

OPTIMIZACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE JOJOBA CON LA APLICACIÓN DEL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL ROTABLE E INOCULACIÓN CON RIZOBACTERIAS

Diana Andressen¹, Irene Manoochchri¹, Susana Carletti², Berta Llorente²,
Melángel Tacoronte¹ y María Vielma¹

RESUMEN

Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) es una planta cuyas semillas producen un aceite de alto valor comercial usado en cosmetología y como lubricante. Con el objetivo de optimizar su proliferación *in vitro* se realizaron experimentos utilizando el diseño estadístico compuesto central rotatable (CCR) y se evaluó el efecto de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento. Segmentos nodales de vástagos *in vitro* fueron cultivados en medio básico de Murashige y Skoog con diferentes relaciones de sacarosa (S) y 6-benciladenina (BA) calculadas mediante el CCR. De acuerdo a la superficie de respuesta se obtuvo que el número óptimo de brotes desarrollados en vástagos fue de 5,68 y correspondieron a una relación S/BA de 22,3/1,16. La biotización con 5×10^6 ufc·brote⁻¹ de *Azotobacter chroococcum* incrementó significativamente el número de vástagos generados por brote o tasa de multiplicación (TM). En presencia de 0,5 y 1 mg·L⁻¹ de BA se obtuvieron incrementos del 46 y 28 %, respectivamente. La inoculación con *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* no mostró aumentos significativos en la TM.

Palabras clave adicionales: Micropropagación, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, biotización

ABSTRACT

Optimization of the *in vitro* proliferation of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schn.) by using rotatable central composite design and inoculation with rhizobacteria

Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schn.) is a plant which seeds produce oil of high commercial value used in cosmetology and as lubricant. Experiments were conducted using the rotatable central composite design (RCCD) in order to get the optimum of its proliferation *in vitro* and to evaluate the effect of the plant growth-promoting rhizobacteria PGPR. Nodal segments were cultivated in Murashige & Skoog basal medium with different relations of sucrose (S) and 6-benziladenin (BA), calculated by the RCCD. According to the response surface graph, it was obtained that the optimum number of buds developed as shoots was 5.68, corresponding to 22.3/1.6 S/BA relationship. The biotization with 5×10^6 cfu·bud⁻¹ of *Azotobacter chroococcum* increased significantly the number of shoots generated per bud (rate of multiplication). In presence of 0.5 and 1 mg·L⁻¹ of BA, increments of 46 and 28 % were obtained, respectively. The inoculation with *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* did not show any significant increase in the rate of multiplication.

Additional key words: Micropropagation, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, biotization

INTRODUCCIÓN

Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schn.) es un arbusto dioico oriundo del desierto de Sonora (México y Estados Unidos) que pertenece a la familia Buxaceae (Mabberley, 1987). Dado su resistencia a estreses abióticos, se considera un cultivo alternativo de zonas áridas a semiáridas del mundo (Roussos et al., 1999). Sus frutos

contienen una cera líquida formada por una mezcla de ésteres de ácidos grasos muy resistentes a la degradación bacteriana y estable a altas temperaturas. Esta cera es ampliamente utilizada en la industria de cosmética (Ayerza, 1992). Actualmente se están desarrollando tecnologías para obtener un lubricante no contaminante a partir de las ceras derivadas de estos frutos. Dicha materia prima también resultaría útil para la

Recibido: Febrero 18, 2008

Aceptado: Diciembre 12, 2008

¹ Laboratorio de Cultivos *in vitro*, Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias. Mérida, Venezuela. e-mail: diana_an@hotmail.com; mvielma1@ula.ve

² Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, Departamento Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján (Bs. As.) Argentina. e-mail: susanacarletti@hotmail.com ; llorente@mail.unlu.edu.ar

fabricación de lacas, pinturas y termoplásticos especiales entre otros (Bouaid et al., 2007).

Las plantas obtenidas de semillas presentan variabilidad genética y dado que la jojoba es dioica, su sexo y productividad sólo se puede evaluar al momento de la floración (5-6 años). En general, las plantaciones homogéneas obtenidas por propagación asexual producen semillas a los 3 años (Purcell y Purcell, 1988, Alcaráz y Ayla-Rocha, 1992, Mills et al., 1997). Dado que la propagación vegetativa por estacas produce el raleo de las plantaciones (Ayerza, 1992; Benzioni, 1995), la micropropagación constituye una metodología promisorio para la producción masiva de clones selectos, libres de patógenos e independiente de las condiciones ambientales (Mills et al., 1997; Merkle y Dean, 2000).

Varios autores han desarrollado la micropropagación de jojoba variando las condiciones ambientales, químicas y biológicas de los cultivos (Llorente y Apóstolo, 1998; Roussos et al., 1999; Tyagi y Prakash, 2004). Con el objetivo de incrementar la cantidad de vástagos generados por brote se han utilizado preferentemente las citocininas 6-bencilaminopurina y cinetina, pero los resultados de esos experimentos no han sido completamente satisfactorios por lo que es necesario aumentar la eficiencia de los protocolos, de manera de incrementar la tasa de multiplicación de la jojoba.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) permite modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por diversas variables. Emplea técnicas estadístico-matemáticas para analizar al mismo tiempo varios factores y niveles, generando modelos polinómicos de bajo orden que establecen las relaciones funcionales entre los factores bajo estudio. Permite reemplazar los experimentos factoriales en los que se aumenta significativamente el número de tratamientos y el error experimental y además, se optimiza la respuesta, según los principios establecidos por Box y Wilson (1951). Ha sido utilizada ventajosamente en el diseño de tratamientos químicos, industriales y en algunos tópicos biológicos (Chacín, 1998; Mora, 2000).

El diseño estadístico compuesto central rotatable (CCR) es una MSR que en los estudios de cultivo *in vitro*, permite evaluar concentraciones de

sustancias que puedan modificar el crecimiento y desarrollo de diferentes órganos y analizar sus respuestas (Ascanio et al., 1996; Mora, 2000; Bustamante et al., 2006). Con su aplicación en el cultivo *in vitro* es posible maximizar la respuesta (formación de brotes, embriones somáticos, callos) y minimizar la aplicación de tratamientos hormonales. En caoba fue utilizada para optimizar respuestas de desarrollo de brotes axilares (Tacoronte et al., 2004) y en melón para optimizar su efecto en la regeneración de primordios de vástago y formación de callo (Valecillos, 1999).

Por otro lado, algunas rizobacterias ejercen efectos benéficos sobre las plantas cultivadas *in vitro* (Carletti et al., 1998; Nowak, 1998; Llorente et al., 2003). Estas rizobacterias, conocidas como PGPR, favorecen el crecimiento vegetal a través de varios mecanismos tales como síntesis de fitohormonas y fijación del nitrógeno atmosférico (Abbass y Okon, 1993; Okon y Vanderleyden, 1997). La inoculación de las plantas *in vitro* con PGPR se denomina biotización (Nowak, 1998) y puede protegerlas contra el estrés del cultivo *in vitro* además de estimular su crecimiento (Nowak y Shulaev, 2003; Vestberg et al., 2004). En asociación con brotes de orégano (*Origanum vulgare*) y frambuesa (*Rubus sp.*) cultivados *in vitro*, las *Pseudomonas* spp. previnieron la vitrificación de los tejidos y mejoraron la eficiencia de la propagación (Shetty et al., 1996; Ueno et al., 1998). Otra PGPR, clasificada como *Burkholderia* sp., es capaz de establecer poblaciones endofíticas y epifíticas, permitiendo la multiplicación clonal de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) por segmentos nodales (Frommel et al., 1991). También se ha demostrado el efecto favorable de *Azospirillum brasilense* en el enraizamiento *in vitro* de jojoba (Carletti et al., 1998) y de fotinia (Larraburu et al., 2007).

Con el objeto de establecer las concentraciones óptimas de sacarosa y BA en la multiplicación *in vitro* de *S. chinensis*, se procedió a ajustar el diseño CCR evaluando el número y tamaño de los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales cultivados en diferentes relaciones de concentraciones. Por otro lado, se estudió el efecto de la inoculación de los tejidos vegetales con las PGPR *A. brasilense* Cd, *A. lipoferum* Sp59b y *Azotobacter chroococcum* 42 en la proliferación *in*

in vitro incorporando métodos biotecnológicos para optimizar esta etapa de la micropropagación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Los cultivos se iniciaron utilizando segmentos uninodales de 1 cm de largo obtenidos de vástagos cultivados *in vitro* provenientes de plantas madres del cv. Hermosillo.

En los ensayos del efecto de la concentración de BA y sacarosa se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS). Para estudiar el efecto de las rizobacterias se utilizó el mismo medio básico (MS) suplementado con la concentración óptima de sacarosa obtenida por el modelo estadístico CCR ($22,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y concentraciones de BA inferiores a la óptima (0, 0,5 y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esto debido a que uno de los objetivos del trabajo fue sustituir las hormonas exógenas por las producidas por las rizobacterias, por lo que sólo se realizaron ensayos estadísticamente valorados con concentraciones menores de citocinina que la que demostró ser óptima con el CCR (es decir, menores a $1,610 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Lo anterior está sustentado en ensayos preliminares exploratorios ($n = 5$) en donde se determinó que la inoculación en medios con altas concentraciones de citocininas producían alteraciones en el crecimiento de los brotes micropropagados de jojoba y en la bibliografía que indica la producción de citocininas por las PGPR. El pH de los medios se ajustó a 5,6 y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Los cultivos fueron incubados en cámara a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ con 16 h de luz provista por tubos fluorescentes con $57 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa.

Efecto de la sacarosa y BA

Los segmentos uninodales fueron cultivados en tubos con 15 mL de medio MS y diferentes relaciones de sacarosa y BA, calculadas usando el diseño estadístico CCR (Cuadro 1). El rango de concentraciones de BA varió entre 0 y $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y el de sacarosa entre 0 y $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los medios sin sacarosa o BA se utilizaron como controles. Se realizaron 10 repeticiones de cada tratamiento. A los 60 días, se evaluó la longitud de los brotes y la tasa de multiplicación (TM) definida como el número de brotes obtenidos a partir de cada brote

inicial. Se utilizó el programa Statgraphic 5.1 para estimar los valores máximos de TM a partir de una gráfica de superficie de respuesta.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las rizobacterias empleadas en los experimentos fueron *A. brasilense* Cd (ATCC 29710), *A. lipoferum* Sp59b (ATCC 29707) y *A. chroococcum* 42 (aislamiento local). Los inóculos bacterianos fueron crecidos en Erlenmeyer (250 ml) con 150 ml de medio de cultivo, utilizando para *A. brasilense* y *A. lipoferum* el medio de Okon et al. (1977) y para *A. chroococcum* el de Brown et al. (1962). Las cepas fueron incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ en agitador orbital a 140 rpm durante 48 horas. El número de las células viables fue evaluado por dilución y conteo en placa con cada medio específico suplementado con $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar. La cepa Cd de *A. brasilense* usada en los experimentos fue provista por el Dr Yaacov Okon (Faculty of Agriculture, The Hebrew University, Jerusalem, Israel), el *A. lipoferum* sp 59b por el Instituto de Tecnología Agropecuaria y el *A. chroococcum* 42 por la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Inoculación con rizobacterias

Se utilizaron microestacas con uno o dos nudos que fueron cultivadas individualmente *in vitro*. La biotización se realizó inoculando la suspensión bacteriana en la base de cada microestaca. Con la finalidad de evaluar la influencia de la concentración bacteriana sobre la multiplicación de los brotes, se emplearon 10, 50 y $100 \mu\text{L}$ brote $^{-1}$ de una suspensión bacteriana de 10^8 ufc mL^{-1} (1×10^6 , 5×10^6 , $1 \times 10^7 \text{ ufc brote}^{-1}$). Estas concentraciones fueron elegidas teniendo en cuenta el trabajo de Fallik et al. (1988) sobre la acción de *Azospirillum* en cultivos de forrajes y gramíneas. Los controles se trataron con igual cantidad de buffer fosfato potásico pH 7, estéril. Se evaluó la TM y la formación de callo en la base de los brotes a los 60 días. Los experimentos se planificaron con un diseño estadístico completamente aleatorizado. Se utilizaron 10 brotes por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. La exploración estadística de los resultados para TM se realizó mediante análisis de varianza y prueba de Tukey utilizando el programa SPSS 12.0 (Chicago, Illinois).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los segmentos uninodales de jojoba cultivados con diferentes relaciones de sacarosa y BA calculadas por CCR produjeron diferencias en el número de brotes axilares desarrollados en vástagos, indicando que cada relación posee características específicas para la inducción, como lo observó Valecillos (1999) al aplicar el CCR en la propagación de melón. Ambas sustancias son necesarias para la proliferación y alargamiento de brotes axilares de jojoba; en su ausencia ambos procesos se ven afectados como se observa en los tratamientos 6 y 8 con TM igual a 1,4 y 1,2 respectivamente (Cuadro 1). La TM varió entre 1,2 y 7,0. El tratamiento 2 (sacarosa 25,6 g·L⁻¹ y BA 0,366 mg·L⁻¹) produjo el mayor número de brotes por segmento uninodal (7 brotes) y el

tratamiento 4 (sacarosa 25,6 g·L⁻¹ y BA 2,134 mg·L⁻¹) originó 5,6 brotes. Los controles (tratamientos 6 y 8) produjeron el menor número de brotes del experimento (Cuadro 1).

Dado que el número de brotes formados por segmento nodal de jojoba, presentó una gran desigualdad de varianzas entre los tratamientos fue necesario transformar los datos mediante la función logaritmo. El modelo ajustado se correspondió con una superficie de respuesta de segundo grado, en el que tanto los efectos principales como cuadráticos fueron significativos ($P \leq 0,05$) (Cuadro 2). Este modelo permitió explicar el 38,99 % de la varianza total observada en el número de brotes desarrollados en segmentos nodales de jojoba. No se detectó interacción entre los tratamientos concentración de sacarosa y de BA.

Cuadro 1. Efecto de diferentes combinaciones de sacarosa y BA en el número y tamaño promedio de los brotes desarrollados en los segmentos uninodales de jojoba

Tratamiento	Sacarosa (g·L ⁻¹)	BA (mg·L ⁻¹)	Número de brotes (TM)	Longitud de brote (cm)
1	4,4	0,366	3,4	2,5
2	25,6	0,366	7,0	6,5
3	4,4	2,134	2,4	2,8
4	25,6	2,134	5,6	6,0
5	30,0	1,250	3,9	4,2
6	0,0	1,250	1,4	1,83
7	15,0	2,500	5,2	3,0
8	15,0	0,000	1,2	1,16
9	15,0	1,250	5,3	7,0
10	15,0	1,250	5,1	1,16

Cuadro 2. Probabilidad estadística para el logaritmo del número de brotes desarrollados en segmentos nodales de *S. chinensis*

Fuente de variación	Cuadrado Medio	F	P
Sacarosa (S)	11,0784	31,83	0,000
Benciladenina (B)	2,5058	7,20	0,009
SS	3,3466	9,62	0,003
BB	2,1547	6,19	0,015

Se generó la ecuación de regresión:

$\ln(\text{brotes}) = -0,183 + 0,107 [S] + 0,895 [BA] - 0,0024 [S]^2 - 0,2779 [BA]^2$
la cual permitió trazar un gráfico de superficie de respuesta (Figura 1) a partir del cual se obtuvo una respuesta óptima de 5,68 brotes, es decir, el número máximo de yemas de jojoba en segmentos nodales que se debería alcanzar con una concentración de sacarosa de 22,29 g·L⁻¹ y a 1,61 mg·L⁻¹ de BA. Este valor óptimo es casi igual al promedio de 5,6 brotes obtenidos con

la relación de sacarosa de 25,6 g·L⁻¹ y 2,134 mg·L⁻¹ de BA (Cuadro 1), indicando que al mantener una concentración de sacarosa relativamente alta y disminuir en un 25 % la concentración de BA, el efecto sería casi el mismo.

La longitud promedio de los brotes desarrollados varió entre 1,16 y 7 cm, en los diferentes tratamientos; la ausencia de sacarosa o de BA afectó su alargamiento. La mayor talla

se obtuvo en los tratamientos 9, 4 y 2 (Cuadro 1; Figura 2). Las observaciones cualitativas del vigor de los brotes mostraron que los del tratamiento 9 eran muy etiolados, resultando menos vigorosos que los obtenidos en los tratamientos 4 y 2. Los brotes de estos tratamientos resultaron aptos para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales y la micropropagación.

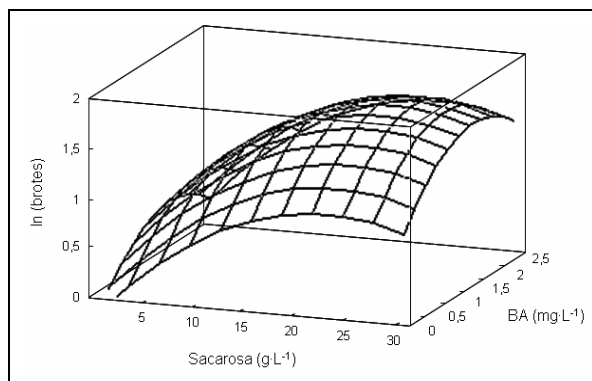


Figura 1. Superficie de respuesta del número de brotes desarrollados a partir de segmentos nodales de *Simmondsia chinensis*

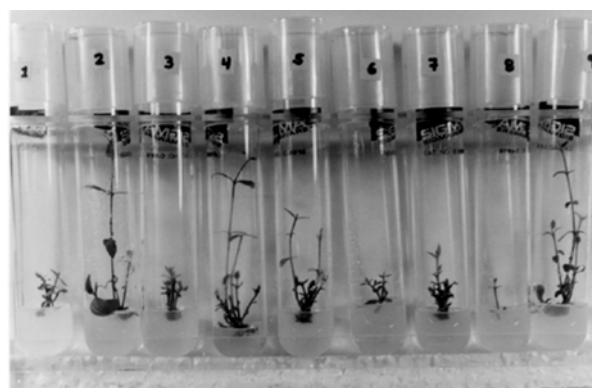


Figura 2. Efecto de diferentes relaciones de sacarosa/BA en el desarrollo, tamaño y vigor de brotes axilares obtenidos a partir de segmentos uninodales. El número indica el tratamiento según Cuadro 1

Además de la acción de las diferentes relaciones sacarosa/BA, la gran variabilidad tanto en la TM como en el alargamiento de los brotes puede ser explicada en función de la competencia celular y estado fisiológico de los nudos utilizados. Aunque los explantes eran uninodales y cercanos al ápice fueron tomados entre el tercero y cuarto nudo del vástago obtenido *in vitro*.

En concordancia con estos resultados, la aplicación del modelo CCR le permitió a Valecillos (1999) demostrar que la formación de brotes en cotiledón de melón aumentaba con concentraciones crecientes de BA (entre 0 y 2 mg·L⁻¹) con un óptimo en 1,33mg L⁻¹. Por otro lado, Bustamante et al. (2006) aplicando el CCR en el cultivo *in vitro* de *Musa* sp. variedad Hartón (AAB), obtuvieron las concentraciones óptimas de BA, entre otros factores, que permitieron el control de la oxidación y la formación de brotes.

Efecto de rizobacterias

Con respecto al control sin inocular, la biotización con 5×10^6 ufc brote⁻¹ de *A. chroococcum* produjo incrementos significativos ($P \leq 0,05$) en la tasa de multiplicación en los medios con 0,5 y 1 mg L⁻¹ de BA (44 % y 29 %, respectivamente) (Cuadro 3). Por otro lado y si bien en el medio de cultivo sin hormonas, la inoculación con esta concentración de *A. chroococcum* produjo un 7 % de incremento en la tasa de multiplicación, el mismo resultó no significativo. La biotización con *A. brasilense* y *A. lipoferum* no produjo aumentos significativos en la TM, observándose en algunos casos disminuciones en este parámetro (Cuadro 3). La mayor brotación de yemas axilares en la multiplicación *in vitro* de jojoba podría deberse a que el *Azotobacter* produce citocininas como sustancia promotora del crecimiento vegetal (Abbass y Okon, 1993). La producción microbiana de sustancias hormonales del tipo de las citocininas podría suplementar el contenido endógeno de los brotes micropropagados de jojoba promoviendo el crecimiento y estimulando la proliferación de yemas axilares.

Se ha reportado que BA induce múltiples brotes durante la propagación *in vitro* de jojoba pero presenta el inconveniente de incrementar la formación de callo basal. Esto impide la adecuada conexión vascular tallo-raíz y limita la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatización (Llorente y Apóstolo, 1998; Apóstolo y Llorente, 2000; Tyagi y Prakash, 2004). Los brotes de los tratamientos inoculados con las tres cepas bacterianas no presentaron callo independientemente de la concentración de BA utilizada, mientras que los controles mostraron dichas masas de tejido indiferenciado en la base. Este resultado

coincide con lo señalado por Carletti et al. (1998) en el sentido de que inóculos de *A.*

brasiliense inhiben la formación de callo durante el enraizamiento *in vitro* de jojoba.

Cuadro 3. Efecto de PGPRs sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de jojoba (número de nuevos brotes formados por explante) luego de 60 días de cultivo

	ufc·brote ⁻¹	BA (mg·L ⁻¹)		
		0	0,5	1
Control sin inocular	0	1,3 a	2,7 c	4,7 b
<i>Azospirillum brasiliense</i> Cd	1 x 10 ⁶	1,0 a	1,2 a	5,1 bc
	5 x 10 ⁶	1,0 a	1,5 a	2,8 a
	1 x 10 ⁷	1,0 a	1,7 abc	2,6 a
<i>Azospirillum lipoferum</i> Sp 59b	1 x 10 ⁶	1,0 a	1,6 a	5,3 bc
	5 x 10 ⁶	1,0 a	1,2 a	5,9 bc
	1 x 10 ⁷	1,0 a	1,1 a	3,5 a
<i>Azotobacter chroococcum</i> 42	1 x 10 ⁶	1,0 a	2,5 bc	5,2 bc
	5 x 10 ⁶	1,4 a	3,9 d	6,1 c
	1 x 10 ⁷	1,5 a	2,8 cd	5,0 bc

Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

CONCLUSIONES

La aplicación del modelo estadístico CCR y la superficie de respuesta obtenida permitieron determinar las concentraciones óptimas de sacarosa y BA aplicadas simultáneamente al medio de cultivo durante la multiplicación *in vitro* de brotes de jojoba. Se obtuvo que para obtener una alta tasa de multiplicación se debería explorar un ámbito de relaciones de concentraciones en rangos desde 22,3 hasta 25,6 g·L⁻¹ para sacarosa y 0,366 a 2,134 mg·L⁻¹ para BA.

La biotización con *A. chroococcum* aumentó la producción de brotes y la posibilidad de sobrevivencia por la ausencia de callo basal. Esta técnica biotecnológica puede permitir el reemplazo parcial del uso de reguladores del crecimiento sintéticos en el cultivo *in vitro* de la jojoba.

AGRADECIMIENTO

Trabajo financiado por CDCHT-ULA, Venezuela (Proyecto C-1171-02-01-B) y el Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Argentina.

LITERATURA CITADA

1. Abbass, Z. y J. Okon. 1993. Physiological

properties of *Azotobacter paspali* in culture and the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 25: 1061- 1073.

2. Alcaráz, M.L. y B. Ayla-Rocha. 1992. Asexual reproduction of jojoba by layering. HortScience 7: 983- 898.

3. Apóstolo, N.M. y B. E. Llorente. 2000. Anatomy of normal and hyperhidric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 36: 243-249.

4. Ascanio, M, F. Chacin y W.Machado. 1996. Comparisson between the orthoghonal central composite designs (OCCD) and the rotatable central composite design (RCCD) in experiments with vegetable tissue culture. Bulletin International Biometric Society 13: 2.

5. Ayerza, R. 1992. El cultivo de jojoba. Revista Oleaginosas Abril: 38-41.

6. Benzioni, A. 1995. Jojoba domestication and commercialization in Israel. Hort. Rev. 17: 234-266.

7. Bouaid, A, L. Bajo, M. Martinez y J. Aracil. 2007. Optimization of Biodiesel Production from Jojoba Oil. Process Safety and

- Environmental Protection 85: 378-382
8. Box, G.E.P. y K. G. Wilson. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. Journal of the Royal Statistical Society 13: 1-45.
 9. Brown, M.E, S., K. Burlingham y R. M. Jackson. 1962. Studies on *Azotobacter* species in soil. 1: Comparison of media and techniques for counting *Azotobacter* in soil. Plant Soil 17: 309-313.
 10. Bustamante, R., M. Vielma y A. Mora. 2006. Aplicación del Diseño Compuesto Central Rotable en el Establecimiento *In Vitro* de Ápices de Plátano *Musa* sp. variedad Harton (AAB) Agroalimentación y Desarrollo Sustentable 10: 01-07
 11. Carletti, S., B. Llorente, E. Rodríguez-Cáceres y J. Tandecarz. 1998. Jojoba inoculation with *Azospirillum brasilense* stimulates *in vitro* root formation. Plant Tissue Cult. Biotech. 4: 165-174
 12. Chacín, L. 1998. Análisis de regresión y superficies de respuesta. UCV. Facultad de Agronomía, Maracay, Venezuela. 274 p.
 13. Fallik, E, Y. Okon y M. Fischer. 1988. Growth response of maize to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. Soil Biology y Biochemistry. 20: 45-49.
 14. Frommel, M., J. Nowak y G. Lazarovits. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. Plant Physiol 96:928-936
 15. Larraburu, E., S. Carletti, E., Rodríguez Cáceres y B. Llorente. 2007. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. Plant Cell Reports: 26: 711-717
 16. Llorente, B. y N. M. Apóstolo. 1998. Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* propagation of jojoba. New Zealand J. Crop y Hort. Sci. 26(1): 55-62.
 17. Llorente, B., S. Carletti y E. Rodríguez-Cáceres. 2003. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la micropropagación de plantas. In: Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación argentina. Ed. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
 18. Mabberley DJ. 1987. The Plant Book. Department of Plant. University of Oxford. Cambridge. University press.
 19. Merkle, S. A. y J. F. Dean. 2000. Forest tree biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11:298-302.
 20. Mills, D., S. Wenkart y A. Benzioni. 1997. Micropropagation of *Simmondsia chinensis* (jojoba). In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 40: high-tech and micropropagation. Springer-Verlag, Berlin, pp. 370-393
 21. Mora, A. 2000. Diseños de Tratamientos Aplicados a Ensayos de Propagación *in vitro* con Cultivos de Tejidos Vegetales. In: Vielma, M.T. Cultivos de Tejidos Vegetales. Manual de Laboratorio. Universidad de Los Andes, Departamento de Biología. Mérida. 95-105.
 22. Nowak, J. 1998. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 34: 122-130
 23. Nowak, J. y J. Shulaev. 2003. Priming for transplant stress resistance *in vitro* propagation. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 39: 107-124.
 24. Okon, Y. y J. Vanderleyden. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News 63:366-370
 25. Okon, Y., S. L. Albrecht y R. H. Burris. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl Environ Microbiol 33:85-88

26. Purcell, H.C. y H. C. Purcell II. 1988. Jojoba crop improvement through genetics. J. Am. Oil 65 (1):1-13.
27. Roussos, P.A., A. Tolia-Marioli, C. A. Pontikis y D. Kotsias. 1999. Rapid multiplication of jojoba seedlings by *in vitro* culture. Plant Cell Tiss. Org. 57: 133-137.
28. Shetty, K., T.L. Carpenter, O.F. Curtis y T.L. Potter. 1996. Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp. Plant Sci. 120:175-183.
29. Tacoronte, M., M. Vielma, A. Mora y C. Valecillos. 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King a partir de yemas axilares. Acta Científica Venezolana 55: 7-12
30. Tyagi, R.K. y S. Prakash. 2004. Genotype and sex-specific protocols for *in vitro* micropropagation and medium-term conservation of jojoba. Biol. Plantarum 48(1): 19-23.
31. Ueno, K, S. Cheplick y K. Shetty. 1998. Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano. Process Biochemistry 33: 441-445.
32. Valecillos, C. 1999. Factores que afectan la regeneración *in vitro* de *Cucumis melo* L. variedad Edisto. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. 83 p.
33. Vestberg, M., S. Kukkonen, K. Saari, P. Parikka, J. Huttunen, L. Tainio, N. Devos, F. Weekers, C. Kevers, P. Thonart, M. C.Lemoine, C. Cordier, C. Alabouvette y S. Gianinazzi. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. Appl. Soil Ecol. 27: 243-258.