

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN-VITRO* CÂY HOA LOA KÈN ĐỎ NHUNG (*HIPPEASTRUM EQUESTRE* HERB)

The Preliminary Research on Micropropagation of *Hippeastrum equestre* Herb.

Ninh Thị Thảo¹, Nguyễn Thị Cúc¹, Nguyễn Hạnh Hoa², Nguyễn Thị Phương Thảo¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
²Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Loa kèn đỏ nhung (*H.equestre* Herb) là một giống cây trồng có nhiều ý nghĩa về giá trị thẩm mỹ và đặc tính chữa bệnh. Nhưng ở nước ta, phương pháp nhân giống vô tính *in-vitro* loài cây này lại chưa được quan tâm nhiều. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định một số thông số kỹ thuật để hướng tới xây dựng quy trình nhân giống *in-vitro* cây loa kèn đỏ nhung. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra: nguồn vật liệu vào mẫu ban đầu tốt nhất của cây loa kèn đỏ nhung là phần đế củ mang 2 vảy củ, môi trường vào mẫu tốt nhất là môi trường MS có bổ sung 5 mg/l BA. Trên môi trường này, tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 94,44%. Môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l α - NAA cho hệ số nhân chồi cao nhất, đạt 1,93 chồi/4tuần, các chồi sinh trưởng khoẻ mạnh. Trên môi trường chứa 0,2 mg/l α - NAA, 91,67% các chồi ra rễ, số lượng rễ nhiều, chất lượng tốt.

Từ khoá: BA, hệ số nhân, *Hippeastrum equestre* Herb., loa kèn đỏ nhung, nhân giống vô tính *in-vitro*, α - NAA.

SUMMARY

Hippeastrum equestre Herb. (*H. equestre* Herb) is a valuable ornamental as well as medicinal plant. However, there has been less interest in carrying out researches on micropropagation of this species in Viet Nam. This study was conducted in order to establish the initial protocol for rapid propagation of *H.equestre*. Results of the research showed that the highest rate shoot - regeneration (94. 44%) was obtained with twin scale explants cultured on MS medium containing 5 mg/l BA. The optimal medium for shoot proliferation was MS supplemented with 1 mg/l BA and 0.5 mg α - NAA. On this medium, the highest rate of shoot propagation was 1.93 per explant after 4 weeks. Adding 0,2 mg/l α - NAA to MS medium promoted the root induction of the shoots with the rooting rate of 91.67%.

Key words: BA, *Hippeastrum equestre* Herb., micropropagation, α - NAA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loa kèn đỏ nhung (*Hippeastrum equestre* Herb.) là một trong những giống hoa có tiềm năng phát triển của họ *Liliaceae* không chỉ do màu sắc hấp dẫn được sử dụng làm hoa cắt cành mà còn do bởi trong củ của nó có chứa các biệt dược giá trị như các loại alkaloids (Funganti, 1975), các lectins có hoạt tính chống siêu vi trùng, chống sưng viêm, chống ung thư, chữa bệnh Alzheimer, cầm máu và chữa vết thương.

Loa kèn đỏ nhung có sức sống rất mạnh mẽ, nó có thể sinh trưởng phát triển khoẻ mạnh trong cả những điều kiện khắc nghiệt về dinh dưỡng, ánh sáng. Nhân giống đơn giản, có thể từ củ con, từ lát cắt thân hành hoặc bằng hạt. Tuy nhiên hạn chế của các phương pháp nhân giống truyền thống này là tốn nhiều thời gian, cây không đồng nhất, hệ số nhân không cao, không tạo được cây sạch bệnh và có thể bị lẫn tạp giống. Để khắc phục những hạn chế trên, Mii và cs. (1974),

Husey (1975), Seabrook và cs. (1976), De Buruyn (1992)... đã sử dụng phương pháp nhân giống *in-vitro* để nhân giống cây Loa kèn đỏ nhưng, kết quả đã tạo được cây sạch bệnh, có hệ số nhân cao và rút ngắn thời gian nhân giống. Hạn chế lớn nhất của phương pháp này là hiệu quả nhân giống phụ thuộc rất lớn vào loại vật liệu ban đầu (Janet Seabrook và cs., 1977).

Mặc dù có rất nhiều thuận lợi trong nhân giống cũng như khả năng thương mại nhưng ở nước ta tình hình sản xuất, kinh doanh cũng như nghiên cứu cây loa kèn đỏ nhưng chưa được quan tâm, đặc biệt là chưa có nhiều nghiên cứu về phương pháp nhân giống vô tính *in-vitro*. Nghiên cứu này nhằm tìm ra các thông số kỹ thuật thích hợp cho quy trình nhân giống *in-vitro* cây loa kèn đỏ nhưng làm cơ sở cho việc nhân nhanh các nguồn gen ưu tú phục vụ công tác chọn tạo giống mới.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Giống loa kèn đỏ nhưng (*Hippeastrum equestre* Herb).

2.2. Vật liệu thí nghiệm

Nghiên cứu sử dụng 2 loại vật liệu là phần đế củ không mang vảy củ được cắt với kích thước 1 mm x 1 mm (mẫu cấy 1) và phần đế củ có kích thước 4 mm mang 2 vảy củ có kích thước dài x rộng là 10 mm x 10 mm (mẫu cấy 2).

2.3. Phương pháp khử trùng mẫu cấy

Củ loa kèn đỏ nhưng được làm sạch bề mặt dưới vòi nước chảy mạnh. Sau đó ngâm phần đế củ (đối với thí nghiệm tái sinh từ mẫu cấy 1), hoặc phần đế củ và vảy củ (đối với thí nghiệm tái sinh từ mẫu cấy 2) 10 phút trong xà phòng. Rửa lại dưới vòi nước trong 5 phút. Các mẫu cấy này được ngâm

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 mẫu trong dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 10 phút, rửa lại 4 - 5 lần bằng nước cất vô trùng, mỗi lần 1 phút. Cắt mẫu ở các kích thước khác nhau tùy thuộc vào từng thí nghiệm và cấy vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy là 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 15 phút.

Quá trình nuôi cấy được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 24±2°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

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: Tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu hình thành chồi (giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu), hệ số nhân chồi, chiều cao chồi, trạng thái chồi (giai đoạn nhân nhanh), tỷ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ (giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh). Các chỉ tiêu được theo dõi định kỳ 1 tuần/lần.

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%.

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 1 năm 2008 đến tháng 3 năm 2009 tại Phòng Thí nghiệm nuôi cấy mô, Khoa Công nghệ sinh học, Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu

3.1.1. Ảnh hưởng của 2 loại mẫu cấy và BA đến khả năng tái sinh chồi Loa kèn đỏ nhưng

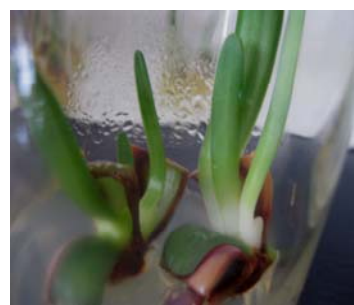
Hai loại mẫu cấy (mẫu cấy 1 và mẫu cấy 2) sau khi khử trùng được cấy vào môi trường dinh dưỡng có bổ sung BA ở các nồng độ dao động từ 1 - 5 mg/l.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi của hai loại mẫu cây cây loa kèn đỏ nhưng *H.equestre*

BA (mg/l)	Mẫu cây 1			Mẫu cây 2		
	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu cây (chồi)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu cây (chồi)
0 (Đ/C)	33,33	1,55	1,33	50	1,31	1,29
1	44,44	0,96	1,61	83,33	1,32	1,76
2	44,44	1,4	2	77,78	1,98	1,88
3	44,44	1,01	1,39	83,33	1,94	1,87
4	27,78	1,15	1	77,78	1,99	1,93
5	27,78	1,05	1	94,44	2,16	2,12



A



B

Hình 1. Sự tái sinh chồi của 2 loại mẫu cây trên môi trường bổ sung BA

(A): Mẫu cây 1 (phần đế củ không mang vảy củ) trên môi trường chứa 5 mg/l BA

(B): Mẫu cây 2 (phần đế củ mang 2 vảy củ) trên môi trường chứa 2 mg/l BA

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, BA có tác dụng kích thích các mẫu cây tái sinh, tuy nhiên đối với các loại mẫu cây khác nhau thì nồng độ BA thích hợp là khác nhau. Với mẫu cây 1, khi bổ sung BA từ 1 - 3 mg/l, đặc biệt ở công thức bổ sung 2 mg/l BA thì tỷ lệ mẫu tạo chồi (44%) và số chồi tạo ra (2 chồi/mẫu cây) cao hơn đối chứng (33,33% và 1,3 chồi/mẫu cây). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lên 4 - 5 mg/l thì hiệu quả tái sinh lại không tăng lên mà còn thấp hơn so với đối chứng. Ngược lại, với mẫu cây 2 tất cả các công thức có bổ sung BA đều cho tỷ lệ tạo chồi cũng như số chồi tạo ra cao hơn đối chứng và đạt cao nhất ở nồng độ 5 mg/l BA với 94,44% tỷ lệ mẫu tạo chồi, 2,12 chồi/mẫu cây.

Hai loại mẫu cây 1 và 2 cho kết quả tái sinh hoàn toàn khác nhau. Tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi tạo ra/mẫu cây tối đa của loại mẫu cây 2 đạt 94,44% và 2,12 chồi, hầu hết các chồi tạo ra ở giữa hai vảy củ, một số ít xuất hiện ở mặt ngoài, chỗ tiếp xúc giữa vảy củ và đế củ. Trong khi ở mẫu cây 1, chỉ đạt được tối đa là 44,44% và 2 chồi tương ứng với hai chỉ tiêu trên. Điều này chứng tỏ mẫu cây 2 là nguồn vật liệu ban đầu thích hợp cho nhân giống *in-vitro* cây loa kèn đỏ nhưng hơn mẫu cây 1.

Đối với các cây thuộc họ *Liliaceae*, khi sử dụng phương pháp nhân giống *in-vitro* thì yếu tố ảnh hưởng quyết định đến hiệu quả nhân giống là loại vật liệu sử dụng ban đầu.

Rất nhiều loại vật liệu đã được sử dụng trong các nghiên cứu như vảy củ không dính đế củ (Mii và cs., 1974; Seabrook và Cumming, 1977), phần đế củ mang một vảy củ và phần đế củ mang 2 vảy củ (De Bruyn và cs., 1990; De Bruyn và cs., 1992), phần đế củ không mang vảy củ (Bapat và Narayanaswamy, 1976), các bộ phận của hoa như cuống hoa (Janet và cs., 1977; Seabrook và Cumming, 1976; De Bruyn và cs., 1992), chồi *in-vivo* hoặc củ *in-vitro* nhỏ (Hussey, 1975; De Bruyn và cs., 1992)...

Các nghiên cứu đã chỉ ra có sự khác biệt rõ rệt trong kết quả nuôi cấy khi sử dụng các loại vật liệu nuôi cấy khác nhau. M.H De Bruyn và cs. (1990) sử dụng phần đế củ có kích thước 4 mm mang 2 vảy củ kích thước dài x rộng là 25 mm x 10 mm (mẫu cấy 2) để nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 80% cao hơn rất nhiều so với mẫu cấy đế củ không mang vảy củ (mẫu cấy 1), gần như không có mẫu tái sinh. M.M. Slabbert và cs. (1993) nuôi cấy phần đế củ mang 2 vảy củ (twin scales) cây *Crinum macowanii* (thuộc họ *Liliaceae*) trên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l α -NAA và 0,1 mg/l Kinetin đã thu được 700 - 1000 chồi từ 1 mẫu cấy ban đầu sau 12 tháng nuôi cấy, trong khi nếu sử dụng các bộ phận của hoa thì con số này chỉ là 100 chồi. Rất nhiều các nghiên cứu khác cũng đã khẳng định phần đế củ mang 2 vảy củ cho kết quả nhân tốt nhất (Janet Seabook và cs., 1977; Mii và cs., 1974).

3.1.2. Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng tái sinh từ mẫu cấy 1

Trong nuôi cấy mô tế bào, sự phối hợp giữa cytokinin và auxin ở nồng độ và tỷ lệ thích hợp không những cho khả năng tái sinh chồi cao mà còn ảnh hưởng tích cực đến số chồi hình thành cũng như sự sinh trưởng của chồi.

Tổ hợp giữa 2 mg/l BA và 0,1 - 1 mg/l IAA không cho hiệu quả tái sinh cao, thậm

chí tỷ lệ mẫu tạo chồi và chiều cao chồi thấp hơn đối chứng ở tất cả các công thức. Tuy nhiên số chồi hình thành đạt cao nhất (1,83 chồi) thu được ở công thức bổ sung 2 mg/l BA và 0,25 mg/l IBA.

3.1.3. Ảnh hưởng của BA và α -NAA đến khả năng tái sinh từ mẫu cấy 2

Kết quả ở bảng 3 cho thấy sự kết hợp giữa BA và α -NAA đã làm tăng hiệu quả tái sinh của loại mẫu cấy 2. Đặc biệt ở công thức bổ sung 5 mg/l BA và 0,25 mg/l α -NAA cho tỷ lệ mẫu tạo chồi (88,89%) và số chồi/mẫu cấy (2,31 chồi) là cao nhất.

Qua thí nghiệm vào mẫu chúng tôi có nhận xét: phần đế củ mang 2 vảy củ làm vật liệu vào mẫu ban đầu thích hợp hơn phần đế củ không mang vảy củ. Môi trường vào mẫu chứa 5 mg/l BA tốt hơn môi trường bổ sung kết hợp BA và các chất điều tiết sinh trưởng nhóm auxin.

3.2. Nghiên cứu nhân nhanh chồi hoa loa kèn đỏ nhưng

Trong quy trình nhân giống *in-vitro*, giai đoạn nhân nhanh có ảnh hưởng quyết định đến kết quả nhân giống. Yêu cầu đặt ra với giai đoạn này là phải xác định được môi trường nhân nhanh thích hợp để có thể thu được hệ số nhân cao, cây tạo ra đồng nhất và sinh trưởng khoẻ mạnh. Các kết quả nghiên cứu trên chi *Hippeastrum* đã chỉ ra việc kết hợp hợp lý các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin và auxin cho hiệu quả nhân nhanh cao hơn so với việc sử dụng riêng rẽ các chất này (O'rourke và cs., 1991; Janet Seabook và cs., 1977).

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi bổ sung kết hợp BA và α -NAA hệ số nhân chồi cao hơn so với đối chứng, đặc biệt ở công thức bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l α -NAA (hệ số nhân đạt 1,93 chồi/mẫu trong khi đối chứng có hệ số nhân 1 chồi/mẫu). Tuy nhiên, chiều cao chồi đạt cao nhất ở công thức bổ sung 2 mg/l BA và 0,1 mg/l α -NAA (3,94 cm).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và IAA đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu cấy 1

BA (mg/l)	IAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu (chồi)
0	0 (Đ/C)	50	2,18	1,17
2	0,1	33,33	0,42	1
2	0,25	41,67	0,79	1,83
2	0,5	41,67	0,56	1,5
2	1	25	1,25	1

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và α - NAA đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu cấy 2

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu (chồi)
0	0	66,67	0,69	1,26
5	0,1	72,22	1,17	2
5	0,25	88,89	1,56	2,31
5	0,5	61,11	1,74	1,67
5	1	72,22	1,78	1,57

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA và α -NAA đến hệ số nhân chồi cây loa kèn đỏ nhung *H.equestre*

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (số chồi/mẫu)	Chiều cao chồi trung bình (cm)
0	0	1	1,87
	0,1	1	1,79
1	0,25	1,33	2,41
	0,5	1,93	1,56
	0,1	1	3,49
2	0,25	1,17	3,14
	0,5	1,5	2,58
	0,1	1,5	2,5
3	0,25	1,33	1,46
	0,5	1,17	2,3

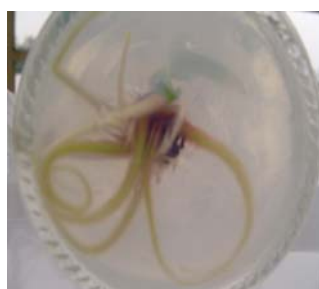
Kết quả trên cũng cho thấy hệ số nhân từ chồi *in-vitro* của cây loa kèn đỏ nhung chưa cao. Thực tế đây cũng là khó khăn mà rất nhiều nghiên cứu nhân giống trên đối tượng này đã gặp phải. E.N. O'Rourke và cs. (1979) tiến hành nhân nhanh cây *Hippeastrum hybridum* "Apple Blossom" và hệ số nhân cao nhất thu được chỉ là 3,5 chồi/chồi ban đầu. Để cải thiện hệ số nhân, một số tác giả khác đã nghiên cứu sử dụng các nguồn vật liệu nhân nhanh khác. Janet và cs., (1977) đã sử dụng callus làm vật liệu

nhân nhanh cây *Hippeastrum* spp. Hybrids và đã thu được hệ số nhân 10 chồi/mẫu cấy sau 8 tuần nuôi cấy. E.N. O'Rourke và cs., (1981) sử dụng củ nhỏ *in-vitro* làm vật liệu nhân nhanh cây *Hippeastrum hybridum* "Apple Blossom" và hệ số nhân thu được đã tăng lên 100 chồi/củ ban đầu sau 26 - 28 tuần nuôi cấy.

Do vậy cần phải sử dụng các nguồn vật liệu nhân khác nhau, đồng thời cải thiện môi trường nhân thích hợp để nâng cao hệ số nhân nhanh cây loa kèn đỏ nhung.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α - NAA đến khả năng ra rễ giống loa kèn đỏ nhung *H. equestre*

α - NAA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình/chồi (rễ)	Chiều dài rễ trung bình (cm)	Ghi chú
0	50	1,67	1,4	Rễ bé mảnh, trắng nâu
0,1	83,33	5,94	1,94	Rễ dài, mảnh, màu trắng xanh hoặc nâu trắng
0,2	91,67	6,94	4,28	Rễ mập, dài, màu trắng xanh hoặc nâu trắng
0,3	91,67	4,44	2,4	Rễ dài mảnh, trắng nâu hoặc trắng xanh
0,4	83,33	4,89	3,52	Rễ trung bình, màu trắng xám hoặc nâu
0.5	91,67	5,72	3,48	Rễ to, dài, màu trắng xám hoặc nâu



0,1 mg/l α - NAA



0,2 mg/l α - NAA



0,5 mg/l α - NAA

Hình 2. Hiệu quả của α - NAA đến khả năng hình thành rễ của chồi loa kèn đỏ nhung

3.3. Nghiên cứu tạo rễ cho chồi *in-vitro*

Chồi loa kèn đỏ nhung tạo ra trong giai đoạn nhân nhanh có một số ít tự hình thành rễ, tuy nhiên đa số là chưa hình thành rễ. Vì vậy, nghiên cứu nhằm tìm ra môi trường tạo rễ thích hợp nhất cho chồi loa kèn đỏ nhung để thu được cây hoàn chỉnh, có bộ rễ khỏe mạnh, có thể đưa ra trồng trong điều kiện tự nhiên. α - NAA thuộc nhóm auxin có tác dụng kích thích hình thành rễ bất định nên thường được sử dụng để tạo rễ cho chồi *in-vitro*.

Khi bổ sung α -NAA với các nồng độ từ 0,1 - 0,5 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ cũng như số lượng rễ trung bình hình thành ở một chồi cao hơn rất nhiều so với đối chứng. Đặc biệt là công thức bổ sung 0,2 mg/l α - NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ (91,67%) và số lượng rễ/chồi (6,94) cao nhất, rễ dài nhất (4,28 cm). Đồng

thời rễ mập, khoẻ, dài, rễ có màu trắng hoặc màu trắng xanh.

4. KẾT LUẬN

Nguồn vật liệu vào mẫu ban đầu thích hợp nhất của cây loa kèn đỏ nhung *H.equestre* Herb là phần đế củ mang hai vảy củ, cho tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 94,44%; 2,12 chồi/mẫu cấy, chiều cao chồi trung bình 2,16 cm khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 5 mg/l BA.

Trong giai đoạn nhân nhanh, hệ số nhân lớn nhất đạt 1,93 khi cấy chuyển các chồi tạo ra ở giai đoạn tạo vật liệu ban đầu sang môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA và 0,5mg/l α - NAA.

Môi trường thích hợp nhất để ra rễ cho chồi là môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l α - NAA, tỷ lệ ra rễ đạt 91,67%, trung bình có 6,94 rễ/chồi, chiều dài 4,28 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bapat V.A. and S. Narayanaswamy (1976). Growth and Organogenesis in Explanted Tissues of Amaryllis in Culture, *Bulletin of the Torrey Botany Club* 103 (2): 53-56.
- De Bruyn M.H., D.I. Ferreira, M.M. Slabbert and J. Pretorius (1992). *In-vitro* propagation of Amaryllis belladonna, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 179-184.
- O'Rourke E.N., W.M. Fountain & S. Sharghi (1991). Rapid propagation of Hippeastrum bulblets by *in-vitro* culture, *Herbertia* 47(1): 54-55.
- 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.
- Hussey G. (1976). *In-vitro* Release of Axillary Shoots From Apical Dominance in Monocotyledonous Plants. *Annals of Botany* 40: 1323-1325.
- Janet Seabrook E. A. and G. Bruce Cumming (1977). The *in-vitro* propagation of Amaryllis (Hippeastrum spp.hybrids), *In -vitro*, Volume 13, No.12.
- De Bruyn M.H., D.I. Ferreira, M.M. Slabbert and J. Pretorius (1992). *In-vitro* propagation of Amaryllis belladonna. *Biomedical and Life Sciences*, Volume 31, Number 3: 179 – 184.
- Slabbert M.M., M.M. De Bruyn, D.I. Ferreira and J. Pretorius (1993). Regeneration of bulblets from twin scales of Crinum macowanii *in-vitro*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, volume 33, Number 2: 133-141.
- Mii M., T. Mori and N. Iwase (1974). Organ formation from the excised bulb scales of Hippeastrum hybridum1 *in-vitro*. *J. Hortic. Sci.* 49: 241-244.
- O'Rourke E.N., W.M. Fountain and S. Sharghi (1979). Rapid propagation of Hippeastrum bulblets by *in-vitro* culture, *Herbertia* 47: 53.
- Seabrook J.E.A., B.G. Cumming and L.A. Dionne (1976). The *in-vitro* induction of adventitious shoot and root apices on Narcissus (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Can. J. Bot.* 54: 814 – 819.