

Revista Electrónica Nova Scientia

Regeneración de *Sedum praealtum* A.DC
(siempreviva) vía organogénesis
Regeneration of *Sedum praealtum* A.DC
(siempreviva) via organogenesis

**Francisco Miguel Bravo-Ávila, Araceli Rodríguez-Sahagún,
Osvaldo. A. Castellanos-Hernández y Domingo Ruvalcaba-
Ruiz**

Departamento de Ciencias Médicas y de la Vida, Centro Universitario de la
Ciénega. Universidad de Guadalajara. Ocotlán, Jalisco.

México

*Domingo Ruvalcaba Ruiz. Av. Universidad, Núm. 1115, Col. Lindavista, Ocotlán, Jalisco México. C.P. 47820. Tel.
(392) 92 55 94 00. E-mail: druvalcaba@cuci.udg.mx*

Resumen

La siempreviva (*Sedum praealtum* A.DC) pertenece a la familia *Crassulaceae*, desde hace mucho tiempo ha sido utilizada en la etnobotánica mexicana como un agente anti-inflamatorio y analgésico, en el tratamiento de dolor de dientes, amigdalitis, para enfermedades de los ojos, erupciones cutáneas y de regeneración de tejidos, recientemente se le descubrieron compuestos con actividad antioxidante que presentan efectos hepatoprotector y anticancerígeno.

Se estableció un protocolo eficiente de regeneración mediante organogénesis para *Sedum praealtum* a partir de hojas jóvenes de plantas provenientes de vivero. Fragmentos de hoja que contenían la parte media se cultivaron en medio Murashige y Skoog adicionado con bencilaminopurina (6-BAP) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en varias combinaciones. A los 90 días de haber iniciado el cultivo, el tratamiento suplementado con 0.5 mg/L de 6-BAP, 0.0 mg/L de 2,4-D mostró efectos significativos sobre el desarrollo de órganos por la vía indirecta, dando en promedio 13.0 ± 0.3 brotes por explante. Los brotes se individualizaron y se transfirieron a medio MS suplementado con 2.0 mg/L de ácido indolacético (AIA) para su enraizamiento.

Palabras clave: *in vitro*; organogénesis indirecta; regeneración; siempreviva

Recepción: 04-01-2016

Aceptación: 15-07-2016

Abstract

Siempreviva (*Sedum praealtum* A. DC) belongs to the Crassulaceae family, it has long been used in Mexican ethnobotanical as an anti-inflammatory and analgesic agent in the treatment of toothache, tonsillitis, for eyes diseases, skin and tissue regeneration eruption, was recently discovered antioxidant compounds having hepatoprotective and anticancer effects.

An efficient protocol for organogenesis regeneration was established for *Sedum praealtum* from young leaves of nursery plants. Leaf segment that contained the middle portion of the leaf were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with different combinations of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). 90 days after culture, the highest shoot induction was observed on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 6-BAP and 0.0 mg/L 2,4-D with 13.0 ± 0.3 shoot per explant. Shoot were individualized and transferred to MS medium supplemented with 2.0 mg/L Indoleacetic acid (IAA) for rooting.

Keywords: *in vitro*, indirect organogenesis, regeneration, siempreviva



Introducción

La familia *Crassulaceae* es reconocida por tener una gran variedad de géneros y especies, las cuales son buscadas, colectadas y propagadas por su belleza con fines ornamentales. México es considerado como una zona de origen de muchas especies pertenecientes a esta familia. La siempreviva (*Sedum praealtum* A.DC) pertenece a la familia *Crassulaceae*, es frecuente en huertos familiares por su empleo como ornato y medicinal (Estrada-Salas *et al.*, 2008). *Sedum praealtum* se está convirtiendo en una de las especies más importantes del género, por los muchos beneficios que se le están descubriendo en el ámbito clínico y ambiental. Monroy-Colín *et al.*, (2011), propusieron a la siempreviva como una de las especies ideales en la instalación de jardines en las azoteas de edificios y casas - habitación por su rápido crecimiento y porque captura gran cantidad de dióxido de carbono.

Esta planta se ha utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional como un agente anti-inflamatorio y analgésico, en el tratamiento de dolor de dientes, amigdalitis, para enfermedades de los ojos, erupciones cutáneas y de regeneración de tejidos, así como anticonceptivo (Meléndez-Camargo *et al.*, 2002; Waizel-Bucay *et al.*, 2011; Estrada-Salas *et al.*, 2008), en gotas se utilizan contra afecciones oculares como carnosidad, cataratas, enrojecimiento y nube en ojos e inflamación dolor de oídos, también se utiliza el macerado de la planta para fuegos bucales, se toma en té para dolores de estomago (Pérez-García, 2009), desarrollo de espermicidas (Silva-Torres *et al.*, 2003), hepatoprotector, además presenta efectos anticancerígenos (Meléndez-Camargo *et al.*, 2002).

En varias especies del género *Sedum* se han encontrado compuestos como; cadaverina, nicotina, sarmentosina, sedamina, taninos, flavonoides, peletierina, ácido ursólico, daucosterol, apigenina, apigetrín, entre otros (Waizel-Bucay *et al.*, 2011; Bensouici *et al.*, 2015). Xu *et al.*, (2015) trabajando con *S. aizoon*, encontraron cuatro nuevos compuestos flavonoides, así como compuestos y derivados fenólicos que no habían sido aislados dentro del género,

En una investigación para el análisis de extractos crudos de las flores de *Sedum praealtum* se encontró que el kaempferol y quercetina son los principales responsables de la actividad antioxidante de esta especie (Beltrán-Orozco *et al.*, 2013). Estos autores concluyeron que la actividad antioxidante de flores frescas de *Sedum praealtum* se encuentra en el rango de la mayoría de frutas y verduras. Marquez-Rosales *et al.*, (2012) con el propósito de determinar la actividad terapéutica de la siempreviva, establecieron una correlación altamente significativa

entre la concentración de cinco fracciones orgánicas de compuestos polifenólicos de extractos de hojas y su capacidad para neutralizar radicales.

Aunque se han encontrado muchas propiedades terapéuticas, pocos estudios se han realizado para la micropropagación de especies del género *Sedum*. Wojciechowicz (2007) analizó el potencial de regeneración de diferentes explantes de yemas florales (pétalos, estambres y pistilos) en *Sedum acre*, *S. aizoon*, *S. floriferum*, *S. grácil*, y *S. spectabile*. En el 2002, Kitamura *et al.*, trabajando con tallo y hoja de *Sedum drymarioides*, lograron propagar esta especie por la vía de organogénesis indirecta. Su-Juan *et al.*, (2009) por la misma vía establecieron un protocolo de propagación de *Sedum alfredii* y utilizando hojas como explantes. Yang *et al.*, en el 2012 lograron propagar *S. spectabile* Boreau cultivando la parte basal de las hojas. En la micropropagación del género *Sedum*, poco se ha utilizado la auxina 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), en los trabajos antes mencionados, han usado principalmente las auxinas ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) ó ácido indolacético (AIA) en combinación con la citocinina bencilaminopurina (6-BAP) y en algunos casos con tiazurón (TDZ), se logró inducir la formación de callo, para después generar brotes (Yang *et al.*, 2012; Huan y Sivanessan, 2016). En el cultivo de tejidos entre los principales usos de las auxinas es la desdiferenciación del tejido para la formación de callo, la aplicación de auxinas potentes como el 2,4-D, en muchas especies vegetales puede inducir además, la embriogénesis somática (Machakova *et al.*, 2008).

Las plantas medicinales y los metabolitos que de ellas se obtienen, son una fuente importante de nuevas alternativas para combatir diversos padecimientos sin el abuso de sustancias químicas de origen sintético, ejemplo de ello es la siempreviva, por lo que se realizó este trabajo con el objetivo de desarrollar un protocolo de establecimiento analizar el efecto de los reguladores de crecimiento 6-BAP y 2,4-D en la propagación *in vitro* de la siempreviva (*Sedum praealtum*).

Método

Material Vegetal

En la presente investigación se utilizaron plantas procedentes de viveros ubicados en La Barca, Jalisco, de donde se obtuvieron las hojas más jóvenes con un tamaño de entre 1.0 - 1.5 cm que fueron usadas como explantes. Las hojas fueron lavadas con agua corriente y jabón, posteriormente y bajo la campana de flujo laminar, los explantes fueron sometidos a un pretratamiento con etanol al 70% durante 2 minutos, seguido de inmersión en una solución de

hipoclorito de sodio al 25% de producto comercial (Cloralex®) al cual se le agregaron 3 gotas de Tween 20, durante 25 minutos, seguido de tres enjuagues con agua bidestilada estéril para remover los restos del hipoclorito de sodio.

Regeneración

A las hojas se les eliminó la parte basal y superior y fueron cultivadas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 6-BAP a concentraciones entre 0.0 y 2.0 mg/L y 2,4-D a concentraciones entre 0.0 y 2.0 mg/L, vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 30 g/L de sacarosa y solidificado con 8 g/L de agar. Se realizó un diseño bifactorial completamente al azar, se realizaron un total de 25 tratamientos (Tabla 1), cada tratamiento consistió de 6 repeticiones teniendo en cada repetición 3 explantes para dar un total de 18 unidades experimentales por tratamiento.

Todos los tratamientos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 20 minutos a 1.5 atms de presión. Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas en una cámara de incubación, con luz blanca, un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad y una temperatura promedio de 26 ± 2 °C.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y al método de comparación múltiple de medias Tukey HSD. Se utilizó el software para análisis estadístico Past3. El objetivo de estas pruebas fue detectar la significancia del modelo y las diferencias entre las medias de los tratamientos (Compton, 1994).

Inducción de raíz y adaptación ex vitro

Los brotes formados fueron transferidos a medio de cultivo MS adicionado con AIA (2.0 mg/L) para la inducción de raíz. Para el establecimiento *ex vitro* se utilizaron vasos de poliestireno los cuales se rellenaron con sustrato previamente esterilizado formado con 40% arena amarilla, 50% tierra roja y 10% humus de lombriz. Se escogieron plántulas con suficiente raíz y con una longitud mínima de 3 cm, las plántulas fueron extraídas del medio de enraizamiento y lavadas con agua corriente para eliminar los restos de agar, en cada recipiente se colocó una plántula y se le agregaron aproximadamente 1.5 mL de carbendazim (fungicida) y 1.25 g/L del enraizador Raux (nitrógeno 7%, fosforo 37%, potasio 14%, ácidos fulbicos 3%, aminoácidos 3%, algas

marinas 2%, ANA 2600 ppm y AIB 2400 ppm) este último con el fin de fortalecer el desarrollo de raíces. Los recipientes fueron cubiertos con una bolsa de plástico transparente, al cabo de 7 días, con unas tijeras se les cortó uno de los extremos, a los 15 días el otro extremo de la bolsa, esto con el propósito de permitir poco a poco la adaptación de las plántulas con el medio exterior, a los 22 días, las bolsas fueron removidas completamente y las plantas fueron colocadas bajo una malla-sombra al 70%.

Resultados

El procedimiento utilizado para la esterilización de la superficie de los explantes de *S. Praealtum* fue eficiente al utilizar 25% de hipoclorito de sodio (Cloralex®) por 25 minutos, se presentaron algunas contaminaciones por hongos en algunas réplicas de los tratamientos, debido posiblemente al trabajo manual, estas no fueron determinantes para poder realizar análisis estadístico de los resultados. A pesar de la concentración utilizada y el largo tiempo de exposición, los explantes mantuvieron su viabilidad y no se presentó necrosis durante su establecimiento y desarrollo *in vitro*.

El número de brotes por explante se analizó mediante ANOVA resultando el factor 6-BAP como significativo mientras que la adición de 2,4-D no fue significativa, aunado a ese resultado se encontró la no significancia de la interacción entre ambos reguladores de crecimiento. En la Tabla 1 se muestra el análisis de comparación múltiple de medias de los tratamientos, se detectó que el mayor rendimiento de brotes fue obtenido cuando se utilizó la concentración de 0.5 mg/L de 6-BAP en ausencia de 2,4-D, en tanto, las demás concentraciones produjeron un menor rendimiento.

Tabla 1. Efecto del 6-BAP y del 2,4-D en la inducción de indirecta de brotes de *S. praealtum*.
Comparación múltiple de medias. Prueba Tukey.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Observaciones	Media No de brotes	
	6-BAP	2,4-D			
1	0.0	0.0	6	0.0	c
2	0.0	0.1	6	6.6667	b
3	0.0	1.0	6	0.3333	c
4	0.0	1.5	6	0.3333	c
5	0.0	2.0	6	0.0	c
6	0.5	0.0	6	13.0	a
7	0.5	0.1	6	0.0	c
8	0.5	1.0	6	0.0	c

9	0.5	1.5	6	0.0	c
10	0.5	2.0	6	0.0	c
11	1.0	0.0	6	9.3333	a
12	1.0	0.1	6	0.0	c
13	1.0	1.0	6	0.0	c
14	1.0	1.5	6	0.0	c
15	1.0	2.0	6	0.0	c
16	1.5	0.0	6	0.0	c
17	1.5	0.1	6	0.6667	c
18	1.5	1.0	6	1.6667	c
19	1.5	1.5	6	1.0	c
20	1.5	2.0	6	0.6667	c
21	2.0	0.0	6	0.0	c
22	2.0	0.1	6	0.0	c
23	2.0	1.0	6	1.0	c
24	2.0	1.5	6	0.0	c
25	2.0	2.0	6	1.3333	c

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. $\alpha = 0.05$

Los resultados se agruparon de tal manera que los mejores tratamientos para la producción de brotes fueron aquellos con concentraciones bajas de 6-BAP y siempre en ausencia de 2,4-D, mientras que concentraciones altas de ésta citocinina reduce significativamente la producción de brotes, esto puede deberse a la producción endógena de auxinas (Figura 1).

Después de 30 días de cultivo la mayoría de los explantes comenzaron a formar callo principalmente en los extremos que estaban en contacto con el medio, el callo presentó color blanco y poco compacto en aquellos tratamientos donde se logró la inducción de brotes.

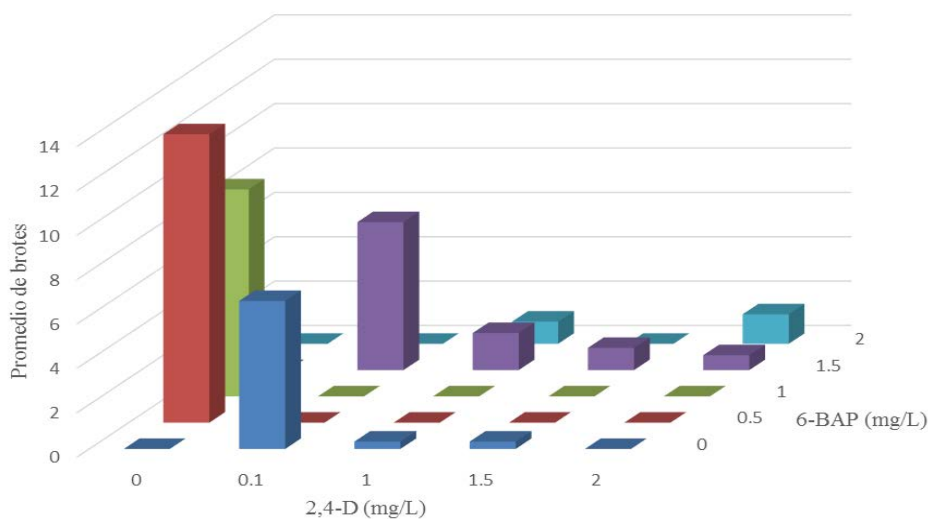


Figura1. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes de *S. praealtum*

A los 60 días de cultivo, se observaron callos compactos nodulares crecidos en los tratamientos con 6-BAP, los cuales comenzaron a tornarse de color café y de estos surgieron estructuras globulares verdes (Figura 2a), después de 90 días de iniciado el cultivo concluyeron su desarrollo en brotes verdes bien diferenciados presentando hasta 4 entrenudos (Figura 2c). Los callos formados en presencia de 2,4-D en el medio de cultivo, fueron de color blanco y compactos y en su mayoría no desarrollaron brotes, algunos de los tratamientos que contenían 2,4-D, solo o en combinación con BAP, se indujo la generación de brotes, (Tabla 1), este hecho posiblemente debido al efecto del genotipo de los explantes utilizados (Machakova *et al.*, 2008).

Los tratamientos con 0.5 mg/L de 6-BAP, 0.0 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de 6-BAP, 0.0 mg/L de 2,4-D produjeron un mayor número de brotes. Los brotes obtenidos del primer tratamiento presentaron una mayor longitud promedio y mayor número de hojas por brote (Figura 2c).

El procedimiento de individualización y cambio de las plántulas a medio de cultivo fresco conteniendo AIA (2.0 mg/L) se realizó mediante la transferencia de los brotes formados que habían alcanzado un tamaño promedio de 3 cm y desarrollado de 3 a 4 entrenudos, debido a que los brotes formados presentaban conexión con el sistema vascular (Figura 2b), fue necesario la disección para lograr la individualización de los brotes.

El AIA favoreció la inducción y crecimiento de raíces después de 25 días de cultivo en un 85% de las plántulas, las cuales se desarrollaron alrededor de su base con promedio de 4 a 6 raíces por brote, con un crecimiento de hasta 3.0 cm, presentando un color crema. Cabe mencionar que el medio circundante se oscureció debido posiblemente a la liberación de fenoles por parte de las plántulas, este hecho no afectó su desarrollo.

El sustrato utilizado (Raux; enriquecido con nutrientes inorgánicos, orgánicos y auxinas) logró soportar el desarrollo de las plántulas *ex vitro*, se obtuvo una supervivencia del 70% en invernadero, debido posiblemente a factores como la deshidratación. Las plántulas sobrevivientes se desarrollaron con firmeza y vigor (Figura 2d).

Discusión y Conclusión

Sedum praealtum es un importante género de la familia Crassulaceae, la cual forma parte del grupo de las Dicotiledóneas, esta especie en los últimos años ha tomado relevancia en el campo de la medicina por los metabolitos secundarios que produce. La regeneración de brotes adventicios y morfogénesis *in vitro* de *S. praealtum* obtenida del cultivo de hojas como explantes

en medio MS, utilizando varias concentraciones de 6-BAP en combinación con 2,4-D. En este trabajo los brotes formados en los tratamientos con bajas concentraciones de 0.0, 0.5 y 1.0 mg/L 6-BAP y 0.0 mg/L de 2,4-D se desarrollaron por organogénesis indirecta, no hubo desprendimiento de los brotes y no se observaron los estadios de desarrollo globular, corazón y torpedo para la obtención de embriones somáticos (Figura 2a y 2b), característica de las especies dicotiledóneas (Gutierrez-Mora *et al.*, 2012).

Los tratamientos con mayor número de brotes no contenían 2,4-D, resultados similares fueron obtenidos por López-Díaz *et al.*, (2009), en el cual demostraron la formación de un mayor número de brotes en el tratamiento con 2.0 mg/L de 6-BAP y 0.0 mg/L de 2,4-D utilizando como planta experimental *Kalanchoe daigremontiana*.

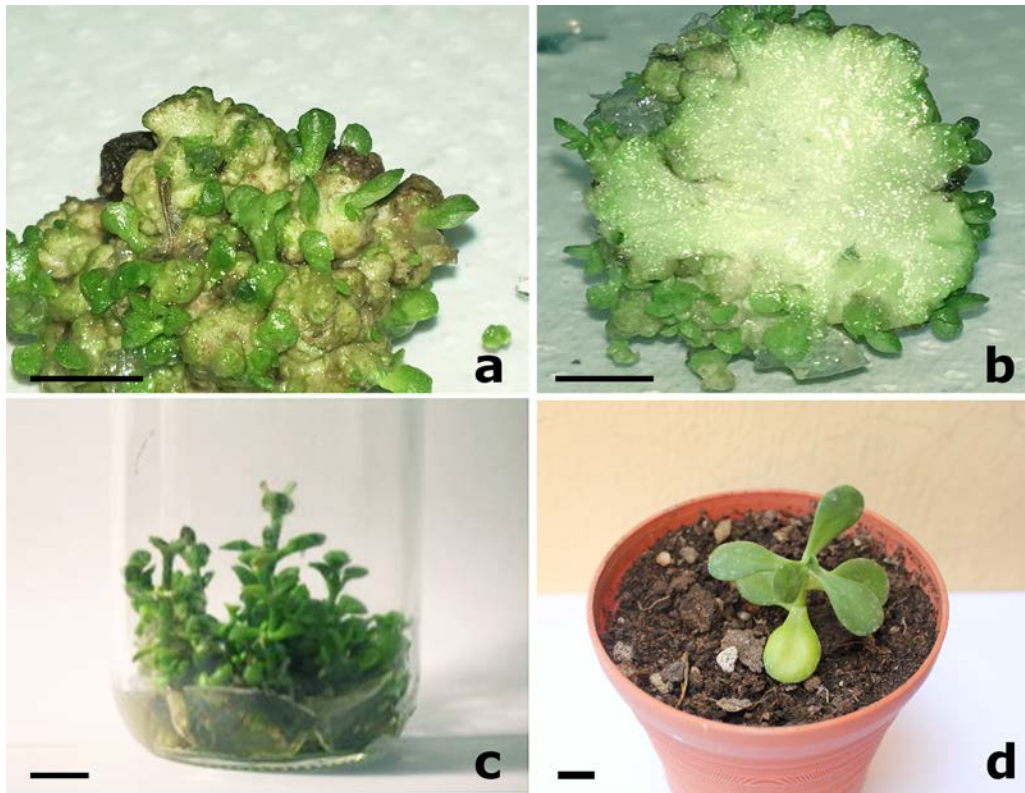


Figura 2. Propagación *in vitro* de la siempreviva (*Sedum praealtum* A.DC) vía organogénesis indirecta; a) desarrollo de callo nodular y diferenciación de los brotes a los 60 días de cultivo; b) corte transversal de callo nodular mostrando el origen morfogénico de los brotes; c) brotes formados por organogénesis indirecta obtenidos con 0.5 mg/L de 6-BAP y 0.0 mg/L de 2,4-D después de 90 días de cultivo; d) adaptación *ex vitro*. Barra = 1 cm.

Los tratamientos con altas concentraciones de 2,4-D y 6-BAP solos o en combinación, presentaron poco desarrollo de callo y bajo desarrollo de brotes (Tabla 1), lo cual confirma lo encontrado por Su-Juan *et al.* (2009), trabajando con *Sedum alfredi* determinaron que adicionando 2,4-D al medio de cultivo inhibe el desarrollo y crecimiento de brotes. Este hecho posiblemente sea debido a que el género *Sedum*, produzca *in vitro* cantidades relativamente altas tanto de auxina como de citocininas endógenas. Si bien es cierto que las auxinas fuertes como el 2,4 -D, pueden presentar un efecto inhibitorio por la acumulación de productos secundarios, ya sea por una influencia directa en actividades enzimáticas o en el proceso de la transcripción, también es cierto que un balance adecuado de su concentración con las citocininas en el medio de cultivo, puede ser capaz de inducir la formación de embriones somáticos por la vía directa o indirecta (Machakova *et al.*, 2008).

La vía de propagación más utilizada en la mayoría de las crasuláceas es la inducción de brotes por la vía indirecta o directa (Wojciechowicz, 2007; Ahmed y Taha, 2014; Kumari, 2016; Liu *et al.*, 2016). La producción de callo en *Sedum spectabile* fue reportada usando MS suplementado con 2.0 mg/L de 6-BAP y 1.0 mg/L de ANA, utilizando hojas como explantes (Zhang y Cheng, 2007). Se reportó más tarde la inducción de embriones somáticos de la misma especie *Sedum spectabile* estudiando el tipo de explante y concentración de reguladores de crecimiento, se encontró que la mayor regeneración fue en fragmentos centrales de hoja, siendo los fragmentos distales los que presentaron menor regeneración, el mayor número de embriones fue con MS suplementado con bajas concentraciones de auxinas y citocininas (Yang *et al.*, 2012). La embriogénesis somática ha sido obtenida en pocas especies crasuláceas, en 2007, Song y Park aplicando 5 mg/L de 2,4-D en combinación con 0.5 mg/L de 6-BAP lograron la inducción de callo embriogénico y posterior maduración de embriones somáticos en *Orostachys japonicus*, utilizando como explante tallo. Ahmed *et al.*, (2014), indujeron la formación de embriones somáticos mediante el cultivo *in vitro* de *Crassula ovata* siendo el mejor tratamiento 0.5 mg/L 2,4-D solo o en combinación con 1.0 mg/L de 6-BAP induciendo la formación de callo embriogénico en explantes provenientes del tallo, que aquellos provenientes de hoja. En el 2007 Cordeiro *et al.*, reportaron que los efectos de la interacción de los diferentes reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) varían de acuerdo al regulador utilizado, tipo de explante y a las características propias del genotipo de la especie vegetal propagada y pueden actuar de manera sinérgica o no, en el fenómeno de desdiferenciación, por lo que cada interacción debe ser

usada y probada para cada genotipo con el propósito de determinar la concentración exacta durante el proceso de establecimiento y propagación (Machakova *et al.*, 2008).

El efecto del 2,4-D y 6-BAP sobre la micropropagación de la siempreviva (*Sedum praealtum* A. DC) fue analizado, encontrando que bajas concentraciones de 6-BAP (0.5 y 1.0 mg/L) pueden inducir la formación de callo y desarrollo de brotes por vía organogénesis indirecta utilizando como explante hojas. En tanto que el 2,4-D en las concentraciones usadas en este trabajo, los explantes desarrollaron callo compacto con poca capacidad morfogénica.

Referencias

Ahmed, A. B. A., D. I. Amar, y R.M. Taha. (2014). Indirect Regeneration and Somatic Embryogenesis from Leaf and Stem Explants of *Crassula ovata* (Mill.) Druce—An Ornamental Medicinal Plant. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 8(12): 1266-1269.

Andrade-Cetto, A. y M. Heinrich. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology (99): 325–348.

Beltrán-Orozco M. del C., J. J. Ocampo Rascó, F. Díaz Cedillo y R. Silva Torres. (2013). Chemical composition and antioxidant ability of the crude extract of *Sedum praealtum* flowers. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional Emirates Journal of Food and Agriculture 25(10): 778-784.

Bensouici, C., A. Kabouche, A. Karioti, M. Öztürk, M. E. Duru, A. R. Bilia, y Z. Kabouche. (2015). Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. Pharmaceutical biology (ahead-of-print) 1-6.

Compton, M.E. (1994). Stastical methods suitable for the analysis of plants tissue culture data. Plant Cell Tissue and Organ Culture (37): 217-242.

Cordeiro, I.M.C.C., O.A. Lameira, S. T. Ohashi y L. R. S. Reis. (2007). Indução de calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). Plant Cell Culture and Micropropagation (3): 35-40.

Estrada-Salas, P. A., Galván-Valencia y V. M. Flores-Morales. (2008). Siempreviva: un espermicida natural y avances de su caracterización fitoquímica. Investigación Científica 1-9.

Gutiérrez-Mora, A., A. G. González-Gutiérrez, A. Ascencio-Cabral, B. Rodríguez-Garay y L. Li-Wei. (2012). Plant somatic embryogenesis: some useful considerations. En Embryogenesis, compilado por Ken-ichi, Sato, 229-248. INTECH. Croatia.

Hwan, D. K., y I. Sivanessian. (2016). Influence of Benzyladenine and Thidiazuron on Shoot Regeneration from Leaf and Shoot tip Explants of *Sedum sarmentosum* Bunge. *Biological and Applied Sciences* (59): 1-6.

Kitamura, Y., K. Kubo, L. Rahaman y T. Ikenaga. (2002). Reproduction of *Sedum drymarioides* an endangered rare species by micropropagation. *Plant biotechnology* 19(5): 303-309.

Kumari, A., P. Baskaran y J. Van Staden. (2016). *In vitro* propagation and antibacterial activity in *Cotyledon orbiculata*: a valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 124(1): 97-104.

Liu, B., Y. Zhang, K. Zhang, H. Fang, X. Zhang, R. Fu, X. Qiu y R. Xu. (2016). The Efficient Tissue Culture System of *Orostachys fimbriata*. *Agricultural Sciences* (7): 175-180.

López-Díaz, D. E., A. R. Jiménez-Aparicio, J. C. Orbe-Rogel, P. E. Vanegas-Espinoza, M. Bonfill-Baldrich, A. A. Del Villar-Martínez. (2009). Establecimiento de cultivo *in vitro* y de células desdiferenciadas de aranto (*Kalanchoe daigremontiana*). Ponencia presentada en el Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.

Machakova, I., E. Zazimalova y E.F. George. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. En George, E.F., M. A. Hall, G. De Klerk (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer Netherlands 175-204.

Márquez-Rosales, J.C., M. Galván-Valencia, S. M. Durón-Torres y V. Flores-Morales. (2012). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de extractos de siempreviva. *Investigación Científica* 6(2): 2-7.

Meléndez-Camargo, M. E., M. Buendía-Romero, D. Ramos-Zamora, P. Cardona- Carrillo y M. E. Villarreal-Maldonado. (2002). Study of the Anti- Inflammatory Effect of *Sedum praealtum* (Siempreviva) in the Rat: Dose- Dependent Response. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (45): 129-130.

Monroy-Colín A., J. Reyes-Santiago y M. Collazo-Ortega. (2011). Las azoteas verdes y su papel en el mejoramiento del ambiente urbano. Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias; Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM.

Murashige, T. y F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bio- assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* (15): 473-497.

Pérez-García, V. (2009). Plantas medicinales de uso en traspatio en la zona centro del estado de Veracruz, México. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana.

Phillips, G. C. y G. B. Collins. (1979). *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science* (19): 59-64.

Silva-Torres, R., H. Montellano-Rosales, D. Ramos-Zamoram, M. E. Castro-Mussot, C. M. Cerda-García-Rojas, C. M. (2003). Spermicidal activity of the crude ethanol extract of *Sedum praealtum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* (85): 15–17.

Song, M. J. y Y. G. Park. (2007). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Stem Tissues of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Journal of Plant Biotechnology* 34(3): 181-187.

Su-Juan Z., Z. Zhong-Chun, G. Xiana, T. Gulsum y Q. Bao-Sheng. (2009). Plant regeneration of the mining ecotype *Sedum alfredii* and *Cadmium hyperaccumulation* in regenerated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (99): 9-16.

Waizel-Bucay, J., y I. M. Martínez-Rico. (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista ADM* 58(2): 73-88.

Wojciechowicz, M. K. (2007). Comparison of regenerative potential of petals, stamens and pistils of five *Sedum species in vitro*. *Biodiversity Research and Conservation* 87-94.

Xu, T., Z. Wang, T. Lei, C. Lv, J. Jing Wang y J. Lu. (2015). New flavonoid glycosides from *Sedum aizoon* L. *Fitoterapia* (101): 125–132

Yang C., Y. Qin, X. Sun, S. Yuan y H. Lin. (2012). Propagation of *Sedum spectabile* Boreau in leaf culture *in vitro*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. (40): 107-112.

Zhang X. Y. y Y. Q. Cheng. (2007). Tissue culture and rapid propagation of *Sedum spectabile* Boreau. *Jilin Normal University Journal (Natural Science Edition)* (2): 60-62.

