

AN ORGANOGENIC *in vitro* SYSTEM FOR THE CONSERVATION AND MASS PRODUCTION OF *Haworthia truncata*

UN SISTEMA ORGANOGENICO *in vitro* PARA LA CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN EN MASA DE *Haworthia truncata*

Estrella K. Hernández-Vázquez¹, Hye Hyeon-Kim², Gee Young-Lee², Youn Hee-Kim², María de la L. Guerrero-González¹, Jae Hong-Lee², Jae Hong-Jung², Pablo Delgado-Sánchez^{1*}

¹Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Soledad de Graciano Sánchez, SLP, 78321. México. (pablo.delgado@uaslp.mx). ²Cactus and Succulents Research Institute, Gyeonggi Agricultural Research and Extension Services, Goyang-si, Gyeonggi-do, 0224. Republic of Korea.

ABSTRACT

Haworthia truncata, a species from South Africa, is characterized by truncated leaves at its flat and translucent apex, making it a species with great ornamental value. The objective of this research was to develop a micropropagation protocol for *Haworthia truncata*, for its future application on massive production of the species. A completely random design was established with 16 treatments for the induction of calluses with 12 repetitions for the combination of thidiazuron (TDZ) and 1-naphthaleneacetic acid (NAA), and five treatments for 6-benzylaminopurine (BA). For the induction of shoots and roots 16 treatments were established with five repetitions. Therefore, we developed an efficient and rapid *in vitro* micropropagation system where the formation of multiple calluses was achieved from different sections of leaves. Leaves were submerged in Murashige and Skoog (MS) 0.5X and 1X media, supplemented with two concentrations of NAA (1 mg L⁻¹ and 2 mg L⁻¹), each one combined with TDZ (1 mg L⁻¹ or 2 mg L⁻¹). A second experiment was carried out for the induction of callus in a 0.5X MS basal medium, adding 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹ BA. The induction stage of shoots used basal medium 0.5X MS. The growth regulators used were 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹ BA; and 0.1 and 1 mg L⁻¹ NAA. The highest percentage of callus induction was observed with the growth regulators 1 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ and 2 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ. When BA was used, the highest percentage of callus emerged in 0.5 mg L⁻¹ BA. The treatment of 4 mg L⁻¹ BA showed the highest number of shoots 140 d after sowing. For the acclimatization of plants in substrate there was a

RESUMEN

Haworthia truncata, una especie sudafricana, se caracteriza por presentar hojas truncadas en su ápice plano y translúcido, lo cual le otorga un importante valor ornamental. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de micropropagación para la producción masiva de *Haworthia truncata*. Un diseño completamente aleatorio se estableció con 16 tratamientos para inducir la formación de callos y 12 repeticiones para la combinación de thidiazuron (TDZ) y ácido 1-naftalenacético (NAA), así como cinco tratamientos para 6-bencilaminopurina (BA). Para la inducción de brotes y raíces se establecieron 16 tratamientos con cinco repeticiones. De esta forma, desarrollamos un sistema de micropropagación *in vitro* rápido y eficiente capaz de producir múltiples callos a partir de diferentes secciones foliares. Las hojas se sumergieron en medio Murashige y Skoog (MS) 0.5X y 1X, y un suplemento con dos concentraciones de NAA (1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹), cada una combinada con TDZ (1 mg L⁻¹ o 2 mg L⁻¹). Un segundo experimento se realizó para inducir la formación de callos en medio basal de MS 0.5X, adicionado con 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg de BA. Para la fase de inducción de brotes se empleó el medio basal de MS 0.5X. Los reguladores de crecimiento usados fueron 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹ de BA; y 0.1 y 1 mg L⁻¹ de NAA. El porcentaje más alto de inducción de brotes se observó con las siguientes combinaciones de reguladores de crecimiento: 1 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ y 2 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ. El porcentaje más alto de inducción de callos con BA se obtuvo con la concentración de 0.5 mg L⁻¹. El tratamiento con 4 mg L⁻¹ de BA presentó el mayor número de brotes 140 d después de la siembra. Para la aclimatización de las plantas en el sustrato, el porcentaje de supervivencia fue 80-90%. En este estudio se presenta un sistema organogénico eficiente empleando medio de cultivo para la producción masiva de *H. truncata*.

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.
Received: April, 2019. Approved: December, 2019.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 54: 619-630. 2020.

survival of 80-90%. An efficient organogenic system with culture medium for *H. truncata* mass production is shown in this study.

Key words: Organogenesis, plant growth regulators, succulents, tissue culture.

INTRODUCTION

The genus *Haworthia* belongs to the Xanthorrhoeaceae family (The Plant List, 2013) and has about 68 species with 41 subspecies (Jessy *et al.*, 2005). *Haworthia truncata* is a succulent plant, with seven to nine leaves arranged neatly in two exactly opposite rows, ending in a truncated flat and translucent apex. Leaves are 2.5-3.5 cm long, 1.5-3 cm wide, 5-7 mm thick, and slightly curved. The inflorescence of *H. truncata* is approximately 23 cm high and flowering takes place in February, March and April (Scoot, 1985). The flowers are white, about 1 cm long, with five petals, which appear at the end of the stems grouped in clusters (Lee, 2010). *Haworthia* is from South Africa and is mainly concentrated in the eastern and western provinces of the Cape (RSA), where it grows along the Indian Ocean and on the slopes and hills (Nuzhyna and Gaydarzhy, 2015) in various habitats at an altitude of 2000 m; besides, it tends to grow in shallow soils in open to closed scrublands and stony soils (Scoot, 1985). Intensive agricultural practices and land-use-change have a strong impact on the stability of this species population (Mycock *et al.*, 1997; Wiersema and León, 2013).

Japanese farmers have raised some extraordinary variations of this species and several of them are available in the market. *Haworthia* species grows by seeds that germinate very easily because they can be pollinated by hand. Besides, it is cultivated by cuttings, in which a leaf is carefully cut and roots are expected to come out. However, it can be a very slow process that takes several months for the plant to be ready for planting (Mycock *et al.*, 1997). The survival of the genus is also threatened by the high demand of collectors because it is a plant of great ornamental value (OVATA, 2017). Efforts to find new alternatives to establish efficient *in vitro* protocols of *Haworthia* are very scarce. A protocol that produces efficient differentiation, development and regeneration of whole plants, is essential for the conservation and mass production of these plants.

Palabras clave: organogénesis, reguladores de crecimiento vegetal, suculentas, cultivo de tejidos.

INTRODUCCIÓN

El género *Haworthia* pertenece a la familia Xanthorrhoeaceae (The Plant List, 2013) y tiene alrededor de 68 especies y 41 subespecies (Jessy *et al.*, 2005). *Haworthia truncata* es una planta suculenta, con siete a nueve hojas dispuestas de forma ordenada en dos hileras exactamente opuestas, las cuales terminan en un ápice truncado plano y translúcido. Las hojas son ligeramente curvas y miden 2.5-3.5 cm de largo, 1.5-3 cm de ancho, 5-7 mm de grosor. La inflorescencia de *H. truncata* mide aproximadamente 23 cm de alto; la floración ocurre en febrero, marzo y abril (Scoot, 1985). Las flores son blancas, longitud aproximada de 1 cm, con cinco pétalos agrupados al final de los tallos (Lee, 2010). *Haworthia* es de Sudáfrica y se concentra principalmente en las provincias orientales y occidentales del Cabo (RSA), donde crece a lo largo del Océano Índico y en las laderas y colinas (Nuzhyna y Gaydarzhy, 2015) en diversos hábitats a una altitud de 2000 m; también suele crecer en suelos poco profundos, en matorrales abiertos o cerrados y suelos rocosos (Scoot, 1985). Las prácticas agrícolas intensivas y el cambio del uso del suelo tienen un fuerte impacto en la estabilidad poblacional de esta especie (Mycock *et al.*, 1997; Wiersema y León, 2013).

Agricultores japoneses han cultivado variaciones extraordinarias de esta especie, y varias están disponibles en el mercado. La especie *Haworthia* crece a partir de semillas que germinan con facilidad porque se pueden polinizar de forma manual. También se cultiva a partir de explantes, en los que se corta con cuidado una hoja y se espera que crezcan raíces. Sin embargo, puede ser un proceso muy lento que tarda varios meses para que la planta esté lista para plantar (Mycock *et al.*, 1997). La supervivencia del género también está amenazada por la alta demanda de colectores, ya que es una planta de gran valor ornamental (OVATA, 2017). Los esfuerzos para encontrar nuevas alternativas para establecer protocolos *in vitro* para *Haworthia* son muy escasos. Un protocolo que genere la diferenciación, el desarrollo y la regeneración eficiente de plantas completas es esencial para la conservación y producción en masa de estas plantas.

For developing an efficient propagation *in vitro* and the massive multiplication of the species, the appropriate selection of a basal medium and the correct selection of the growth regulators such as auxins and cytokinins, are elementary for indirect organogenesis and to obtain a favorable response (Singh *et al.*, 2016). Cytokinins can be divided into two main groups: naturally occurring adenine derivatives such as kinetin (KT) and 6-benzylaminopurine (BA), and synthetic phenyl urea derivatives as thidiazuron (TDZ) (Jiang *et al.*, 2004). TDZ is involved in cytokinin metabolism and it induces the accumulation of endogenous cytokinins (Mok *et al.*, 1982; Murthy *et al.*, 1995). Auxins, such as 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA), induce root formation and elongation of shoots in various species (Soto *et al.*, 2019). However, knowledge about the distribution of extra and intracellular auxins and cytokinins, as well as levels in cell compartments, is needed (Skalicky *et al.*, 2018).

The hypothesis was that the division and differentiation of leaf explants may be possible with the optimal balance of the culture medium and growth regulators. The objective of this study was to establish the optimal conditions for the *in vitro* propagation of *H. truncata* through the induction of organogenesis as a strategy for the rescue, conservation and mass production of this species.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and its disinfection

Mother plants of *H. truncata* were obtained from the greenhouse “La Biznaga Vagabunda” located in Ezequiel Montes, Querétaro, México. Rosette leaves were carefully separated and used as explants and they were washed thoroughly under flow water for 2 min to remove surface particles. Under aseptic conditions, the explants were immersed in 96% ethanol for 1 min, and the leaves were immersed in a solution with 2% sodium hypochlorite (v/v) and 0.25 ml L⁻¹ tween-20 with constant shaking for 15 min, followed by three rinses with sterile distilled water. Finally, leaves were immersed in 70% ethanol for 3 min and rinsed with sterile distilled water.

Culture medium for callus induction

Sterile leaves were cut into two segments, apical and base, and incubated on bottles containing basal medium MS

Para desarrollar una eficiente propagación *in vitro* y la multiplicación masiva de *H. truncata*, la selección adecuada del medio basal y los reguladores de crecimiento, como auxinas y citoquininas, son esenciales para la organogénesis indirecta y para obtener una respuesta favorable (Singh *et al.*, 2016). Las citoquininas se pueden clasificar en dos grupos: naturales derivadas de la adenina como la cinetina (KT) y la 6-bencilaminopurina (BA), y sintéticas derivadas de la fenilurea como el thidiazuron (TDZ) (Jiang *et al.*, 2004). El TDZ está involucrado en el metabolismo de la citoquinina, e induce la acumulación de citoquininas endógenas (Mok *et al.*, 1982; Murthy *et al.*, 1995). Las auxinas, como el ácido 1-naftalenacético (NAA) y el ácido indol-3-butírico (IBA), inducen la formación de la raíz y la elongación de los brotes en diferentes especies (Soto *et al.*, 2019). Sin embargo, se requiere conocer más acerca de la distribución de las auxinas y citoquininas extra e intracelulares, así como de sus concentraciones en los compartimentos celulares (Skalicky *et al.*, 2018).

La hipótesis fue que la división y diferenciación de los explantes foliares se puede lograr con el balance óptimo del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento. El objetivo de este estudio fue establecer las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* de *H. truncata* por medio de la inducción de la organogénesis como una estrategia para el rescate, la conservación y la producción en masa de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y desinfección

Las plantas madre de *H. truncata* se obtuvieron del invernadero “La Biznaga Vagabunda” ubicado en Ezequiel Montes, Querétaro, México. La roseta de hojas se separó con cuidado y sus hojas se utilizaron como explantes. Los explantes se lavaron bajo un chorro de agua durante 2 min para retirar las partículas superficiales. Bajo condiciones asépticas, los explantes se sumergieron en etanol al 96% durante 1 min, y las hojas se sumergieron en una solución con hipoclorito de sodio al 2% (v/v) y 0.25 ml L⁻¹ de tween-20 con agitación constante durante 15 min, seguido por tres enjuagues con agua destilada estéril. Al final, las hojas se sumergieron en etanol al 70% durante 3 min y enjuagaron con agua destilada estéril.

Medio de cultivo para la inducción de callos

Las hojas estériles se cortaron en dos segmentos, apical y basal, y se incubaron en frascos con medio basal de MS (Murashige y

(Murashige and Skoog, 1962) at 0.5X or 1X, pH 6.0, 30 g L⁻¹ sucrose, 2.2 g L⁻¹ phytagel and growth regulators. For induction of callus, MS medium was supplemented with concentrations of: 1) 6-benzylaminopurine (BA, 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹), or 2) 1-naphthalene acetic acid (NAA, 1 mg L⁻¹ and 2 mg L⁻¹) and thidiazuron (TDZ, 1 mg L⁻¹ and 2 mg L⁻¹). Then, the bottles were sterilized in an autoclave. Treatments were five replicates for BA and twelve for NAA+TDZ (Table 1), and each replicate was one leaf cut in four segments.

The concentrations of the growth regulators were 1 mg L⁻¹ and 2 mg L⁻¹ NAA, and each was combined with 1 mg L⁻¹ and 2 mg L⁻¹ TDZ; thus, there were five treatments and twelve replicates for each treatment. For BA the treatments were 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹, and five replicates for each treatment (Table 1). All the cultures were maintained seven weeks under constant light (LED fluorescent lamps at 150 μ mol m⁻² s⁻¹) at 23 $\pm$ 2 °C for the induction of callus. Basal medium was changed every four weeks. Callus evaluation was performed with the color (green, lime green, and intense green) and friable callus.

Induction of shoots

Friable callus showing a green color, lime green or intense green were selected for shoots induction. These calluses were placed on 0.5X MS added with a combination of BA (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹) and NAA (0.0, 0.1, and 1.0 mg L⁻¹) at different concentrations. All cultures were maintained 20 weeks in plant growth chambers with light provided LEDs and a constant PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) of 150 μ mol m⁻² s⁻¹ at 23 $\pm$ 2 °C, and sub-cultured to fresh basal medium was changed every four weeks.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized. All cultures were observed daily to record the callus or shoots induction. The mean values, standard deviations and standard error of callus formation, shoot formation, average number of shoot/explants, and shoot survival were calculated using SAS[®] and Excel[™].

RESULTS AND DISCUSSION

Callus induction

For *H. truncata* species, callus were obtained at the fourth week after planting leaf explants, in a basal medium 1X and 0.5X MS without growth

Table 1. Treatments for callus induction using NAA, TDZ, and BA growth regulators.

Cuadro 1. Tratamientos para la inducción de callos usando los reguladores de crecimiento NAA, TDZ y BA.

Treatment (num)	NAA (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)
1	0	0	0
2	1	1	0
3	1	2	0
4	2	1	0
5	2	2	0
1	0	0	0.1
2	0	0	0.5
3	0	0	1
4	0	0	2
5	0	0	4

Skoog, 1962) 0.5X o 1X, con pH 6.0, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2.2 g L⁻¹ de Phytagel y reguladores de crecimiento. Para la inducción de callos, el medio MS tuvo un suplemento con concentraciones de: 1) 6-benzilaminopurina (BA, 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹) o 2) ácido 1-naftalenacético (NAA, 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹) y thidiazuron (TDZ, 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹). Después, los frascos se esterilizaron en una autoclave. Cinco repeticiones se realizaron para el tratamiento con BA y 12 para el tratamiento con NAA+TDZ (Tabla 1), y cada repetición correspondió a una hoja cortada en cuatro segmentos.

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento fueron 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹ de NAA, cada concentración se combinó con 1 mg L⁻¹ y 2 mg L⁻¹ de TDZ; así hubo cinco tratamientos y 12 repeticiones para cada tratamiento. Para la BA, los tratamientos fueron 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹, con cinco repeticiones para cada tratamiento (Tabla 1). Todos los cultivos se mantuvieron siete semanas bajo luz constante (lámparas LED fluorescentes a 150 μ mol m⁻² s⁻¹) a 23 $\pm$ 2 °C para la inducción de los callos. El medio basal se cambió cada cuatro semanas. Los callos se evaluaron con base en su color (verde, verde lima y verde intenso) y mediante la obtención de callos friables.

Inducción de brotes

Los callos friables de color verde, verde lima o verde intenso se seleccionaron para la inducción de los brotes. Estos callos se colocaron en medio MS 0.5X adicionado con una combinación de BA (0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹) y NAA (0.0, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹) a diferentes concentraciones. Todos los cultivos se mantuvieron 20 semanas en cámaras de crecimiento con luz proporcionada por LED a una PPFD constante de 150 μ mol m⁻²

regulators. This basal medium MS was used in most studies for the micropropagation of various succulent species (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015), including the micropropagation of *Haworthia* species such as: *H. chloracantha* Haw., *H. atrojusca*, *H. angustifolia* var. *Albensis* (schoenl.) V. Polln., *H. maughanii* V. Polln., *Haworthia* spp. aff. *baccata*. All these species developed and differentiated in the MS medium without growth regulators from inflorescence and gynaceous (Kaul and Shabarwal, 1972). Addition of growth regulators to MS medium caused a higher percentage of callus, as compared to MS medium without regulators.

The differentiation level of explants varies with the MS salts concentration in culture medium, the segment of the cultivated leaf (apex or base) and the type of plant growth regulators used (Figure 1). Thus, explants were classified according to the differentiation level as no callus formation, explants with a 25% of callus formation, callus formation in 50% of the explant, and explant exhibiting an abundant callus formation with amorphous mass of undifferentiated cells (Figure 1).

The establishment of *in vitro* cultures of plant tissues from different species of succulents plants were used with media supplemented with complex nutrients; for example, coconut milk, casein and yeast extract, and with chemically defined media (Starling and Dodds, 1983; Kordi *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2013; Youssef *et al.*, 2016; Cabahug *et al.*, 2018). However, in our experiment it was not necessary to use these supplements, since favorable responses were obtained in a basal medium with the lowest concentration of MS salts (*i.e.* 0.5X). Thus, we selected 0.5x MS medium basal for induction shoots.

Under control condition, both 0.5X and 1X MS, apex explants exhibit a higher callus formation than the base explants (Figure 2A, B). By using the basal medium 0.5X MS supplemented with 1 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ TDZ or 2 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ TDZ we obtained a 100% of callus from base explant at seven weeks. The use of TDZ and NAA can help to the proliferation of callus (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), whereas TDZ growth regulator cause callus differentiation in *H. turgida* (Liu *et al.*, 2017). Cell division explants were increased by using NAA and TDZ, whereas utilization of TDZ, NAA and the 0.5X MS medium caused >60% at seven weeks, as compared to the control treatment

s⁻¹ a 23±2 °C, y se subcultivaron en medio basal fresco, el cual se cambió cada cuatro semanas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Todos los cultivos se observaron día para registrar la inducción de callos y brotes. Los valores de las medias, las desviaciones y el error estándar de la formación de los callos y brotes, así como el número promedio de brotes/explante y la supervivencia del brote se calcularon con SAS[®] y Excel[™].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callos

Para la especie de *H. truncata*, los callos se obtuvieron en la cuarta semana después de sembrar los explantes de hojas, en un medio basal de MS 1X y 0.5X sin reguladores de crecimiento. El medio basal de MS se ha usado en la mayoría de los estudios para la micropropagación de varias especies de suculentas (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015), e incluyen diversas especies de *Haworthia*: *H. chloracantha* Haw., *H. atrojusca*, *H. angustifolia* var. *Albensis* (schoenl.) V. Polln., *H. maughanii* V. Polln., *Haworthia* spp. aff. *baccata*. Todas estas especies se desarrollaron y diferenciaron en el medio MS sin reguladores de crecimiento a partir de inflorescencias y gineceos (Kaul y Shabarwal, 1972). La adición de los reguladores de crecimiento al medio MS aumentaron el porcentaje de callos, en comparación con el medio MS sin reguladores.

El nivel de diferenciación de los explantes varía con la concentración de sales MS en el medio de cultivo, el segmento de hoja cultivado (ápice o base) y el tipo de reguladores de crecimiento vegetal utilizados (Figura 1). Así, los explantes se clasificaron conforme al nivel de diferenciación como: explantes sin formación de callos, explantes con una formación de callos de 25%, formación de callos en 50% de los explantes y explantes con una abundante formación de callos con una masa amorfa de células indiferenciadas (Figura 1).

El establecimiento de cultivos *in vitro* de tejidos vegetales de diferentes especies de suculentas se usaron con medios adicionados con nutrientes completos; por ejemplo, leche de coco, caseína y extracto de levadura, así como medios químicamente definidos

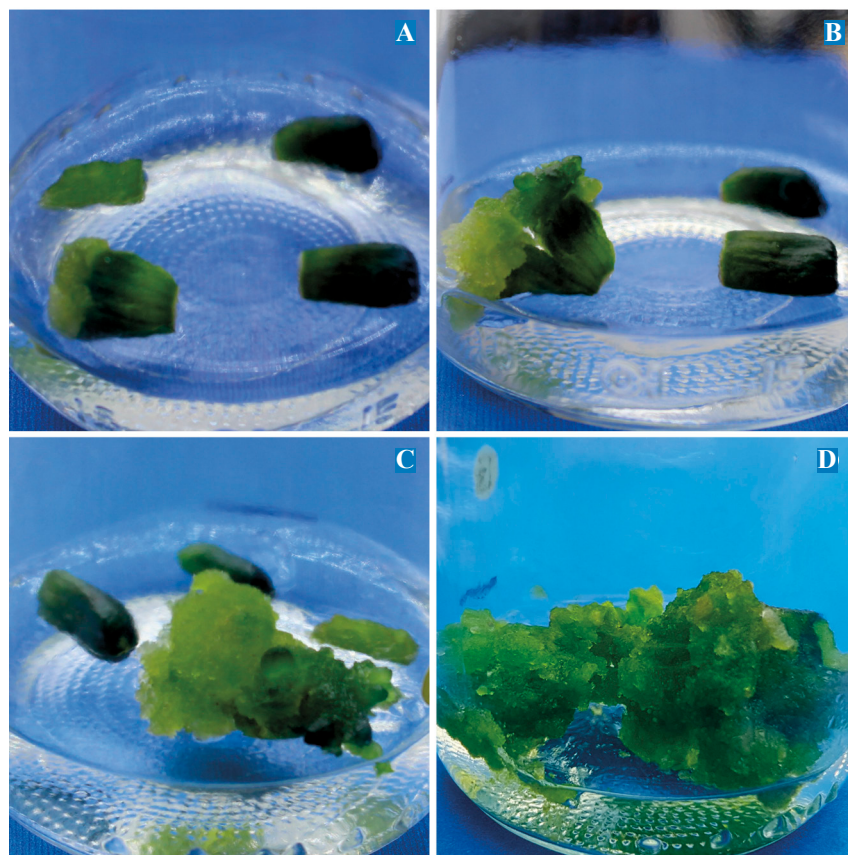


Figure 1. Representative images of explants showing different differentiation levels. A) Explants growing in with no evident callus formation in basal medium 0.5X MS without grow regulators; B) callus formation on the margins of the explant (25%) in basal medium 0.5X MS without grow regulators; C) callus formation in 50% of the explant in 1X MS 1 mg L⁻¹ TDZ+1 mg L⁻¹ NAA; D) abundant callus formation, amorphous mass of undifferentiated cells in 0.5X MS 1 mg L⁻¹ TDZ+1 mg L⁻¹ NAA.

Figura 1. Imágenes representativas de explantes con diferentes niveles de diferenciación. A) Explantes sin formación de callos creciendo en medio basal de MS 0.5X sin reguladores de crecimiento; B) formación de callos en los márgenes del explante (25%) en medio basal de MS 0.5X sin reguladores de crecimiento; C) formación de callos en 50% de los explantes en MS 1X adicionado con 1 mg L⁻¹ de TDZ+1 mg L⁻¹ de NAA; D) formación abundante de callos, masa amorfa de células indiferenciadas en medio MS 0.5X adicionado con 1 mg L⁻¹ de TDZ+1 mg L⁻¹ de NAA.

(without growth regulators). Besides, the percentage of callus is <50% for the apex explant and <20% for the base explant (control).

With the 1X MS basal medium (2 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ) we obtained >80% callus formation using the base as explant. For the apex explant, 1 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ caused the highest percentage of callus (80%) (Figure 2B). A similar result was reported for *H. maughanii*, with 100% callus percentage at 16 weeks after planting leaf segment in a medium with 1 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ (Kim *et al.* 2018). With 0.5X MS medium the differentiation of callus was higher in all treatments with growth regulators, except in the

(Starling y Dodds, 1983; Kordi *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2013; Youssef *et al.*, 2016; Cabahug *et al.*, 2018). Sin embargo, en nuestro experimento no fue necesario emplear estos suplementos, porque se obtuvieron respuestas favorables con un medio basal con las concentraciones más bajas de sales MS (es decir, 0.5X). Por lo cual seleccionamos el medio basal de MS 0.5X para la inducción de brotes.

Bajo condiciones controladas, en MS 0.5X y 1X, los explantes provenientes del ápice exhiben una mayor formación de callos que los explantes de la base (Figura 2A, B). Con el uso del medio basal de MS 0.5X más un suplemento con 1 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ o 2 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de

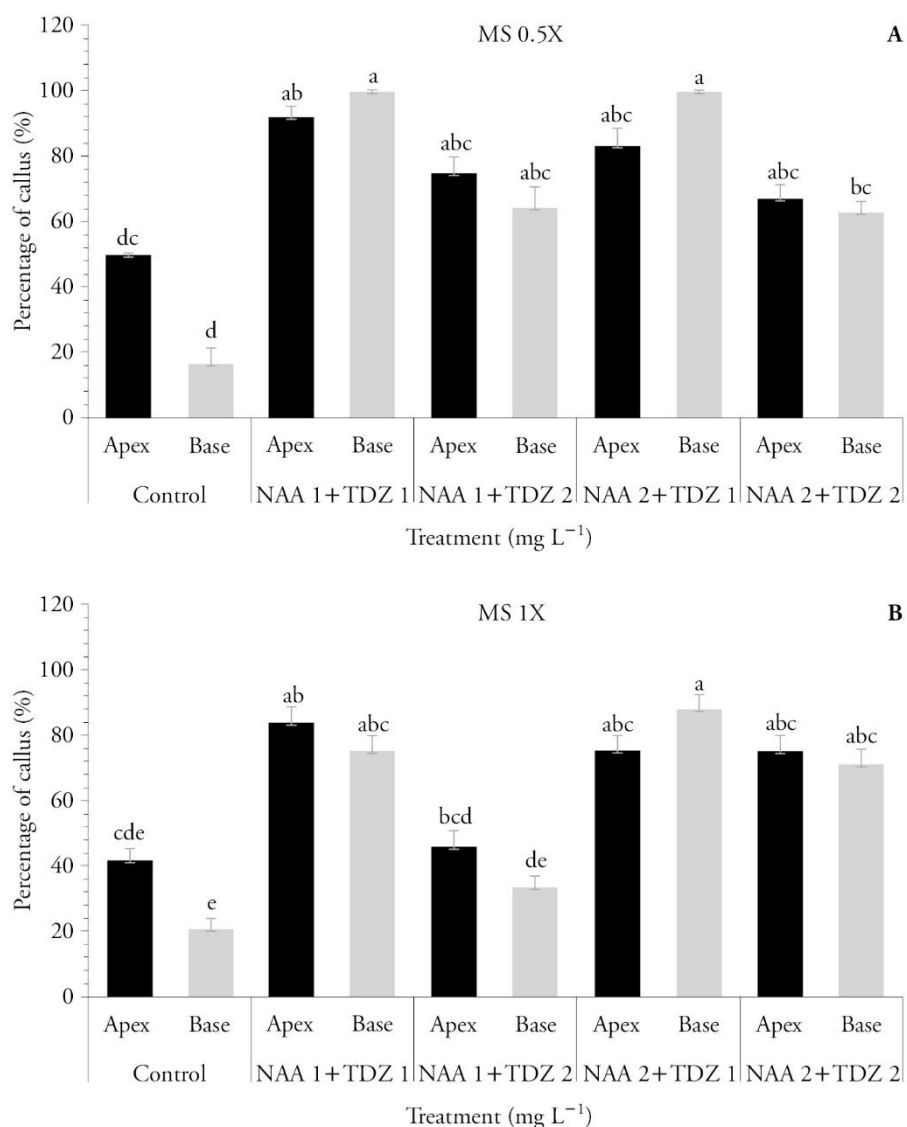


Figure 2. Percentage of callus according to the concentration of salts of the basic medium MS (0.5X and 1X), the segment of the explant (apex and base), and the combinations of growth regulators (NAA+TDZ). The vertical bar represents $\pm$ SD, $n=12$ ($p \leq 0.05$).

Figura 2. Porcentaje de callos con respecto a la concentración de las sales del medio basal de MS (0.5X y 1X), al segmento del explante (ápice o base) y a las combinaciones de los reguladores de crecimiento (NAA+TDZ). La barra vertical representa la $\pm$ DE, $n=12$ ($p \leq 0.05$).

control medium (without growth regulators) of the explant with $<20\%$ percentage of callus.

We also carried out an experiment using 0.5X MS+BA for callus induction from *H. truncata*, and found that the differentiation of calluses began seven days after sowing explants in all treatments. The treatments with 0.5 mg L^{-1} BA and 4 mg L^{-1} BA presented higher differentiation of callus (94% and 86%, respectively) (Figure 3). Zang *et*

TDZ, obtuvimos callos en 100% de los explantes de la base de la hoja a las siete semanas. El uso de TDZ y NAA puede ayudar a la proliferación de callos (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), mientras que el regulador de crecimiento TDZ genera la diferenciación de los callos en *H. turgida* (Liu *et al.*, 2017). La división celular de los explantes aumentó con el NAA y el TDZ, mientras que la adición de TDZ y NAA al medio MS 0.5X generó $>60\%$ a

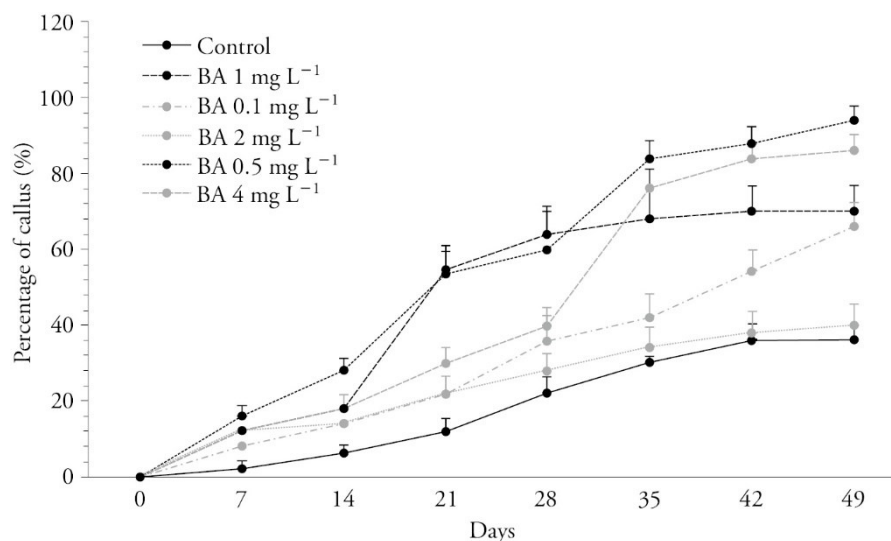


Figure 3. Percentage of callus induction according to evaluation days and concentration of growth regulator BA. Data obtained with analysis of variance of repeated measurements. The vertical bar represents $\pm$ SE, $n=5$ ($p \leq 0.05$).

Figura 3. Porcentaje de inducción de callos respecto a los días de evaluación y la concentración del regulador de crecimiento BA. Datos obtenidos con un análisis de varianza con medidas repetidas. La barra vertical representa el $\pm$ EE, $n=5$ ($p \leq 0.05$).

al. (2016) reported that the use of BA can generate compact and granular calluses. However, in our experiment the callus generated for *H. truncata* was of appearance friable. At 49 d after planting under control conditions (without growth regulators) we obtained a low percentage ($<40\%$) of callus formation, compared to the treatments with BA as growth regulator (Figure 3).

Treatments for callus induction were grouped using cytokinin BA at the seventh week after sowing (49 d after sowing), and significant differences were found between treatments (Table 2).

Induction of shoots

This friable calluses from *H. truncata* obtained in the previous experiments were evaluated in 0.5X basal medium MS with 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹ BA and 0.1 and 1 mg L⁻¹ NAA during 140 d for the appearance of shoots. Twenty weeks of after cultivation with the 4 mg L⁻¹ BA treatment, 15.7140% of *H. truncata* calluses developed 110 shoots (Table 3). Richwine *et al.* (1995) used flower explants and obtained buds 8 weeks after sowing “Haworthias” and Aloe; however, in a subsequent *in vitro* experiment with shoots placed in a medium

Table 2. Callus induction analysis at 7 weeks after planting for *Haworthia truncata* with the use of cytokinin BA.

Cuadro 2. Análisis de la inducción de callos siete semanas después de la siembra para *Haworthia truncata* con el uso de la citoquinina BA.

Treatment BA (mg L ⁻¹)	Callus induction (%)
0.5	94.00 a
4	86.00 a
1	70.00 a,b
0.1	66.00 a,b,c
2	40.00 b,c
Control	36.00 c

Values are means of five replicates for each treatment. Means with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). ♦ Los valores representan la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

las siete semanas en comparación con el tratamiento testigo (sin reguladores de crecimiento). Además, el porcentaje de callos es $<50\%$ para el explante del ápice y $<20\%$ para el explante de la base (testigo).

Con el medio basal de MS 1X (2 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ) obtuvimos $>80\%$ de

Table 3. Production of shoots and callus 140 days after sowing *H. truncata*.**Cuadro 3. Producción de brotes y callos 140 d después de sembrar *H. truncata*.**

Treatment (num.)	BA + NAA (mg L ⁻¹)	Shoots (num.)	Callus (%)
6	4 + 0	110	15.7140 a
8	0.5 + 0.1	55	7.8571 a,b,c
13	0.5 + 1	39	9.4286 a,b,c
Control	0 + 0	10	1.4286 b,c
4	1 + 0	33	4.7143 b,c
5	2 + 0	40	5.7413 b,c
9	1 + 0.1	14	2.8571 b,c
10	2 + 0.1	6	1.7143 b,c
12	0.1 + 1	9	1.5714 b,c
14	1 + 1	15	4.0000 b,c
2	0.1 + 0	-	0.0000 c
3	0.5 + 0	-	0.0000 c
7	0.1 + 0.1	-	0.0000 c
11	4 + 0.1	-	0.0000 c
15	2 + 1	-	0.000 c
16	4 + 1	-	0.000 c

Values are means of five replicates for each treatment. Means with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) ♦ Los valores representan la media de cinco repeticiones para cada tratamiento. Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

with 4 μ M BA during 9 months, there were no callus or shoots. Our results indicate that using leaves as explants may be more feasible for mass production from *H. truncata*, since vegetative material such as seeds and inflorescences might not be obtained. Similarly, the use of BA as cytokinin at higher rates (2 mg L⁻¹-4 mg L⁻¹) induces shoots proliferation (Balch *et al.*, 1998; Gratton and Fray, 1999; Rosa-Carrillo *et al.*, 2012; Kordi *et al.*, 2013; Razib *et al.*, 2016; Yen-Ming *et al.*, 2019).

At the 9th week after planting, the first differentiations of shoots in the treatments was observed (Figure 4). The generation of roots in the *in vitro* culture was low; however, in the rooting of shoots in perlite, vermiculite and peat moss (1:1:3), higher rooting was obtained and with an adequate acclimatization process, 80-90% survival of the species (Figure 4F). Our research may contribute to the conservation and sustainable use of *H. truncata*, since it shows a protocol for clonal micropropagation from leaf segments, which allows producers and

formación de callos al usar los explantes obtenidos de la base foliar. Para los explantes obtenidos del ápice, el tratamiento con 1 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ generó el porcentaje de formación de callos más alto (80%) (Figura 2B). Un resultado similar se reportó para *H. maughanii*, con un porcentaje de formación de callos del 100% 16 semanas después de sembrar el segmento foliar en un medio con 1 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ (Kim *et al.* 2018). Con el medio MS 0.5X, la diferenciación de los callos fue mayor en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento, excepto en el medio testigo (sin reguladores de crecimiento) del explante con <20% de callos.

También realizamos un experimento con medio MS 0.5X+BA para la inducción de callos de *H. truncata*, y encontramos que la diferenciación de los callos iniciaba siete días después de sembrar los explantes en todos los tratamientos. Los tratamientos con 0.5 mg L⁻¹ de BA y 4 mg L⁻¹ de BA presentaron una mayor diferenciación de los callos (94% y 86%, respectivamente) (Figura 3). Zang *et al.* (2016) reportaron que el uso de BA puede generar callos compactos y granulares. Sin embargo, en nuestro experimento, los callos generados para *H. truncata* tenían un aspecto friable. A los 49 d después de sembrar los explantes bajo condiciones controladas (sin reguladores de crecimiento) obtuvimos un porcentaje bajo (<40%) de formación de callos, en comparación con los tratamientos con BA como regulador de crecimiento (Figura 3).

Los tratamientos para la inducción de callos se agruparon utilizando citoquinina BA en la séptima semana después de la siembra (49 d después de la siembra) y se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2).

Inducción de brotes

A partir de los callos friables de *H. truncata* obtenidos en los experimentos anteriores, evaluamos, durante 140 d la inducción de brotes en un medio basal de MS 0.5X con 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹ de BA, y 0.1 y 1 mg L⁻¹ de NAA. Veinte semanas después del cultivo con el tratamiento de 4 mg L⁻¹ de BA, 15.7140% de los callos de *H. truncata* desarrolló 110 brotes (Tabla 3). Richwine *et al.* (1995) utilizaron explantes de flores y obtuvieron yemas ocho semanas después de sembrar “Haworthias” y Aloe;

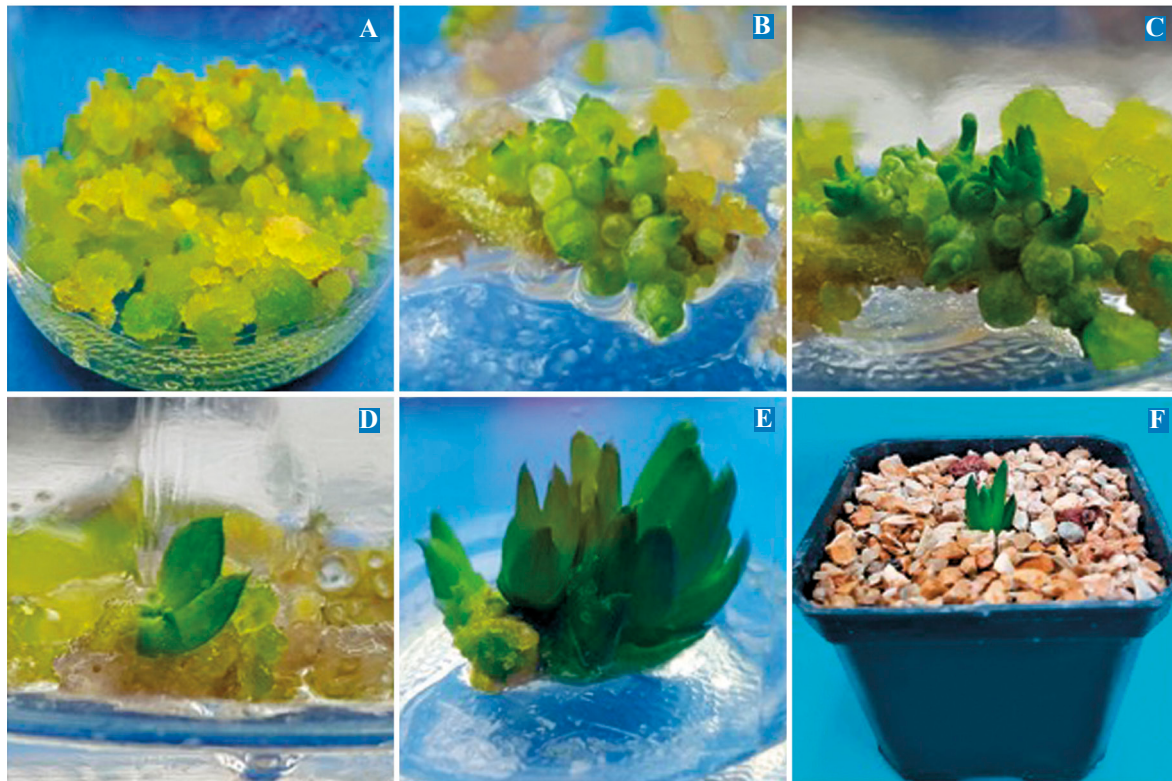


Figure 4. Stages of differentiation of *Haworthia truncata* with 4 mg L^{-1} BA. A) Friable callus of the species *H. truncata* at seven days after sowing; B) development of shoots at 42 d after sowing; C) buds with an approximate size of 2 mm at 70 d; D) intense green shoots with leaves approximately 4 mm in size; E) shoots of *H. truncata* developed *in vitro* culture; F) *H. truncata* planted in substrate (perlite, vermiculite, and peat moss).

Figure 4. Etapas de diferenciación de *Haworthia truncata* con 4 mg L^{-1} de BA. A) Callos friables de la especie *H. truncata* siete días después de la siembra; B) desarrollo de brotes 42 días después de la siembra; C) yemas con un tamaño aproximado de 2 mm a los 70 días; D) brotes color verde oscuro con hojas de aproximadamente 4 mm; E) brotes de *H. truncata* desarrollados en cultivos *in vitro*; F) *H. truncata* en sustrato (perlita, vermiculita y musgo de turba).

researchers to exploit the potential that this succulent plant offer.

A culture medium for one species could not be adequate for another, since each responds differently (Martínez-Vázquez and Rubluo, 1989; Infante, 1992; Balch *et al.*, 1998). Therefore, the study of *Haworthia* species must have a micropropagation protocol established for each of the species. The growth regulators were used in previous experiment with good results by induction of callus and shoots, and they are inexpensive growth regulators as compared to others.

sin embargo, en un experimento *in vitro* con brotes en un medio con $4 \mu\text{M}$ de BA durante nueve meses, no observaron callos ni brotes. Nuestros resultados indican que los explantes obtenidos a partir de hojas pueden ser más factibles para la producción en masa de *H. truncata*, ya que es posible que no se obtenga material vegetativo como semillas e inflorescencias.

De manera similar, el uso de concentraciones más altas de BA como citoquinina (2 mg L^{-1} - 4 mg L^{-1}) induce la proliferación de brotes (Balch *et al.*, 1998; Gratton y Fray, 1999; Rosa-Carrillo *et al.*, 2012; Kordi *et al.*, 2013; Razib *et al.*, 2016; Yen-Ming *et al.*, 2019).

CONCLUSION

An effective disinfection protocol for the *in vitro* propagation of *Haworthia truncata* was established. The culture medium for the induction of morphogenic callus in the *in vitro* culture of *H. truncata* should contain 1 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ and 2 mg L⁻¹ NAA+1 mg L⁻¹ TDZ growth regulators, plus base leaf in MS salts at 0.5X or 1X, to accelerate the differentiation process. The use of the cytokinin 4 mg L⁻¹ BA for this succulent species can be useful for shoot induction. With an adequate acclimatization of the species *H. truncata* can reach up to 90% survival. We have described a protocol for propagation by means of organogenesis using leaves of *H. truncata*.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the international cooperative research of Rural Development Administration (RDA) from Republic of Korea, Project No. PJ012429012016. Authors also thank Cactus & Succulent Research Institute. Hernández-Vázquez was awarded with the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología fellowship (930646).

LITERATURE CITED

- Balch, E. P. M., M. E. P. Reyes, E. V. Amador, E. M. Rangel, L. R. Ruiz, and H. J. L. Viramontes. 1998. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 131-135.
- Cabahug, R. A. M., S. Y. Nam, K. B. Lim, J. K. Jeon, and Y. J. Hwang. 2018. Propagation techniques for ornamental succulents. *Flower Res. J.* 26: 90-101.
- Gratton J., and F. M. Fay. 1999. *In vitro* propagation of succulent plants. In: R. D. Hall (ed). *Plant Cell Culture Protocols*. Vol III. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp: 135-140.
- Infante, R. 1992. *In vitro* axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocractus coccineus* (Salm-Dyck). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 31: 155-159.
- Jessy, N. S., R. Begum, M. Khatun, and S. S. Alam. 2005. Differential fluorescent chromosome banding of four species in *Haworthia* Duval (Aloaceae). *Cytologia* 70: 435-440.
- Jiang, B. O., Y. G. Yang, Y. M. Guo, Z. C. Guo, and Y. Z. Chen. 2005. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot organogenesis of the medicinal plant *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 677-681.
- Kaul, K., and P. S. Sabharwal. 1972. Morphogenetic studies on *Haworthia*: Establishment of tissue culture and control of differentiation. *Amer. J. Bot.* 59: 377-385.
- Kim, Y. H., H. H. Kim, G. Y. Lee, J. H. Lee, J. H. Jung, P. Delgado-Sánchez, and S. D. Lee. 2018. Effect of growth

Nueve semanas después de la siembra se observaron las primeras diferenciaciones de los brotes en los tratamientos evaluados (Figura 4). La formación de raíces en el cultivo *in vitro* fue baja; sin embargo, se observó un mayor enraizamiento de los brotes en perlita, vermiculita y musgo de turba (1:1:3) y con un proceso de aclimatización adecuado, 80-90% de supervivencia de la especie (Figura 4F). Nuestra investigación puede contribuir a la conservación y al uso sustentable de *H. truncata*, ya que presentamos un protocolo para la micropropagación clonal a partir de segmentos foliares, lo que permite a los productores e investigadores explotar el potencial que ofrece esta planta suculenta.

Un medio de cultivo para una especie podría no ser adecuado para otra, ya que cada una responde de forma diferente (Martínez-Vázquez y Rubluo, 1989; Infante, 1992; Balch *et al.*, 1998). Por lo que, el estudio de especies de *Haworthia* debe tener un protocolo de micropropagación establecido para cada una de las especies. Los reguladores de crecimiento se han utilizado en experimentos anteriores con buenos resultados para la inducción de callos y brotes, y son reguladores de crecimiento económicos en comparación con otros.

CONCLUSIONES

Un protocolo de desinfección eficaz se estableció para la propagación *in vitro* de *Haworthia truncata*. El medio de cultivo para la inducción de callos morfogénicos *in vitro* a partir de explantes de hoja de *H. truncata* debería contener 1 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ y 2 mg L⁻¹ de NAA+1 mg L⁻¹ de TDZ, más un suplemento con sales de MS 0.5X o 1X para acelerar el proceso de diferenciación. Para esta suculenta, el uso de 4 mg L⁻¹ de la citoquinina BA puede ser útil para la inducción de brotes. Con la aclimatización adecuada de plantas *in vitro* de *H. truncata*, se puede alcanzar una supervivencia de hasta 90%. Hemos descrito un protocolo para la propagación de *H. truncata* mediante la organogénesis a partir de segmentos foliares.

—End of the English version—



- regulators on *in vitro* mass propagation of *Haworthia maughanii*. J. Plant. Biotechnol. 45: 369-374.
- Kordi, M., B. Kaviani, and D. Hashemabadi. 2013. *In vitro* propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* using BA and NAA. Euro. J. Exp. Bio. 3: 285-288.
- Lee, D. V. 2010. Succulents Container Gardens. Design Eye-Catching Displays with 350 Easy-Care Plants. Portland. London. Timber Press, Inc. 248 p.
- Liu, B., H. Z. Fang, C. R. Meng, M. Chen, Q. D. Chai, K. Zhang, and S. J. Liu. 2017. Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant *Haworthia turgida* Haw. J. Hortic. Sci. 52: 1278-1282.
- Liu, B., Y. Zhang, K. Zhang, H. Fang, X. Zhang, and R. Fu. X. Qiu, and R. Xu. 2016. The efficient tissue culture system of *Orostachys fimbriata*. Agric. Sci. 7: 175-180.
- Martínez-Vázquez, O., and A. Rubluo. 1989. *In vitro* mass propagation of the near extinct *Mammillaria San-angelensis*. J. Hortic. Sci. 61: 99-105.
- Mok, M. C., D.W.S Mok, D. J. Armstrong, K. Shudo, Y. Isogai, and T. Okamoto. 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1, 2, 3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochemistry. 21: 1509-1511.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Murthy, B. N. S., S. Murch, and P. K. Saxena. 1995. TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*). Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. Physiol Plant. 94: 268-276.
- Mycok, D. J., M. P. Watt, K. F. Hannweg, K. Naicker, M. Makwarela, and P. Berjak. 1997. Somatic embryogenesis of two indigenous South African *Haworthia* spp. (*H. linnifolia* and *H. koelmaniorum*). Afr. J. Bot. 63: 345-350.
- Nuzhyna, N. V., and M. M. Gaydarzhy. 2015. Comparative characteristics of anatomical and morphological adaptations of plants of two subgenera *Haworthia* Duval to arid environmental conditions. Acta Agrobot. 68: 23-31.
- OVATA. 2017. Market Research Succulents. *OVATA pure succulents*. 18 p.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. S. Santos-Díaz, R. Ramírez-Malagón, and N. Ochoa-Alejo. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. Sci. Agric. 72: 540-561.
- Razib, M. A., A. N. K. Mamun, M. H. Kabir, S. M. S. Al Din, M. E. Hossain, and M. F. Alam. 2016. High frequency *in vitro* propagation of *Aloe vera* L. through shoot tip culture. Int. J. Appl. Biol. Pharm. 7: 28-32.
- Richwine, A. M., J. L. Tipton, and G. A. Thompson. 1995. Establishment of *Aloe*, *Gasteria*, and *Haworthia* shoot cultures from inflorescence explants. Hortscience 30: 1443-1444.
- Rosa-Carrillo, M. L., M. S. Domínguez-Rosales, M. E., Pérez-Reyes, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbiniacarpus*. Interciencia 37: 114-120.
- Scoot, C. 1985. The Genus *Haworthia* (Liliaceae): A Taxonomic Revision. Johannesburg: Aloe Books. South Africa. 150 p.
- Singh, C. K, S. R. Raj, P. S. Jaiswal, V. R. Patil, B. S. Punwar, J. C. Chavda, and N. Subhash. 2016. Effect of plant growth regulators on *in vitro* plant regeneration of sandalwood (*Santalum album* L.) via organogenesis. Agroforestry Syst. 90: 281-288.
- Skaliký, V., M. Kubeš, R. Napier, and O. Novák. 2018. Auxins and cytokinins - the role of subcellular organization on homeostasis. Int. J. Mol. 19: 3115-3136.
- Solis, J. J., M. Reyna, M. Fera, M. A. Cardona, and D. Rojas. 2013. *In vitro* propagation of *Echeveria elegans*, a species of the flora endangered Mexican. J. Environ. Eng. Sci. B2: 555-558.
- Soto, G. M., M. L. Robert, M. E. T. Hernández, A. Gutiérrez, and M. Esqueda. 2019. Organogénesis de rizoma de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) por combinación de auxinas y citocininas. Agrociencia. 53: 549-561.
- Starling, R. J., and J. H. Dodds. 1983. Tissue-culture propagation of cacti and other succulents. Bradleya 1: 84-90.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/> (Accessed: January 2019).
- Wiersema, J. H., and B. León. 2013. World Economic Plants: A Standard Reference, Second Edition. CRC Press. 1336 p.
- Yen-Ming, C., H. Jian-Zhi, H. Ting-Wen, and P. I-Chun. 2019. Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. Bot. Stud. 60: 10-17.
- Youssef, H. H., M. A. Hamza, M. Fayed, E. F. Mourad, M. Y. Saleh, M. S. Sarhan, R. M. Suker, A. A. Eltahlawy, R. A. Nemr, M. El-Tahan, S. Ruppel, and N. A. Hegazi. 2016. Plant-based culture media: Efficiently support culturing rhizobacteria and correctly mirror their *in-situ* diversity. J. Adv. Res. 7: 305-316.
- Zang, Q., L. Zhou, F. Zhuge, H. Yang, X. Wang, and X. Lin. 2016. Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. SpringerPlus. 5: 1799.