro*. Epharath và cs. (2001) đã sử dụng 7 phương pháp cắt củ, chia củ mẹ thành 2, 4, 8, 12, 16, 32 và 48 lát cắt, mỗi lát cắt đều mang 1 phần đế củ và giâm vào túi nilon có chứa chất khoáng bón cho cây. Các túi này được đặt trong điều kiện nhiệt độ 23°C trong 4 tháng. Kết quả cho thấy, khi cắt củ thành 48 phần thì số lượng chồi thu được là cao nhất, 34 chồi/mẫu. Năm 1991, O'Rourke và cs., cắt củ nhỏ *in vitro* tạo ra từ vảy củ đôi trên môi trường tạo củ của loài *Hippeastrum hybridum* "Apple Blossom" thành 2 hoặc 4 phần và tiếp tục nuôi cấy trong 10 - 12 tuần. Sau 26 - 28 tuần nuôi cấy, hệ số nhân thu được đã tăng lên 100 chồi/mẫu ban đầu. Bằng phương pháp cắt củ này, Slabbert và cs. (1993) cũng đã thu được 700 - 1000 cây từ 1 củ ban đầu sau 12 tháng.

Trong quá trình tạo vật liệu khởi đầu, nhận thấy vảy củ đôi thường có xu hướng tạo củ nhỏ đồng thời với tạo chồi, chúng tôi đã sử dụng các củ nhỏ này cắt thành 4 phần đều nhau theo chiều dọc của củ, mỗi lát cắt đều chứa một phần đế củ và cấy vào môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy các lát cắt này bắt đầu tạo chồi. Bảng 4 thể hiện kết quả nhân chồi từ củ con *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến khả năng nhân nhanh từ chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)
0	0	1,11	1,72
1	0,1	1,17	3,71
1	0,25	1,22	2,59
1	0,5	1,50	2,92
2	0,1	1,16	4,62
2	0,25	1,22	2,65
2	0,5	1,22	2,69
3	0,1	1,17	1,81
3	0,25	1,28	2,43
3	0,5	1,17	3,85
LSD 5%		0,19	0,32
CV%		9,20	6,40

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi từ củ nhỏ *in vitro*

BA (mg/l)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao trung bình chồi (cm)
0	4,50	1,59
1	3,00	0,72
3	4,83	0,94
5	7,17	0,98
LSD 5%	1,21	0,11
CV%	13,21	5,80

Khi sử dụng củ nhỏ *in vitro* làm vật liệu nhân nhanh, số chồi thu được tăng lên rõ rệt, đạt cao nhất (7,17 chồi/mẫu) ở công thức bổ sung 5 mg/l BA, cao hơn gấp 4,8 lần so khi nhân nhanh từ chồi (1,50 chồi/mẫu). Như vậy củ nhỏ *in vitro* cũng như phương pháp cắt củ đóng một vai trò quan trọng trong quá trình nhân nhanh *in vitro* cây lan huệ mạng.

3.3. Tạo rễ

Chồi *in vitro* cây lan huệ mạng có thể

hình thành ngay trên môi trường MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng tuy với tỷ lệ tạo rễ cũng như số rễ/chồi thấp. Khi bổ sung IBA vào môi trường thì tỷ lệ mẫu tạo rễ và số rễ/chồi đều đạt cao hơn, đặc biệt là ở công thức bổ sung 1 mg/l IBA (tỷ lệ ra rễ 83,33), tuy nhiên chiều dài rễ đạt cao nhất khi bổ sung vào môi trường 2 mg/l IBA. Bảng 5 thể hiện khả năng ra rễ của chồi lan huệ mạng trên môi trường chứa IBA sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ *in vitro*

IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình/chồi (rễ)	Chiều dài rễ trung bình (cm)	Đặc điểm rễ
0	44,44	1,28	0,77	Rễ bé, mảnh, màu trắng
0,5	50,00	2,07	0,94	Rễ trung bình, mảnh, màu trắng xanh hoặc nâu trắng
1	83,33	1,40	0,55	Rễ bé, màu trắng xanh hoặc trắng
2	44,44	1,92	1,09	Rễ dài mảnh, màu trắng hoặc trắng xanh
LSD 5%		0,29	0,11	
CV%		9,40	6,70	



A



B

Hình 2. Cây lan huệ mạng trước và sau khi đưa ra vườn ươm

A. Cây con *in vitro* hoàn chỉnh

B. Cây lan huệ mạng trên giá thể cát : trấu hun (1: 1) sau 4 tuần ra cây

3.4. Thích nghi cây ra vườn ươm

Cây con *in vitro* hoàn chỉnh được trồng trên giá thể cát cát : trấu hun với tỷ lệ 1 : 1 (v/v) với chế độ tưới 3 lần/ngày. Sau 2 tuần, tỷ lệ sống sót của cây ngoài vườn ươm là 100%, cây sinh trưởng phát triển khỏe mạnh (Hình 2).

môi trường MS chứa 5 mg/l BA, hệ số nhân chồi là 7,17 chồi/mẫu sau 4 tuần. Có thể sử dụng môi trường MS 1 mg/l IBA để kích thích chồi *in vitro* lan huệ mạng hình thành rễ. Cây *in vitro* hoàn chỉnh được thích nghi ở vườn ươm trên giá thể cát và trấu hun theo tỷ lệ 1:1 (v/v).

4. KẾT LUẬN

Sử dụng vảy củ đôi làm vật liệu vào mẫu khởi đầu trên môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA sau 5 tuần nuôi cấy cho 100% mẫu tạo chồi, đạt 1,91 chồi/mẫu, các mẫu tạo củ đồng thời với tạo chồi. Chồi và củ nhỏ tạo ra được sử dụng để nhân nhanh chồi. Hiệu quả nhân chồi đạt cao nhất khi sử dụng củ nhỏ *in vitro* cắt thành 4 phần và nuôi cấy trên

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Khoa học cơ bản cấp Bộ, mã số B2008-11-80.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bapat V.A. & Narayanaswamy S. (1976). Growth and Organogenesis in Explanted

- Tissues of Amaryllis in Culture. Bulletin of the Torrey Botany Club 103 (2): 53-56.
- Chieh Li Huang, Kuo Cheng Chang & Hiroshi Okubo (2005). In vitro morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum x Hybridum*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 50 (1), 19 – 25.
- De Bruyn M.H, Ferreira D.I., Slabbert M.M. & Pretorius J. (1992). *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31:179-184.
- Epharath J.E., Ben-Asher., Baruchin F., Alekperov C., Dayan E. & Silerbush M. (2001). Various cutting methods for the propagation of *Hippeastrum* bulbs. *Biotronics* 30, 75-83.
- Funganti C. (1975). The Amaryllidaceae alkaloids. Academic Press, New York, Vol.XV: The Alkaloids, pp. 83- 164.
- Hussey G. (1975). Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. *J. Exp. Bot.* 26: 253-262.
- O'Rourke. E.N, Fountain. W.M & Sharghi. S. (1979). Propagation of *Hippeastrum* from floral tissues by in vitro culture. *Herbertia* 47: 51-52
- O'Rourke E.N., Fountain W.M. & Sharghi. S. (1991). Rapid propagation of *Hippeastrum* bulblets by *in vitro* culture. *Herbertia* 47(1): 54-55.
- Seabrook J.E.A. & Cumming B.G. (1977). The *in vitro* propagation of *Amaryllis (Hippeastrum spp.hybrids)*. *In vitro*, Volume 13, No.12.
- Seabrook J.E.A., Cumming B.G. & Dionne L.A. (1976). The *in vitro* induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Can. J. Bot.* 54: 814 – 819.
- Siddique M.N.A, Sultana J, Sultana N & Hossain M.M. (2007). Ex vitro Establishment of *in vitro* Produced Plantlets and Bulblets of *Hippeastrum (Hippeastrum hybridum)*. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2(3): 22-24.
- Slabbert M.M., De Bruyn M.M., Ferreira D.I. & Pretorius J. (1993). Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii in vitro*. *Plant cell, Tissue and organ culture*, volume 33, Number 2: 133-141.