CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

MICROPROPAGACIÓN Y BIOTIZACIÓN DE JOJOBA (*Simmondsia chinensis* L. [Schneider]) MEDIANTE BACTERIAS ENDÓFITAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Elvia Perez Rosales

La Paz, Baja California Sur, Febrero 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las__horas del día___ del Mes de _____del 20__, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Micropropagación y biotización de jojoba (*Simmondsia chinensis* L. [schneider]) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal"

Presentada por el alumno:

Elvia Perez Rosales

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Lilia Alcaraz-Meléndez
Co- Directora de Tesis

Dra. María Esther Puente
Co- Directora de Tesis

Dra. Tania Zenteno-Savín
Co-Tutor

Dr. Ricardo Vazquez Juarez
Co-Tutor

Dr. Enrique Morales- Bojórquez
Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Co-Directora
Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Directora
Dra. María Esther Puente
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C

Co-Tutor
Tania Zenteno-Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-Tutor
Dr. Enrique Morales- Bojórquez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

COMITÉ REVISOR

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
Dra. María Esther Puente
Tania Zenteno-Savín
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Enrique Morales- Bojórquez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
Dra. María Esther Puente
Tania Zenteno-Savín
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dr. Enrique Morales- Bojórquez

SUPLENTES

Dr. Eduardo Quiroz-Guzmán
Dr. Bernardo Murillo Amador

Resumen

Las bacterias endófitas colonizan el interior de las plantas sin causar daño alguno; influyen directamente en el crecimiento de plantas por la síntesis de hormonas vegetales o facilitando la absorción de los nutrientes. Además, disminuyen el estrés provocado por factores bióticos y abióticos al activar los sistemas de defensa de las plantas. Jojoba (*Simmondsia chinensis*) es un arbusto dióico, nativo del noroeste de México y suroeste de Estados Unidos de América. En los últimos años se ha buscado aumentar la producción de aceite de las semillas de jojoba, sin embargo, su alta variabilidad genética por la polinización cruzada y la separación de sexos, dan como resultado una alta diversidad en el contenido y producción del aceite. Por lo tanto la utilización de cultivos *in vitro*, generará plantaciones con individuos seleccionados y las proporciones deseadas de plantas femeninas y masculinas, lo cual incrementará las condiciones requeridas para la producción; además, el uso de bacterias benéficas mejorara el desarrollo de las plantas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la micropropagación de jojoba (*S. chinensis*) bajo la técnica de biotización a través de bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal en cultivos *in vitro* y en la etapa de pre-aclimatación. Para lo cual se aislaron bacterias endófitas de las raíces secundarias de plantas de poblaciones silvestres de jojoba en 27 sitios de Baja California Sur. Se aislaron un total de 101 cepas bacterianas. Todas las bacterias aisladas presentaban al menos un mecanismo, de promoción de crecimiento; se seleccionaron 8 cepas que presentaban el mayor número de mecanismos de promoción de crecimiento. Éstas fueron identificadas por secuenciación parcial del gen 16S rRNA y resultando los géneros *Bacillus* sp., *Methylobacterium aminovorans*, *Oceanobacillus kimchi*, *Rhodococcus pyridinivorans* y *Streptomyces* sp. Posteriormente, se seleccionaron las cepas *R. pyridinivorans* (JRR11) *M. aminovorans* (JRR22), las cuales presentaron las mejores características para promover el crecimiento en jojoba; se empleó como control positivo la cepa *Azospirillum brasilense* (Cd). Se inocularon plantas femeninas y masculinas de jojoba, en etapa de enraizamiento y pre-aclimatación. Los resultados en estas etapas demostraron que las bacterias endófitas promovieron el crecimiento vegetal de las plantas, aumentaron la rizogenesis, incrementaron la concentración de clorofilas y carotenoides, y estimularon la actividad enzimática, sugiriendo una respuesta sistémica inducida. También se observaron cambios morfológicos en la epidermis y el parénquima. Por lo que se concluye que las bacterias endófitas que se aislaron de las raíces de jojoba, promueven el crecimiento vegetal, mejorando los sistemas de defensa enzimática así como promoviendo cambios morfológicos que ayudan a las plantas a mitigar el estrés al ser transferidas a condiciones de pre-aclimatación.

Palabras clave: Parámetros de crecimiento, actividad enzimática, cambios morfológicos.

Vo. Bo.

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
Co-Directora de Tesis

Dra. María Esther Puente
Co-Directora de Tesis

Abstract

Endophytic bacteria colonize the interior of plants without causing any damage; they directly influence the growth of plants by synthesizing plant hormones or facilitating the absorption of nutrients. They also reduce the stress caused by biotic and abiotic factors when activating plant defense systems. Jojoba (*Simmondsia chinensis*) is a dioecious shrub, native to northwestern Mexico and southwestern United States of America. In recent years, we have sought to increase oil production of jojoba seeds; however, its high genetic variability through cross-pollination and separation of the sexes results in a high diversity in oil content and production. So the use of *in vitro* crops will generate plantations with selected individuals and the desired proportions of female and male plants, which will increase the conditions required for production; In addition the use of beneficial bacteria improves plant development. Therefore, the objective of this work was to evaluate the micropropagation of jojoba (*Simmondsia chinensis*) under the technique of bioethics through endophytic bacteria promoting plant growth in vitro cultures and in the pre-acclimatization stage. For this purpose, endophytic bacteria were isolated from secondary plant roots of wild populations of jojoba at 27 sites in Baja California Sur. Bacterial strains (N=101) were isolated. All isolated bacteria had at least one mechanism; eight strains that had the highest number of growth promotion mechanisms were selected, which were identified by partial sequencing of the 16S rDNA gene and belonged to the genera *Bacillus* sp., *Methylobacterium aminovorans*, *Oceanobacillus kimchi*, *Rhodococcus pyridinivorans* and *Streptomyces* sp. Subsequently, the strains *R. pyridinivorans* (JRR11) *M. aminovorans* (JRR22) were selected because they, showed the best characteristics to promote growth in jojoba. The strain *Azospirillum brasilense* (Cd) was used as positive control. Female and male jojoba plants were inoculated, in the rooting and pre-acclimatization stage. The results in these stages demonstrated that the endophytic bacteria promoted plant growth, increased the rhizogenesis, chlorophyll concentration and carotenoids, and stimulated enzymatic activity, suggesting an induced systemic response. Morphological changes were also observed in the epidermis and parenchyma. In conclusion, endophytic bacteria isolated from the roots of jojoba promote plant growth, improving enzymatic defense systems as well as promoting morphological changes that help plants to mitigate stress when transferred to pre-acclimatization.

Key words: Growth parameters, enzymatic activity, morphological changes.

Approval.

Dra. Lilia Alcaraz Meléndez
Co-Directora de Tesis

Dra. María Esther Puente
Co-Directora de Tesis

Dedicatoria

A Dios, por iluminar siempre mi camino y no dejarme sola en todo momento.

A mi Madre, por apoyarme en cada decisión que he tomado, y por su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado.

A mi hermana favorita Eli, por darme su apoyo y, en especial, por enseñarme que en la vida hay muchos obstáculos, pero si se quiere uno puede pasar por ellos sin problemas.

A mi hermano Alejandro, por ser una guía en mi camino, tanto profesionalmente como personalmente, además por darme la fuerza que yo necesito.

A Vanessa y Alexandra, por ser las personitas más divertidas que conozco, y ser la alegría de mi familia.

A toda mi familia, por ser un apoyo incondicional en cualquier travesía de mi vida.

Este y todos los logros que realice serán dedicados a Ustedes.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (331467) para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., por permitirme cumplir una meta más en mi vida y por ser parte de su comunidad.

A la Dirección de Posgrado a cargo de la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, por las facilidades otorgadas durante mi estancia en el CIBNOR, así como los apoyos otorgados para asistir a congresos y la solicitud de la Beca Mixta; así mismo, agradezco a Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Lic. Claudia Olachea, C. Tania Núñez, Lic. Horacio Sandoval, M. en C. Diana Dorantes, por el buen funcionamiento de este departamento, Muchas Gracias.

A la Dra. Lilia Alcaraz-Meléndez, por su confianza y apoyo al realizar esta investigación, y principalmente por haberme permitido cumplir una meta más.

A la Dra. Esther Puente, por apoyarme al realizar esta investigación, y por todas las palabras de aliento que necesité durante el doctorado.

A la Dra. Tania Zenteno-Savín, por su contribución en la elaboración de este trabajo y observaciones aportadas.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por la revisión y sugerencias en la realización de esta tesis y por sus enseñanzas.

Al Dr. Enrique Morales Bojórquez, por su asesoría en la elaboración de esta tesis y por su apoyo en todo momento.

Al Dr. Eduardo Quiróz-Guzmán, por ayudarme en la elaboración de esta investigación y por todos los consejos que me brindó al realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional de Lujan, en Argentina; y en especial al Dr. Ezequiel Larraburo, Dra. Bertha Llorente, por las facilidades otorgadas mientras realicé mi estancia de investigación. A los amigos que conocí pero en especial a Bárbara y Flor por haberme recibido.

Al Laboratorio de Diagnostico Microbiológico: M. en C. Norma A. Ochoa Álvarez, por apoyarme en la realización de mis experimentos y por sus enseñanzas. Emerson Zuňiga Mayoral por su apoyo en laboratorio.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal: M. en C. Margarito Rodríguez, Tec. Sergio Real Cosió, por todo su apoyo incondicional al realizar este trabajo, pero principalmente por su amistad. M. en C. Mario Arce Montoya, por su colaboración en la realización de esta investigación.

Al Laboratorio de Estrés Oxidativo: Ing. Orlando Lugo-Lugo y Norma O. Olguín-Monroy, por las facilidades otorgadas al realizar esta investigación.

Al Laboratorio de Histología e Histoquímica: Dra. María Del Carmen Rodríguez Jaramillo y al Tec. María Eulalia Meza Chávez, por su apoyo en el laboratorio, para la obtención de los resultados.

Al Laboratorio de Edafología: Geol. Trasviña Castro Manuel Salvador, por su apoyo en el laboratorio, para la obtención de los resultados.

A mis compañeros de posgrado: Federico, Paty, Ana, Fernando, Tere, Zuamí, Mirella, Claudia, Nidia, Edgar, Humberto.

A mis amigos que me apoyaron en todo el transcurso de este sueño: María José, Cristina, Yesica, Elizabeth, Ernesto, Gustavo, Robert, Ariadna y Moisés. Gracias por que sus palabras de apoyo desde el inicio hasta el fin, ustedes me ayudaron a que llegara este día.

A todas esas personas que conocí mientras realicé mi investigación.

Contenido

Resumen i
Abstract ii
Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Contenido vi
Lista de figuras ix
Lista de tablas xiii
Abreviaturas xiv
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
2.1 Estudio de microorganismos benéficos 3
2.2 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal (BEPCV) 4
2.2.1 Fitoestimulación 7
2.2.2 Actividad antagonista 8
2.3 Jojoba (*Simmondsia chinensis* [Link, Schneid]) 11
2.3.1 Importancia de la jojoba 12
2.3.2 Problemática de la producción de jojoba 12
2.3.3 Cultivo *in vitro* de jojoba 13
2.3.4 Proceso de aclimatación 14
2.4 Biotización 15
3. JUSTIFICACIÓN 17
4. HIPÓTESIS 18
5. OBJETIVOS 18
5.1 Objetivo general 18
5.2 Objetivos particulares 18
6. MATERIAL Y MÉTODOS 19
6.1 Sitios de muestreo 19
6.1.1 Análisis de suelo de los sitios de muestreo 20
6.2 Aislamiento de bacterias endófitas 20
6.3 Caracterización de las bacterias endófitas 21
6.3.1 Caracterización microscópica 21
6.3.2 Solubilización *in vitro* de fósforo 21
6.3.3 Fijación de nitrógeno 21
6.3.4 Determinación de ácido indol-acético mediante espectrofotómetro 22
6.3.5 Producción de sideróforos 22
6.3.6 Actividad del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa 22
6.3.7 Actividad antagonista 23
6.3.8 Identificación de las cepas 23
6.3.9 Cinéticas de crecimiento 24
6.3.10 Preparación del inóculo 24
6.4 Cultivo *in vitro* de jojoba 24
6.4.1 Multiplicación 25

6.4.2 Inducción de enraizamiento 25
6.4.3 Biotización 25
6.4.4 Pre-aclimatación 25
6.5 Análisis de plántulas en etapa de enraizamiento y Pre-aclimatación 26
6.5.1 Parámetro de crecimiento 26
6.5.2 Clorofila α, β, total y carotenoides 26
6.5.3 Actividad enzimática 26
6.5.3.1 Superoxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) 27
6.5.3.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) 27
6.5.3.3 Peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7) 27
6.5.3.4 Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) 27
6.5.3.5 Fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5) 28
6.5.4 Análisis de tejidos por microscopía óptica 28
6.6 Diseño experimental 28
6.7 Análisis estadístico 29
7. RESULTADOS 31
7.1 Caracterización de los sitios de muestreo 31
7.2 Población de endófitos 33
7.3 Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas 33
7.3.1 Solubilización de fósforo *in vitro* 37
7.3.2 Fijación de nitrógeno 37
7.3.3 Producción de AIA 38
7.3.4 Producción de sideróforos 38
7.3.5 Actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa 39
7.3.6 Actividad antagonista 39
7.4 Identificación de las cepas aisladas 40
7.5 Cinéticas de crecimiento 41
7.6 Etapa *in vitro* de jojoba 42
7.6.1 Etapa de enraizamiento 43
7.6.2 Clorofila α, β, total y carotenoides en etapa de enraizamiento 44
7.6.3 Actividad enzimática en la etapa de enraizamiento 45
7.7 Etapa de pre-aclimatación 50
7.7.1 Parámetros de crecimiento 51
7.7.2 Clorofila α, β total y carotenoides en etapa de pre-aclimatación 51
7.7.3 Actividad enzimática en la etapa de pre-aclimatación 53
7.8 Cortes histológicos de etapa *in vitro* y pre-aclimatación 57
8. DISCUSIÓN 64
8.1 Caracterización de los sitios de muestreo 64
8.2 Densidad de bacterias endófitas en los sitios de muestreo 64
8.3 Potencialidad de los aislamientos bacterianos como promotores de crecimiento en plantas 65
8.3.1 Identificación de bacterias endófitas 68
8.4 Desarrollo de explantes *in vitro* de jojoba 69
8.5 Inoculación de bacterias endófitas en etapa de enraizamiento *in vitro* de jojoba 69

8.5.1 Crecimiento y enraizamiento de jojoba 69
8.5.2 Clorofila α, β, total y carotenoides 70
8.5.3 Actividad enzimática de plantas de jojoba en etapa de enraizamiento.. 71
8.6 Inoculación de bacterias endófitas en etapa de pre-aclimatación de jojoba 74
8.6.1 Crecimiento y desarrollo de raíces en plantas de jojoba 74
8.6.2 Clorofila α, β, total y carotenoides 75
8.6.3 Actividad enzimática 76
8.7 Cortes histológicos de la etapa *in vitro* y pre-aclimatación 79
9. CONCLUSIONES 81
10. LITERATURA CITADA 82

Lista de figuras

Figura 1. Estrategias de la interacción planta-microorganismo. (1) Las primeras investigaciones se basaron en microorganismos aislados a base de cultivos. (2) Las nuevas herramientas de secuenciación a través de la detección de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos permiten caracterizar la interacción planta-microorganismo en forma independiente a cultivos. (3) El resultado de estas dos técnicas ha generado el conocimiento para comprender la interacción planta-microorganismo. (Tomado de Lebeis *et al.,* 2012). 4
Figura 2. Modelo de la interacción planta-bacteria. El suelo es capaz de influir en la composición microbiana y en la fisiología de las plantas (flecha café). Las plantas seleccionan y reclutan a los endófitos potenciales (flecha verde) a través de la raíz, por medio de la señalización bioquímica de los exudados radicales. Los endófitos potenciales cooperan y compiten por lo sitios de la raíz (flecha azul). Una vez establecidos en el interior de la raíz de las plantas, algunos endófitos pueden influir en el crecimiento de las plantas (flecha morada) (Tomado de Gaiero *et al.,* 2013). 6
Figura 3. Modelo de reducción de etileno por bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Modelo propuesto de reducción del etileno por *Methylobacterium oryzae*, que conduce a un eventual aumento en las enzimas de defensa como consecuencia de la inducción de la resistencia sistémica, contra un patógeno invasor. SAM = S-adenosil metionina, AS = ácido salicílico, ACS = aminociclopropano-1-caboxilato sintetasa, ACC = aminociclopropano-1-caboxilato, ACO = aminociclopropano-1-caboxilato oxidasa, ACCD = aminociclopropano-1-caboxilato desaminasa, a-KB = a-ketobuterano. (Tomado de Indiragandhi *et al.*, 2008). 10
Figura 4. Localización geográfica de las plantas de jojoba, sitios de muestreo ... 19
Figura 5. Población de bacterias endófitas en los sitios de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo. Barras de error ± indican desviación estándar. 33
Figura 6. Halo de solubilización producido por las cepas JRP1y JRP2. 37
Figura 7. Crecimiento de las cepas en medio semisólido libre de nitrógeno. Flechas indican la formación de una película. 38
Figura 8. Producción de ácido indol-acético, el color rosa muestra la producción de la hormona. 38
Figura 9. Halo alrededor de la colonia indica que la bacteria produce sideróforos. 39
Figura 10. Prueba de producción de ACC-desaminasa, si la bacteria crece en el medio se toma como positiva. 39

Figura 11. Confrontación de las bacterias endófitas contra el hongo *Alternaria* sp. 40
Figura 12. Filogenia de bacterias endófitas de *S. chinensis* por secuencias de 16S rRNA. Los números en los nodos indican el nivel de apoyo de arranque, con base en el análisis de vecino más cercano. La barra de escala indica 0.1 tasas de cambio. 41
Figura 13. Cinéticas de crecimiento. Cepas cultivadas en medio mínimo con 0.5% de metanol A) *M. aminovorans* (JRR22), B) *R. pyridinivorans* (JRR11)..... 42
Figura 14. Cultivos *in vitro* de jojoba en la etapa de multiplicación. n=10 plantas, letras minúsculas diferencias estadísticas significativas (*p*≤ 0.05), de altura de planta, de acuerdo a la prueba *t* de Student en altura de plantas; letras mayúsculas diferencias significativas (*p*≤ 0.05), de número de brotes, de acuerdo a la prueba de *t* de Student en número de brotes. 43
Figura 15. Datos de la concentración de clorofila α (A), clorofila β (B), clorofila total (C), carotenoides (D) en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p≤0.05). 45
Figura 16. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 46
Figura 17. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 47
Figura 18. Actividad de la enzima peroxidasa (POX) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤0.05). 48
Figura 19. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APx) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 49
Figura 20. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con

bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n = 5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 50
Figura 21. Plantas de jojoba en etapa de pre-aclimatación..... 50
Figura 22. Análisis en la concentración de clorofila α (A), clorofila β (B), clorofila total (C), carotenoides (D) en etapa de pre-aclimatación inoculados con bacterias endófitas. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 52
Figura 23. Actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 53
Figura 24. Actividad de la enzima catalasa (CAT) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤0.05). 54
Figura 25. Actividad de la enzima peroxidasa (POX) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ <0.05). Entre la inoculación de bacterias por cada órgano analizado. . 55
Figura 26. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 56
Figura 27. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (*p*≤ 0.05). 57
Figura 28. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas masculinas en etapa de enraizamiento. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). HZ haz vascular, EAD epidermis adaxial, EAB epidermis abaxial..... 60
Figura 29. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas femeninas en etapa de enraizamiento. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11,

D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). HZ haz vascular, EAD epidermis adaxial, EAB epidermis abaxial. 61
Figura 30. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas masculinas en etapa de pre-aclimatación. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). HZ haz vascular, EAD epidermis adaxial, EAB epidermis abaxial..... 62
Figura 31. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas femeninas en etapa de pre-aclimatación. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). HZ haz vascular, EAD epidermis adaxial, EAB epidermis abaxial..... 63

Lista de tablas

Tabla I. Propiedades físico-químicas del suelo de los sitios de muestreo 31
Tabla II. Análisis de textura del suelo de los sitios de muestro, de acuerdo al porcentaje de tamaño de partícula..... 32
Tabla III. Caracterización de bacterias endófitas aisladas de raíces de jojoba..... 34
Tabla IV. Identificación de 8 cepas bacterianas aisladas en raíces de jojoba. Se utilizó la secuenciación parcial de la región 16S rRNA. 40
Tabla V. Altura de brotes y raíces de plantas femeninas y masculinas de jojoba inoculadas con suspensión de bacterias en condiciones *in vitro.* 44
Tabla VI. Altura de plantas y raíces de plantas femeninas y masculinas de jojoba inoculadas con suspensión de bacterias en condiciones de pre-aclimatación..... 51
Tabla VII. Análisis morfométrico de cortes histológicos de hojas de plantas de jojoba en etapa de enraizamiento *in vitro* y pre-aclimatación: control e inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal..... 58

Abreviaturas

°C: Grados centígrados
µL: Micro litro
µm: Micras

ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato

ACCD: 1-aminociclopropano-1-carboxilato Desaminasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIA: Ácido indol-3-acético

APx: Ascorbato peroxidasa

ASB: Absorbancia

BAP: Bencil amino purina

CAT: Catalasa

cm: Centímetros

dNTP'S: desoxirribonucleótidos trifosfato

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FAA: Formaldehído-Alcohol-Ácido Acético

H_2O_2: Peróxido de hidrógeno

HNO_3: Ácido nítrico

IBA: Ácido indol-butírico

2iP: 2-Isopentenil-adenina

KN: Kinetina

m: Metros

M: Molar

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Mililitro

mM: Mili molar

mm: Milímetros

msnm: Metros sobre el nivel del mar

MSG: Murashige y Skoog con vitaminas del medio B5

nm: Nanómetros

O_2: Oxígeno

pH: Potencial de hidrógeno

PAL: Fenilalanina amonio liasa

POX: Peroxidasa

PVPP: Polivinilpirrolidona

rpm: Revoluciones por minuto

RIM: medio de inducción de enraizamiento

SO_4: Sulfato

SOD: Superóxido dismutasa

U.F.C: Unidades Formadoras de Colonias

v/v: Volumen/Volumen

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias endófitas colonizan el interior de las plantas sin causar aparentemente daño alguno (El-Deeb *et al.,* 2013; Rashid *et al.,* 2012); estableciendo una simbiosis mutualista con su hospedero, debido a que son favorecidas selectivamente (Ardanov *et al.,* 2012; Hardoim *et al.,* 2012). Estas bacterias ayudan a las plantas a través de varios mecanismos; como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato inorgánico, producción de sideróforos (Chen *et al.,* 2010; Rashid *et al.,* 2012), suministro de micronutrientes, promoción de la actividad fotosintética, fitoestimulación (Belimov *et al.,* 2005; Gaiero *et al.,* 2013) control de patógenos del suelo, producción de antibióticos, producción de metabolitos secundarios, inducción del sistema de defensa de las plantas, biotransformación de metales pesados y la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Ardanov *et al.,* 2012; El-Deeb *et al.,* 2013). De igual manera, se les han atribuido otros beneficios que favorecen el crecimiento de las plantas, como ajuste osmótico, regulación de los estomas, modificación en la morfología de las raíces y el metabolismo (Xinxian *et al.,* 2011). La inoculación de bacterias endófitas, aumenta el crecimiento de las plantas (Kumar-Pandey *et al.,* 2012), producción de metabolitos secundarios (Bafana, 2013), disminución de la incidencia de enfermedades (Ludueña *et al.,* 2012) y el incremento en la supervivencia de las plantas (Faria *et al.,* 2013).

Por otra parte, la planta de jojoba (*Simmonsdia chinensis*), nativa del noroeste de México y del suroeste de Estados Unidos, crece en un ambiente con temperaturas que oscilan desde los -5 hasta 54 °C, en suelos salinos y alcalinos (Aly *et al.,* 2008). El uso de esta planta es una alternativa para regiones áridas y semiáridas, porque su semilla tiene un alto valor agregado, ya que produce una cera liquida con diversas aplicaciones (Kumar *et al.,* 2012). En los últimos años ha disminuido la producción de semillas de esta especie; causada por la gran variabilidad genética de la jojoba, que contribuye a una alta diversidad en el

contenido y calidad del aceite, así como la producción de semillas (Aly *et al.,* 2008). Adicionalmente, el no poder distinguir el sexo a una edad temprana y el no poder establecer plantaciones en una proporción de 5 plantas femeninas: 1 planta masculina, aumenta los costos de producción (Hosseini *et al.,* 2011; Kumar *et al.,* 2012). La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa para resolver estas limitaciones; sin embargo, se presenta el desafío de la mortalidad de las plantas al ser trasplantadas a condiciones *ex vitro*.

Una alternativa para disminuir esta mortalidad es la biotización que consiste en la utilización de microorganismos benéficos (hongos o bacterias) en cultivos *in vitro* (Nowak, 1998). Esta técnica induce cambios metabólicos en las plántulas, las cuales las hace más tolerantes al estrés biótico y abiótico al momento del trasplante *ex vitro* (Chandra *et al.,* 2010) ya que se disminuye la colonización de patógenos y mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido a que se crea un microambiente donde los microorganismos y las plantas interactúan (Gianinazzi *et al.,* 2003; Gosal *et al.,* 2010). Considerando lo anterior, es importante investigar la micropropagación de jojoba (*S. chinensis*) bajo la técnica de biotización a través de bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal en cultivos *in vitro* y en etapa de aclimatación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudio de microorganismos benéficos

Los estudios sobre diversidad microbiana se han enfocado a microorganismos cercanos a las raíces de las plantas (rizósfera), superficie de raíces y hojas (rizoplano y filósfera) y en el interior de los tejidos de las plantas (endósfera) (Lebeis *et al.,* 2012). Estas establecen asociaciones con diferentes comunidades microbianas, donde algunos miembros contribuyen positivamente al crecimiento, desarrollo y productividad de ésta (Lebeis *et al.,* 2012). Ello genera una demanda por encontrar genes, enzimas y compuestos que sean provistos de nichos microbianos de las plantas (Schmeisser *et al.,* 2007). Por lo tanto, es importante conocer la distribución y abundancia de las bacterias en las plantas (Van-Horn *et al.,* 2013).

El análisis de poblaciones microbianas asociadas a plantas, ha sido a través del crecimiento microbiano por medio de cultivos o la obtención de colonias en placas. Sin embargo, estos métodos tienen ciertas limitaciones, debido a que sólo una fracción de estos microorganismos pueden ser aislados (Van Elsas y Boersma, 2011). Ello ha generado que nuevas tecnologías como la metagenómica, a través de la cual, se han podido demostrar nuevos filos de bacterias no cultivables. Por ejemplo, el análisis de una muestra de suelo reveló 150,000 secuencias, de las cuales solo el 1% crece en medio de cultivo (Mendes *et al.,* 2013). Con esta nueva técnica se puede llegar a comprender mejor la ecología de los microorganismos, además de ser una herramienta para encontrar nuevos genes y biomoléculas (Mocali y Benedetti, 2010) (Fig. 1). Lo anterior permite generar el conocimiento para comprender la interacción planta-microorganismo, lo cual es clave para la inoculación de bacterias en plantas (Lebeis *et al.,* 2012).

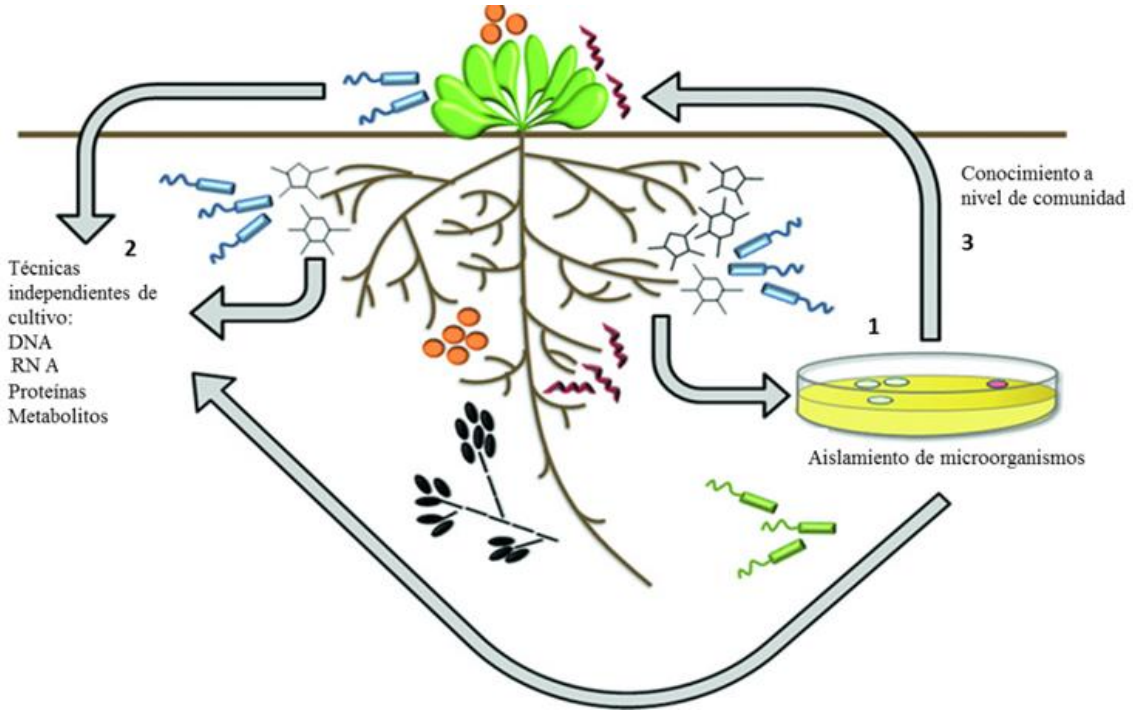

Figura 1. Estrategias de la interacción planta-microorganismo. (1) Las primeras investigaciones se basaron en microorganismos aislados a base de cultivos. (2) Las nuevas herramientas de secuenciación a través de la detección de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos permiten caracterizar la interacción planta-microorganismo en forma independiente a cultivos. (3) El resultado de estas dos técnicas ha generado el conocimiento para comprender la interacción planta-microorganismo. (Tomado de Lebeis *et al.,* 2012).

2.2 Bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal (BEPCV)

Generalmente las plantas son colonizadas por diversos microorganismos (hongos y bacterias), denominados endófitos (Zeng-Zhang *et al.,* 2011). Estos organismos aparentemente no causan daño alguno y se clasifican de tres maneras de acuerdo a la estrategia en que habitan en las plantas; obligatorios, aquellos incapaces de proliferar fuera de las plantas y se trasmiten probablemente a través de la semilla (Hardoim *et al.,* 2008); facultativos, se encuentran de forma libre en el suelo y colonizan a las plantas cuando se presenta la oportunidad (Ardanov *et al.,* 2012), y endófitos pasivos, los cuales no buscan colonizar las plantas; pero lo hacen como resultado de eventos estocásticos tales como heridas abiertas o lo largo de

pelos radicales, esta estrategia de vida es menos competitiva ya que es deficiente en la colonización de tejido vegetal y, por lo tanto, puede ser menos apropiada para estimular el crecimiento de la planta (Gaiero *et al.,* 2013).

Las bacterias endófitas que promueven el crecimiento vegetal (BEPCV), ayudan a las plantas a través de varios mecanismos: fijación de nutrientes (Chen *et al.,* 2010; Rashid *et al.,* 2012), fitoestimulación (Belimov *et al.,* 2005; Gaiero *et al.,* 2013), producción de antibióticos, producción de metabolitos secundarios, inducción del sistema de defensa de las plantas, biotransformación de metales pesados y la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Ardanov *et al.,* 2012; El-Deeb *et al.,* 2013), por lo que conocer la diversidad y función de bacterias que se encuentran en este nicho contribuiría positivamente a la disminución de productos químicos que dañan al ambiente (Puente *et al.,* 2009a) (Fig. 2).

La comunidad de bacterias endófitas puede ser influenciada por factores bióticos (microbiota presente y etapa de crecimiento de las plantas) o abióticos (tipo de suelo, régimen de agua, pH, etc.) (Andreote *et al.,* 2009; Puente *et al.,* 2009b). Actualmente se han aislado bacterias y actinomicetos endófitos de diferentes tejidos (e.g. hoja, tallo, raíz, semillas) (Nissinen *et al.,* 2012), en diferentes tipos de plantas como trigo, arroz, tomate, plátano, papaya y plantas medicinales (Li *et al.,* 2012). Sin embargo la población de bacterias endófitas es específica para cada órgano de las plantas; ya que se han encontrado diferentes bacterias endófitas en diferentes órganos de la misma planta (Ardanov *et al.,* 2012).

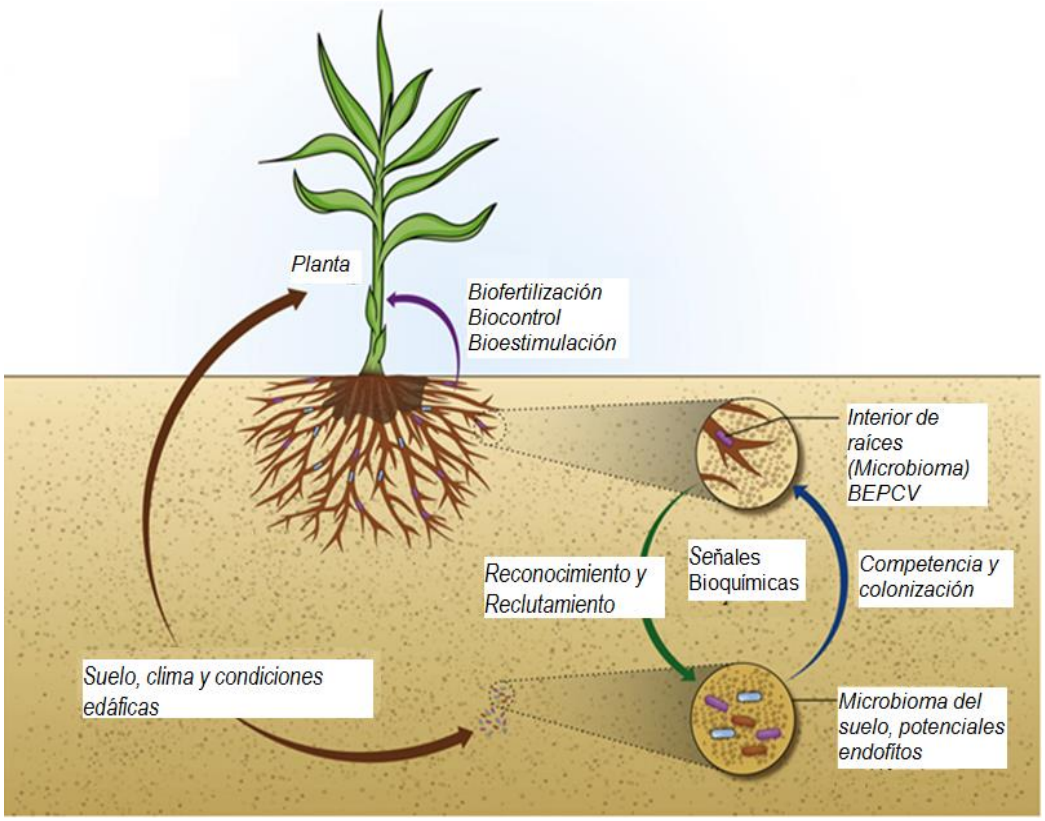

Figura 2. Modelo de la interacción planta-bacteria. El suelo es capaz de influir en la composición microbiana y en la fisiología de las plantas (flecha café). Las plantas seleccionan y reclutan a los endófitos potenciales (flecha verde) a través de la raíz, por medio de la señalización bioquímica de los exudados radicales. Los endófitos potenciales cooperan y compiten por lo sitios de la raíz (flecha azul). Una vez establecidos en el interior de la raíz de las plantas, algunos endófitos pueden influir en el crecimiento de las plantas (flecha morada) (Tomado de Gaiero *et al.,* 2013).

En los últimos años, se ha incrementado el interés en el estudio de las bacterias endófitas y su importancia en las plantas, debido a que actúan como agentes de control biológico en numerosas enfermedades, y como agentes de biorremediación de áreas contaminadas (Souza *et al.,* 2013). Sin embargo, son pocos los estudios sobre diversidad microbiana en la endósfera, encontrando que el filo de las proteobacterias incluidos rizobios, bacterias del género *Firmicutes*, son las que se encuentran más representadas, principalmente las alfa, beta y gammaproteobacterias, aunque los bacteroidetes y actinobacterias están

ampliamente representadas con un 29% y 11% respectivamente (Park *et al.,* 2013; Reinhold-Hurek y Hurek, 2011).

2.2.1 Fitoestimulación

Las plantas requieren de 16 elementos esenciales como carbono, hidrogeno, nitrógeno, oxígeno, fósforo y 11 más, estos elementos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas, los cuales son obtenidos de la atmósfera, suelo, agua y materia orgánica (Dini-Andreote y van-Else, 2013). Las bacterias endófitas juegan un papel importante en la absorción de estos nutrientes (Nair y Padmavathy, 2014). Por ejemplo, la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) es llevada a cabo por microorganismos que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), mismo que puede ser utilizado por las plantas (Mantilla-Paredes *et al.,* 2009). La FBN es realizada a través de la enzima nitrogenasa por microorganismos que se encuentran libres en su hábitat natural y aquellos que establecen simbiosis con leguminosas o con algunas especies forestales (Dobbelaere *et al.,* 2003). Algunos géneros de bacterias endófitas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo cual podría reducir el uso de fertilizantes químicos (Ikeda *et al.,* 2013).

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes y necesarios para las plantas (Dobbelaere *et al.,* 2003). Sin embargo, parte de este elemento aplicado como fertilizante reacciona con el calcio, el hierro y el aluminio del suelo, quedando inmovilizado, sin poder ser utilizado por las plantas (Hariprasad y Niranjana, 2009; Jorquera *et al.,* 2008). La solubilización natural del fósforo mineral es un fenómeno que realizan algunas bacterias endófitas (Pérez *et al.,* 2007), los cuales llegan a solubilizar componentes de fósforo inorgánico, fósforo tricálcico, fósforo dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica (Farzana *et al.,* 2007). Las bacterias solubilizan fosfato al producir ácidos orgánicos como ácido cítrico, láctico, succínico y glucónico (la acidificación libera los fosfatos y cationes de Ca^{2+}, Fe^{2+} y Al^{2+} al suelo) (Hariprasad

y Niranjana, 2009). También se puede solubilizar el fosfato por medio de la enzimas fitasa o fosfatasa que secretan algunas bacterias (Jha *et al.,* 2009).

El ácido indol-3-acético (AIA) puede ser producido por microorganismos del suelo, el cual se conoce como estimulante de la elongación, la división y la diferenciación celular (Farzana *et al.,* 2007). La cantidad de AIA que producen las bacterias puede estar influenciada por factores externos, como la estructura de la rizósfera, el tipo de planta y su etapa fenológica, o la composición microbiana de la rizósfera (Vestergard *et al., ,*2007). La síntesis de auxinas es por medio de tres rutas metabólicas a partir de triptófano (Trp): la denominada vía del indol 3-pirúvico (AIP), la vía indol 3-acetamida (AIM), y la vía de la triptamina (Tam) (Hernández-Mendoza *et al.,* 2008).

El hierro se encuentra en una forma no asimilable para las plantas; no obstante, algunos microorganismos del suelo tienen la capacidad de hacer el hierro disponible a través de la producción de sideróforos; los sideróforos son compuestos biológicamente activos con la función de quelar iones de hierro en organismos vivos, los cuales han sido aplicados en la agricultura (Nair y Padmavathy, 2014). En muchas ocasiones el secuestro de hierro por parte de algunas bacterias ayuda a inhibir el crecimiento de hongos patógenos (Gull y Yusuf-Hafeez, 2012).

2.2.2 Actividad antagonista

La simbiosis que se establece entre los microrganismos endófitos con su huésped, aumenta la producción de compuestos bioactivos antagonistas a patógenos (Casella *et al.,* 2013). Por ejemplo, bacterias endófitas aisladas de *Panax notoginseng* mostraban una actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum*, *Ralstonia* sp. y *Meloidogyne hapla* (Nair y Padmavathy, 2014).

Además, uno de los efectos positivos de las bacterias endófitas es inducir la resistencia sistémica (IRS), proteger a las plantas contra diferentes patógenos y posiblemente contra algunos insectos (Pineda *et al.,* 2010), a través de la

producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como la β-1,3-glucanasa y la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL 4.3.1.5) y enzimas oxidativas como peroxidasas (PO, EC 1.11.1.7) y polifenol oxidasas (PPO, EC 1.14.18.1) (Nga *et al.,* 2010). Sin embargo, el aumento de la actividad y la acumulación de estas enzimas dependen principalmente del etileno, (hormona vegetal). El etileno es el primer emisor de respuesta de las plantas a un estrés, además de actuar como señal durante la interacción planta microorganismo. Sin embargo, la emisión de etileno es síntoma de enfermedad de las plantas. Un inhibidor de la biosíntesis del etileno es la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACCD) (Indiragandhi *et al.,* 2008; Nga *et al.,* 2010).

En tejidos de las plantas, la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) es el precursor inmediato del etileno y se sintetiza a partir de S-adenosil metionina por la acción de la enzima ACC sintasa. En condiciones de estrés, la ACC sintasa es inducida produciendo en mayor cantidad S-adenosil metionina transformándose en ACC, aumentando en consecuencia el etileno (Varvara y Glick, 2001). La enzima (ACC) desaminasa reduce el nivel de estrés por etileno y es capaz de mantener el nivel de etileno suficiente para los procesos biológicos, lo que reduce los síntomas de enfermedad en plantas (Fig. 3) (Indiragandhi *et al.,* 2008; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Nga *et al.,* 2010).

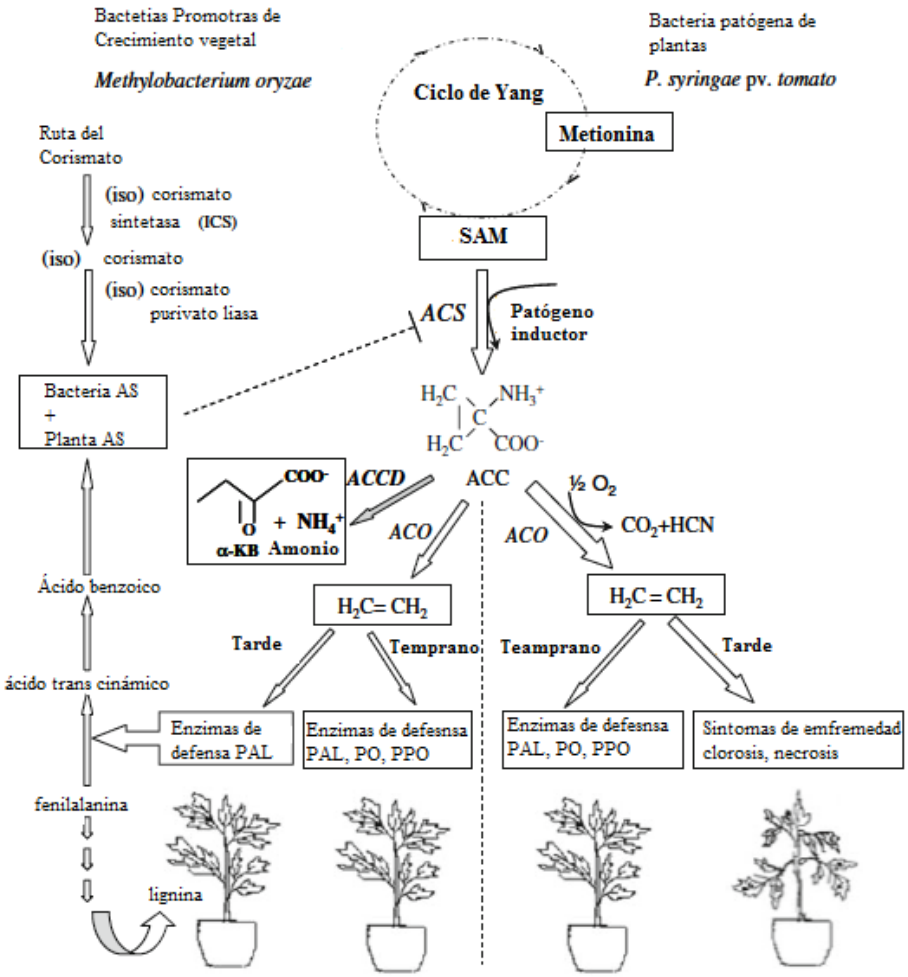

Figura 3. Modelo de reducción de etileno por bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Modelo propuesto de reducción del etileno por *Methylobacterium oryzae*, que conduce a un eventual aumento en las enzimas de defensa como consecuencia de la inducción de la resistencia sistémica, contra un patógeno invasor. SAM = S-adenosil metionina, AS = ácido salicílico, ACS = aminociclopropano-1-caboxilato sintetasa, ACC = aminociclopropano-1-caboxilato, ACO = aminociclopropano-1-caboxilato oxidasa, ACCD = aminociclopropano-1-caboxilato desaminasa, a-KB = a-ketobuterano. (Tomado de Indiragandhi *et al.,* 2008).

2.3 Jojoba (*Simmondsia chinensis* [Link, Schneid])

La jojoba (*S. chinensis* L. [Schneider]) es un arbusto dioico perene, originario del Noroeste de México y del Suroeste de Estados Unidos, esta zona presenta una precipitación pluvial de tan sólo 80 mm al año, con temperatura que oscilar desde -5 °C a 54 °C y suelos con pH de 5 a 8; debido a su tolerancia a la sequía y altas temperaturas, este arbusto es importante para la conservación del suelo y para evitar la desertificación (Hosseini *et al.,* 2011; Xiao-fei *et al.,* 2013). En este ambiente, el déficit de agua es uno de los retos ambientales más comunes que limitan el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que éstas desarrollan múltiples vías bioquímicas que facilitan la retención o adquisición de agua y mantienen la homeostasis de iones en las plantas (Geng *et al.,* 2008).

Las flores masculinas y femeninas de jojoba son pequeñas y carecen tanto de nectario como de pétalos. Las flores femeninas se componen de uno a cuatro brácteas, de cuatro a seis sépalos y un ovario superior coronado por tres estilos largos; hay tres óvulos por ovario anátropo, aunque también se pueden encontrar cuatro óvulos por ovario; aunque tres óvulos se reproducen normalmente sólo uno de los tres óvulos fertilizados produce un fruto capsular (Geng *et al.,* 2008). Las flores masculinas se desarrollan en inflorescencias racemosas y cada una consta de cuatro a seis sépalos y de 8 a 16 anteras (Coates y Ayerza, 2008). El período de floración puede variar de 30 a 45 días dependiendo de la temperatura ambiental, ya que ésta tiene efecto sobre la reciprocidad del estigma; dependiendo de la temperatura del ambiente, las flores femeninas son receptivas en un período de 3 a 6 días; de igual manera la viabilidad del polen dependerá de la temperatura del ambiente y el porcentaje de humedad (Ince y Karaca, 2011).

Esta planta es única debido a que el 50% del peso de sus semilla es cera líquida que está compuesta principalmente por monoésteres de C: 20 y C: 22, alcoholes de cadena lineal y ácidos (Coates y Ayerza, 2008). Esta cera es diferente a los aceites vegetales y grasas animales ya que se compone principalmente por

ésteres (El-Mallah y El-Shami, 2009). El consejo internacional de exportación de jojoba define varios estándares de calidad universal para esta cera, cuya calidad es modificada por varios factores relacionados con el proceso de extracción y condiciones de almacenamiento. Las principales reacciones de degradación son la hidrólisis, la oxidación química o enzimática, la polimerización y la descomposición (Gayol *et al.,* 2009).

2.3.1 Importancia de la jojoba

En las últimas décadas los estudios de jojoba se han enfocado principalmente a los siguientes campos, (1) desarrollo de cultivos a través de la selección de clones para el mayor rendimiento y adaptaciones al clima; (2) métodos fiables y sencillos de cultivo de tejidos para la propagación masiva *in vitro*; (3) características físicas y químicas del aceite de jojoba y su aplicación industrial; (4) caracterización y utilización de subproductos de las semillas después de la extracción; (5) caracterización y expresión de algunos genes (Geng *et al.,* 2008).

La importancia de esta planta radica en la cera que produce su semilla, ya que ésta tiene varias aplicaciones. Se ha utilizado para la elaboración de productos cosméticos (Gayol *et al.,* 2009) así, como reemplazo del aceite de esperma de ballena en la fabricación de tintas, barnices, ceras, detergentes, resinas y plásticos. Recientemente se ha incorporado a fórmulas que contienen compuestos activos para mejorar la eficiencia de los fármacos (El-Mallah y El-Shami, 2009). También es utilizada como tratamiento para las heridas en entornos clínicos (Ranzato *et al.,* 2011) y como biocombustible alternativo (Bhardwaj *et al.,* 2010). Los residuos de las semillas, una vez extraída la cera, tienen la capacidad de absorber cadmio en corrientes de aguas residuales (Allawzi *et al.,* 2010).

2.3.2 Problemática de la producción de jojoba

La planta de jojoba por ser una planta dióca y con polinización cruzada, presenta una alta variabilidad en la producción de semilla y contenido de aceite (Al-

Soqeer *et al.,* 2012). Adicionalmente, al no poder distinguir el sexo a una edad temprana, ya que no se presentan diferencias morfológicas en la etapa juvenil; si no hasta los tres o cuatro años de edad, cuando este arbusto llega a la fase de floración (Hosseini *et al.,* 2011). Lo anterior ha causado que la domesticación, mejoramiento agronómico y comercialización esté rezagado. El uso de clones por propagación con esquejes para establecer plantaciones comerciales se enfrenta a problemas de rendimiento de las semillas o semillas de bajo contenido de cera. Varios estudios reportan formas para mejorar el rendimiento de la semilla de jojoba y de la cera (Ince y Karaca, 2011).

Diferentes problemas de este cultivo se reflejan en plantaciones comerciales; por ejemplo, en el Valle Hydey en Arizona y en Catamarca, Argentina, han disminuido dramáticamente en tamaño y número. En Arizona, de las 10,000 has que había en la década de 1980 actualmente quedan alrededor de 2,000 has de 3,000 has en Catamarca a finales de 1990 quedan aproximadamente 300 has. La principal razón de esta reducción se debe a rendimientos más bajos de lo esperado y como resultado el abandono de las plantaciones (Coates y Ayerza, 2008). En Australia, el cultivo de jojoba inició en la década de 1980 y fue muy importante; no obstante, debido a la gran variabilidad en el rendimiento de semillas, la mayor parte de las plantaciones fueron abandonadas; actualmente cuentan con aproximadamente 550 has. Desafortunadamente en Australia se ha desarrollado la enfermedad de la costa negra causada por un hongo del género *Elsinoë*, disminuyendo la producción de semillas (Ash *et al.,* 2012).

2.3.3 Cultivo *in vitro* de jojoba

La propagación vegetativa es un método útil para la selección de plantas con características deseables y que se propagan asexualmente en un período de tiempo corto (Ince y Karaca, 2011). La propagación vegetativa permite el establecimiento de plantaciones con las proporciones deseadas de plantas femeninas y masculinas. Además de crear uniformidad, altos rendimientos, producción temprana y reducción

de costos de las operaciones de cultivo y de cosecha, los intentos de propagar jojoba vegetativamente han sido a través de las técnicas de injertos, acodos, esquejes y cultivo de tejidos (Bashir *et al.,* 2009). Este último método sirve para la producción masiva con fines de establecer plantaciones comerciales, libres de patógenos con la proporción deseada de plantas femeninas y masculinas (Llorente y Apóstolo, 1998). En el caso de jojoba el proceso de enraizamiento ha sido uno de los problemas más comunes en cultivo *in vitro* (Apóstolo *et al.,* 2001; Llorente *et al.,* 2007).

2.3.4 Proceso de aclimatación

La micropropagación permite una alta producción de plantas libres de enfermedades y patógenos, independientemente de la temporada y el clima; sin embargo, una limitación importante es la transferencia a condiciones *ex vitro*, debido a que las plantas son expuestas a estrés biótico (microbioma) o abiótico (temperatura, intensidad luminosa y humedad). Se necesita un proceso de aclimatación exitoso para el establecimiento y supervivencia de las plántulas para aumentar el crecimiento y reducir la mortalidad en esta etapa (Chandra *et al.,* 2010). Si no se realiza una adecuada aclimatación las plantas estarán expuestas a anomalías fisiológicas y anatómicas, debido a la baja densidad de flujo de fotones (PFD) y baja humedad del aire causando una fotoinhibición (Perveen *et al.,* 2013). La pérdida de agua y cierre de los estomas dan lugar a una disponibilidad reducida de dióxido de carbono (Batková *et al.,* 2008; Geng *et al.,* 2008).

Algunas actividades metabólicas pueden aumentar la producción de radicales libres causando estrés oxidativo. En condiciones basales de crecimiento, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) es generalmente baja, pero aumenta cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Batková *et al.,* 2008). Las ERO pueden afectar negativamente algunas funciones celulares al dañar las bases del ADN, oxidando proteínas y provocando la peroxidación de lípidos (Xiao-fei *et al.,* 2013).

Para contrarrestar los efectos nocivos de las ERO, las plantas han desarrollado un complejo sistema de defensa antioxidante, incluyendo la ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), y metabolitos como el ascorbato (ASA), tocoferoles, carotenoides, glutatión y vitamina E (Chakrabarty y Kumar-Datta, 2008; Xiao-fei *et al.,* 2013). En las plantas generadas en condiciones *in vitro* la mayor actividad de las enzimas antioxidantes es debido a la APX (Habib *et al.,* 2014).

La enzima SOD tiene un papel crucial en los sistemas antioxidantes, ya que cataliza la dismutación de O_2 en H_2O_2 y O_2 (Xiao-fei *et al.,* 2013). Se han identificado tres isoformas de SOD en plantas, con base en su cofactor metal Fe-SOD se encuentran solo en plastidios, Mn-SOD se encuentran principalmente en mitocondrias y peroxisomas y Cu/Zn-SOD está situada en los plástidos, citosol, apoplasto y peroxisomas. La conversión de H_2O_2 a agua es llevada a cabo en los peroxisomas y es realizada por la CAT, mientras que en el citosol y cloroplastos esta conversión se realiza a través del ciclo ascorbato-glutatión, en el que intervienen la APX, ASA y GR. La APX cataliza la conversión de H_2O_2 en agua usando ASA como sustrato, la GR contribuye a la regeneración de ASA (Chakrabarty y Kumar-Datta, 2008).

2.4 Biotización

La utilización de microorganismos benéficos (hongos o bacterias) en cultivos *in vitro* se conoce como biotización; está técnica ayuda a las plantas a tener una mejor aclimatación cuando las plantas son trasladadas a condiciones *ex vitro* (Rai, 2001). Al crear una rizósfera benéfica en plantas micropropagadas, éstas se adaptan más rápido al estrés abiótico y biótico (Vestberg *et al.,* 2004). Por ejemplo, al inocular *Pseudomonas* sp. en cultivos *in vitro* de papa, las bacterias estimulas el crecimiento de las plantas mejorando la absorción del agua, obteniendo una mayor tolerancia a patógenos, lo cual probablemente se debe a que desarrolla una raíz bien ramificada y con una mayor abundancia de pelos radicales, con tallos más

gruesos y con un mayor contenido de lignina, generando una mayor adaptabilidad a condiciones *ex vitro* (Nowak, 1998).

Duffy *et al*. (1999) realizaron un estudio donde utilizaron *Pseudomonas fluorescens* a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL^{-1} en cultivo *in vitro* de papa y posteriormente fueron trasladadas a condiciones *ex vitro*; las plantas que contenían la suspensión bacteriana presentaron mayor peso fresco en tallos, tubérculos más grandes y mayor número de tubérculos. De igual manera, Pious *et al.* (2007), encontraron que al inocular microorganismos endófitos en papaya *in vitro*, las plantas presentaban un mejor desarrollo radicular, aumentando así el crecimiento de las plantas, demostrando que los microorganismos son capaces de crecer en medios de cultivo *in vitro*, sin afectar el desarrollo de las plantas inoculadas.

Otro ejemplo fue al inocular *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum* en cultivos *in vitro* de *Photinia fraseri* donde aumentó la elongación y número de raíces, mejoró el desarrollo de las hojas, además las hojas de las plantas presentaron cutículas más gruesas y tricomas uniceluares lineales; resultando plantas con mayor capacidad de adaptación a condiciones *ex vitro* (Larraburu *et al.,* 2007; 2010). En cultivos *in vitro* de jojoba se ha inoculado *A. brasilense* estimulando el enraizamiento y generando mayor número de raíces, demostrando que algunas bacterias son muy importantes para la rizósfera de jojoba (Carletti *et al.,* 1998).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la producción de la semilla de jojoba ha disminuido por su alta variabilidad genética, además, el establecer plantaciones comerciales es un problema, debido a que el sexo de las plantas se distingue hasta una edad de 3 a 4 años, por lo que la utilización de cultivos *in vitro* puede ser una alternativa; ya que con esta técnica, se pueden seleccionar plantas élite, mejorando la producción. Sin embargo, se presenta una alta tasa de mortalidad de las plantas, cuando son transferidas de *in vitro* a pre-aclimatación. Por lo tanto la utilización de bacterias endófitas (biotización) podría ser una alternativa a esta problemática, ya que se ha demostrado estudiado que las bacterias endófitas benefician a las plantas a través de la promoción de crecimiento, antagonismo contra patógenos e inducción del sistema de resistencia. Dado lo anterior, en este estudio se llevaron a cabo asilamiento, selección e identificación de bacterias endófitas de raíces de jojoba para probar la técnica de biotización en cultivos *in vitro* y pre-aclimatación.

4. HIPÓTESIS

Si las bacterias endófitas intervienen en el desarrollo de las plantas, y las protegen contra el estrés biótico y abiótico, entonces, las bacterias endófitas aisladas de las raíces de jojoba e inoculadas en cultivos *in vitro* de esta especie, podrían incrementar el desarrollo de la jojoba y disminuirían la mortalidad provocada por patógenos y estrés abiótico, en el proceso de pre-aclimatación para trasplante a suelo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la micropropagación de jojoba (*S. chinensis*) bajo la técnica de biotización a través de bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal en cultivos *in vitro* y etapa de pre-aclimatación.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar y caracterizar bacterias endófitas asociadas a la raíces de jojoba (*S. chinensis*).
- Evaluar morfológica y fisiológicamente la jojoba (*S. chinensis*) micropropagada bajo la técnica de biotización con bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal.
- Evaluar morfológica y fisiológicamente las plantas micropropagadas de jojoba (*S. chinensis*) en la etapa de pre-aclimatación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sitios de muestreo

Se localizaron 27 sitios donde se encuentran poblaciones silvestres de jojoba, ubicadas en el estado de Baja California Sur, México (Fig. 4). De cada sitio se muestrearon 4 plantas de jojoba (dos femeninas y dos masculinas); de cada planta seleccionada se tomaron raíces secundarias y se colocaron en bolsas de plástico, se trasladaron al laboratorio del CIBNOR, para su posterior aislamiento y análisis.

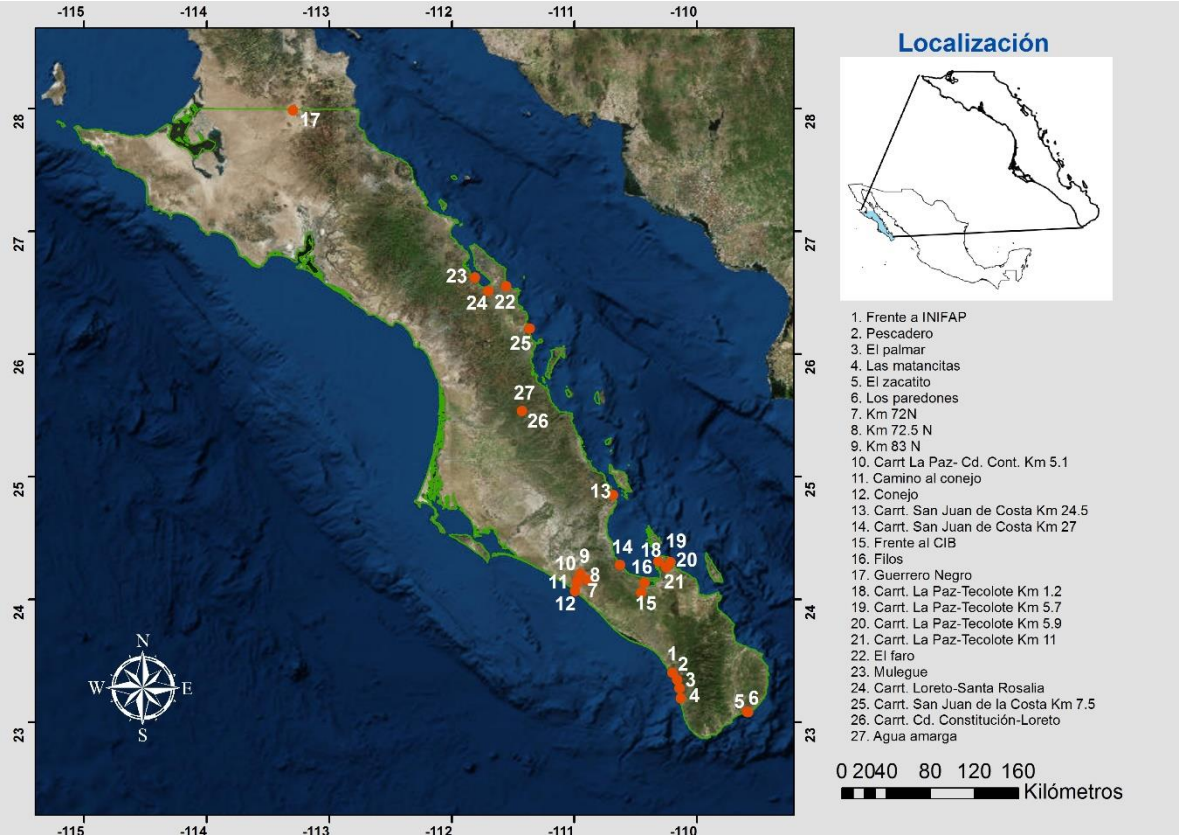

Figura 4. Localización geográfica de las plantas de jojoba, sitios de muestreo.

. .

6.1.1 Análisis de suelo de los sitios de muestreo

En cada sitio de muestreo se colectaron 500 g del suelo a una profundidad de 5 a 10 cm de la rizósfera de jojoba, las muestras se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis en laboratorio (El-Deeb *et al.,* 2013).

La determinación de pH se realizó haciendo mediciones directas, mediante una dilución de la muestra de suelo en agua en una proporción de 1:1 (peso/vol). El contenido de materia orgánica se realizó por el método de Walkley-Black (Walkley y Black, 1965). La determinación de fósforo soluble se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Jackson (1973). La textura se determinó por el autoanalizador láser (Horiba LA-950V2) de distribución de partículas.

6.2 Aislamiento de bacterias endófitas

Las raíces fueron lavadas con agua para retirar la mayor parte del suelo adherido. Estas fueron higienizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 30% por 30 minutos y lavadas con agua destilada estéril cinco veces, para remover todos los residuos y microorganismos exógenos. Para comprobar que el proceso de desinfección fue exitoso, las raíces fueron colocadas en placas que contenían agar nutritivo. Ninguna contaminación fue observada. Las raíces (10 g por sitio de muestreo) fueron maceradas en una alícuota de 90 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriales y fueron sembradas en agar nutritivo y en medio Czapeck (KCl 1.5%; K_2HPO_4 0.1%; $NaNO_3$ 0.02%; sacarosa 3%) (Guang-Kai *et al.,* 2012), para el aislamiento de bacterias y actinomicetos respectivamente. Las placas se incubaron a 28 °C por 7 días y se revisaron cada 24 horas para su conteo. Una vez obtenidos los datos de las unidades formadoras de colonias (U.F.C.), estos fueron transformados a $\log^{10}$ para el mejor procesamiento de los datos. Las colonias que presentaron una morfología diferente fueron purificadas, por el método de estría cruzada.

6.3 Caracterización de las bacterias endófitas

6.3.1 Caracterización microscópica

Las cepas bacterianas aisladas y purificadas se caracterizaron por morfología celular mediante frotis preparados con una alícuota de biomasa celular de cada una de las cepas y homogeneizadas con 100 µL de solución salina al 0.85%, los cuales fueron teñidos utilizando la técnica de tinción de Gram. Las muestras fueron observadas en el microscopio de contraste de fases con el objetivo de inmersión en aceite 100X (Leica). Se determinó tamaño, forma de la célula bacteriana, y tinción de Gram (El-Deeb *et al.,* 2013).

6.3.2 Solubilización *in vitro* de fósforo

La solubilización de fósforo se determinó para cada una de las cepas aisladas, midiendo el halo de solubilización de fósforo insoluble en placas de medio Pikovskaya (glucosa 1%; Ca_3 $(PO_4)_2$ 0.5%; $(NH_4)_2SO_4$ 0.05%; KCl 0.02%; $MgSO_4.7H_2O$ 0.01%; $MnSO_4$ 0.0002%; $FeSO_4$ 0.0002%; extracto de levadura 0.05%) (Pikovskaya, 1948).

6.3.3 Fijación de nitrógeno

Los aislamientos bacterianos fueron inoculados en viales que contenían 5 mL de medio de cultivo JNFb semi–sólido, sin fuente de nitrógeno (Döbereiner *et al.,* 1995), después de 7 días de incubación a 28 °C, las bacterias que formaron una película, característico de diazótroficos de vida libre, fueron sembradas en medio JNFb suplementado con 20 mg L^{-1} de extracto de levadura. Las cepas aisladas que crecieron en medio solido fueron re-inoculadas en el medio JNFb semisólido. Las cepas que formaron de nuevo la película, fueron consideradas como positivas para fijación de nitrógeno (Ribeiro y Nogueira-Cardoso, 2012).

6.3.4 Determinación de ácido indol-acético mediante espectrofotómetro

Cada una de las cepas fue cultivada por 4 días en agitación constante a 28 °C en tubos que contenían 10 mL de medio mínimo (sacarosa 1%; $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%; K_2HPO_4 0.2%; $MgSO_4$ 0.05%; NaCl 0.01%; extracto de levadura 0.05%; CaCO3 0.05% pH 7.2), suplementado con 0.5 mg mL^{-1} de triptófano, en condiciones de oscuridad. Después de la incubación, la suspensión celular fue centrifugada por 10 min a 10,000 rpm, se tomó 1 mL del sobrenadante y se transfirió a un tubo que contenía 4 mL del reactivo de Salkowski's (Gordon y Weber, 1951), se dejó reposar por 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una absorbancia de 530 nm. La concentración de ácido indol-acético (AIA) se determinó con una curva de calibración, con AIA como estándar, a través de un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

6.3.5 Producción de sideróforos

Para la secreción de sideróforos, las cepas fueron cultivadas en caldo nutritivo (peptona de carne 0.5%, extracto de levadura 0.3%) en agitación constante por 48 h a 28 °C y se tomó 50 µL de la suspensión celular y se inoculó en placas que contenían cromo azul (CAS) (Alexander y Zuberer, 1991) se tomó como resultado positivo aquellas cepas que formaban un halo de color a su alrededor.

6.3.6 Actividad del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa

Las bacterias fueron sembradas en placas que contenían medio mínimo DF (KH_2PO_4 0.04%; Na_2HPO_4 0.06%; $MgSO_4.7H_2O$ 0.0002%; $FeSO_4.7H_2O$ 0.0001%; H_3BO_3 0.0001%; $MnSO_4$ 0.0001%; ZnSO 0.0007%; $CuSO_4$ 0.0005%; MoO 0.0001%, glucosa 0.02%; ácido glucónico 0.02%; ácido cítrico 0.02%) (Dworkin y Foster, 1958) suplementado con 3mM de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilasa), se tomó como resultado positivo aquellas cepas que tuvieron

crecimiento; como control negativo se utilizaron placas con DF sin ACC y como control positivo placas con DF y $(NH_4)_2SO_4$ (0.2%) como fuente de nitrógeno.

6.3.7 Actividad antagonista

Todas las bacterias aisladas fueron confrontadas contra *Alternaria* sp. para determinar su comportamiento antifúngico mediante la técnica de cultivo doble (Ma *et al.,* 2013); la presencia de una zona inhibitoria indica la actividad antifúngica de las cepas bacterianas probadas.

6.3.8 Identificación de las cepas

Se seleccionaron 8 cepas, las cuales presentaron el mayor número de mecanismos de promoción de crecimiento en plantas. A cada una de las cepas se le extrajo el ADN genómico total, de acuerdo con el protocolo del kit DNeasy (QIAGEN Inc., Valencia, CA) con algunas modificaciones. Se tomaron tres colonias por cepa a las cuales se añadió buffer de lisis y se incubó durante 24 h a 37 °C. Después se agregó proteinasa K, la muestra se mantuvo durante 1 h a 70 °C. El ADN genómico se eluyó en una columna, para posteriormente centrifugarlo con 100 µL de buffer de elución para su uso inmediato. Los genes 16S rRNA fueron amplificados a partir del ADN genómico a través de PCR usando los primer universales 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') Y 1385 (5'-CGGTGTGT(A/G)CAAGGCCC-3') (Hentschel *et al.,* 2001). La reacción contenía: 1µL de ADN, 1 µL de cada oligonucleótido, 2.5 µL de 10X buffer PCR, 0.2 mM de dNTP'S, 25 mM MgCl (Promega; Pharmacia Biotech), 1.25 U Taq polymerasa (Promega), 0.13 µL de cada oligonucleótido y agua Mili-Q para tener un volumen final de 12.5 µL. La reacción se inició con la desnaturalización durante 2 min a 95 °C seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un 1 min, la primera alineación (fue entre 50 y 54 °C dependiendo de la cepa, por 1 min) y una extensión de 72 °C por 1 min. Seguida de una alineación final de 72 °C (durante 5 a 10 min dependiendo de la cepa) y se incubaron a 4 °C de manera infinita. El producto de PCR se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando el

kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), la secuenciación se realizó en Genewiz, Inc. (South Plainfield, NJ, USA). La secuencia del 16s rRNA fue comparado con la base de datos de GenBank usando el programa NCBI Blast. La secuencia de alineación y la construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.,* 2011).

6.3.9 Cinéticas de crecimiento

Una vez identificadas las cepas se seleccionaron dos, las cuales fueron cultivadas en medio mínimo con metanol al 0.5% (Fedorov *et al.,* 2013), durante 72 h a 120 rpm, y se cuantificaron por medio de espectrofotometría (600 nm) y por cuenta viable.

6.3.10 Preparación del inóculo

Los inóculos se realizaron con las siguientes cepas: *A. brasilense* (Cd) (American Type Culture Colection; ATCC 29710) crecida en medio liquido de Okon *et al.* (1977) como control positivo. *M. aminovorans* (JRR22) (KT964148) y *R. pyridinivorans* (JRR11) (KT985910), aisladas de raíces de jojoba (Perez-Rosales *et al.,* 2017) fueron cultivadas por separado en medio mínimo con metanol al 0.5% (Fedorov *et al.,* 2013). Todas las cepas fueron incubadas a 28 °C ± 1 en agitación (120 rpm) durante 72 horas, hasta obtener una concentración de 10^6 U.F.C. mL^{-1}, esto se determinó por densidad óptica, a través de las cinéticas de crecimiento estandarizadas anteriormente.

6.4 Cultivo *in vitro* de jojoba

Los cultivos *in vitro* fueron derivados de plantaciones de jojoba en etapa adulta ubicadas en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (24° 8’7’’-110° 25’38’’) en La Paz, Baja California Sur; que posteriormente fueron establecidos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con bencil amino purina (BAP 0.1µM), 3% de sacarosa y 0.8% de agar. Las plantas se transfirieron cada 3 meses.

6.4.1 Multiplicación

Una vez obtenidos los brotes de 2 cm aproximadamente fueron transferidos a frascos que contenían medio Murashige y Skoog con vitaminas del medio B5 (Gamborg *et al.,* 1968) (MSG), suplementado con 4.44 µM de BAP de acuerdo a Llorente *et al.* (2007). Los brotes fueron mantenidos en este medio durante un período de 8 semanas.

6.4.2 Inducción de enraizamiento

Para esta etapa se utilizaron explantes con un nodo y dos yemas axilares, y fueron cultivados en medio de inducción de enraizamiento (RIM) el cual fue preparado usando medio MSG a la mitad de sales, 0.6% de agar, suplementado con 49.2 µM IBA (ácido indol butírico), el pH del medio fue ajustado a 5.8. Los explantes fueron cultivados en este medio RIM por 6 días (Carletti *et al.,* 1998).

6.4.3 Biotización

Después de los seis días los explantes fueron transferidos a medio MSG a la mitad de sales y libre de hormonas, en este paso se realizó la inoculación. Para lo cual se adicionó 0.1 mL de cada cultivo bacteriano (10^6 UFC mL^{-1}) en la base de cada explante. Tratamientos sin inoculación fueron tomados como controles. Los cultivos fueron incubados en cámaras de crecimiento a 28±2 °C bajo fotoperíodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad durante y 60 días.

6.4.4 Pre-aclimatación

Las plantas enraizadas se transfirieron a almácigos con sustrato estéril (peat moss, perlita y suelo mezclado por partes iguales), las cuales fueron re-inoculadas con 2 mL del cultivo bacteriano (10^6 UFC mL^{-1}), dependiendo del tratamiento. Posteriormente fueron colocadas en contenedores de plástico de 40 cm de largo, 20 cm de ancho y 15 cm de altura. Se incubaron en cámaras de crecimiento a 28 ± 2 °C bajo fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad por un período de 60 días.

6.5 Análisis de plántulas en etapa de enraizamiento y Pre-aclimatación

6.5.1 Parámetro de crecimiento

Durante la fase de multiplicación se realizaron observaciones y evaluaciones como altura de los explantes, número de brotes y coeficiente de multiplicación (cm= número de brotes/número de plantas iniciales).

Al finalizar la etapa de enraizamiento (60 días) y la etapa de pre-aclimatación (60 días) se midió la longitud de tallo y longitud de raíz (ambas variables se midieron con un vernier).

6.5.2 Clorofila α, β, total y carotenoides

Para la determinación de pigmentos fotosintéticos se preparó un homogeneizado de 0.3 g de hojas frescas con 10 mL de acetona al 80%, posteriormente se centrifugó a 12,000 *x g* por 10 min, y a continuación se midió la densidad óptica del sobrenadante a 480 y 510 nm para la cuantificación de carotenoides y a 645 y 663 nm para cuantificar el contenido de clorofila α, β y total (Perveen *et al.,* 2013). Todas las determinaciones se realizaron con el espectrofotómetro BioRad Modelo 550.

6.5.3 Actividad enzimática

La determinación de las enzimas se realizó en las etapas de *in vitro* y de pre-aclimatación; en hojas y raíces. Para ello se seleccionaron tres plantas por tratamiento para obtener un homogenizado. Para lo cual se tomó 0.5 g de cada parte de las plantas y se agregaron 5 mL de la solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M de fosfato (pH 7.0), 1.0 mM MgCl 10 mM EDTA) y 1% PVP (polivinilpirrolidona). El homogeneizado se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de las proteínas totales y las enzimas. La determinación de proteínas totales solubles se realizó por el método de Bradford (1976).

6.5.3.1 Superoxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

La determinación de SOD se realizó a través del sistema xantina/xantina oxidasa. Se mezclaron 25 µL de la solución de xantina oxidasa, 25 µL del extracto de la muestra y 1450 µL de la solución compuesta por 0.5 M de sodio carbonato (pH 7.5), 0.1 mM de EDTA, 63 mM de nitroazul de tetrazolio (NBT), 1.5 mM de xantina. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro a 560 nm (Jenway Modelo 6505) por 300 s. La actividad se expresó en U SOD.mg proteína^{-1} (Suzuki, 2000).

6.5.3.2 Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se determinó mediante la tasa de descomposición del H_2O_2, cuantificando el decremento de la absorbancia a 240 nm (Jenway Modelo 6505), para lo cual se realizó una mezcla de 50 mM de amortiguador de fosfato (pH7.0) y 10 µL del extracto de la muestra en un volumen total de 1.5 mL. La reacción inició mediante la adición de 10 mM de H_2O_2. La actividad se expresó en U CAT.mg proteína^{-1} (Aebi, 1974).

6.5.3.3 Peroxidasa (POX; EC 1.11.1.7)

La actividad se determinó mezclando 500 µL del extracto de las plantas con 1350 µL de agua destilada, 125 µL de 0.1 mM de buffer de fosfatos, 24.5 µL de H_2O_2 al 5% y 500 µL de 1 mM de pirogalol. La mezcla se leyó en un espectrofotómetro a 420 nm por 90 s (Jenway Modelo 6505) (Zhou y Leul, 1999). La actividad de POX se expresó en U POX.mg^{-1} proteína.

6.5.3.4 Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

La actividad se cuantificó monitoreando el decremento en la disminución de la absorbancia a 290 nm (Jenway Modelo 6505) durante 60 s, para lo cual se preparó una mezcla que contenía 50 mM de buffer de fosfatos (pH 7.5), 0.5 mM de ascorbato, 0.1 mM de H_2O_2, 0.1 mM de EDTA y 500 µL del extracto de la muestra. El blanco se realizó adicionando buffer de fosfato en lugar de la muestra. La actividad se expresó en U APX.mg proteína^{-1} (Chen y Asada, 1989).

6.5.3.5 Fenilalanina amonio-liasa (PAL; EC 4.3.1.5)

La actividad de la PAL se realizó siguiendo el método descrito por Paynet *et al.* (1971), mediante la medición de la cantidad de ácido trans-cinámico formado leído a 290 nm (Beckman Couter Du 800). La reacción se realizó con 100 µL del extracto de la muestra, 900 µL de 6 mM de L- fenilalanina y 500 mM de Tris HCl (pH 8). La mezcla se colocó en un baño de agua a 37 °C durante 70 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de HCl 5 N. Se usó ácido trans-cinámico (1 mg mL^{-1}) para la curva estándar, la actividad de PAL se expresó como µg ácido trans-cinámico min^{-1} .mg $proteína^{-1}$.

6.5.4 Análisis de tejidos por microscopía óptica

Cinco plantas por tratamiento fueron fijadas en FAA (etanol 96°: agua destilada: formaldehido: ácido acético, 10:7:2:1). Las Hojas fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Se realizaron cortes transversales (40 µm) con un micrótomo LEICA® RM 2155 (Larraburu *et al.,* 2010). Para eliminar la parafina, las muestras fueron sumergidas en xilol al 100%, posteriormente fueron teñidas con safranina-verde rápido. Se realizaron mediciones de grosor de la epidermis adaxial y abaxial; grosor del parénquima empalizado y parénquima esponjoso, por medio sistema de análisis de imágenes (ImagePro-Plus Media, Cibernetics).

6.6 Diseño experimental

Se realizaron diferentes diseños experimentales, de acuerdo a cada etapa de la investigación, los cuales se describen a continuación:

1. En cada sitio de muestro se seleccionaron 4 plantas al azar dos plantas femeninas y dos plantas masculinas.
2. En la etapa de caracterización de las cepas aisladas, se estableció un diseño experimental completamente al azar, donde cada caja de Petri fue considerada como una unidad experimental con tres repeticiones cada una.

3. El establecimiento de los cultivos *in vitro*, en las cámaras de crecimiento, así como de los almácigos en la etapa de pre-aclimatación; fue a través de un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial de 2X5X3, donde los factores fueron: los dos genotipos de jojoba (plantas masculinas y femeninas), la inoculación de las cepas [*A. brasilense* (Cd), *M. aminovorans* (JRR22) *R. pyridinivorans* (JRR11) y la combinación de las dos últimas] cuya combinación da un total de 10 tratamientos; cada tratamiento contó con 20 plantas y el experimento fue repetido tres veces.

Para el análisis de la concentración de pigmentos y enzimas se tomaron cinco plantas por tratamiento con el objetivo de realizar una mezcla, cada muestra contó con tres repeticiones.

Las mediciones realizadas en los cortes histológicos, se realizaron cinco mediciones al azar de cada laminilla y cinco mediciones por tratamiento

6.7 Análisis estadístico

Primeramente, los datos fueron analizados para comprobar su distribución normal, a través de la prueba Shapiro Wilks con un nivel de significancia del 95% a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, 1999).

Para determinar las diferencias significativas de la densidad de poblaciones de bacterias endófitas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$); a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, 1999).

En la etapa *in vitro*, se realizó una prueba *t* de Student, con una significancia de $p \leq 0.05$; para las variables de altura de planta y número de brotes; a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, 1999).

En las variables, longitud de plantas y longitud de raíz en etapa de enraizamiento y pre-aclimatación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba

de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$); a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, 1999).

En las variables de concentración de pigmentos, actividad enzimática y análisis morfológico, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vía (plantas femeninas y masculinas) y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$); a través del paquete estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, 1999).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de los sitios de muestreo

Los resultados obtenidos del pH del suelo mostraron, que los sitios 2 y 10 presentaron los más bajos de pH (6.15 y 6.18, respectivamente), mientras que en los sitios 5 y 20 se registraron los valores más altos (9.11 y 9.19 respectivamente). Así mismo, la concentración de fósforo en el suelo se registró en un rango de 0.8 a 23.3 $mg.kg^{-1}$. El porcentaje de materia orgánica varió desde 0.2 hasta 8.1. Lo que indica que las plantas de jojoba pueden adaptarse a diferentes características físico-químicas del suelo (Tabla I).

Tabla I. Propiedades físico-químicas del suelo de los sitios de muestreo.

Sitio	pH	Fósforo (mg/kg P)	% Materia orgánica	Sitio	pH	Fósforo (mg/kg P)	% Materia orgánica
1	6.96	23.3	0.3	15	7.52	13.8	0.7
2	6.15	5.6	0.3	16	8.43	3.2	2.1
3	6.92	19.9	0.3	17	6.85	7.8	0.7
4	6.25	9.1	1	18	8.09	9.9	1
5	9.11	0.8	0.3	19	7.63	10.3	3.4
6	8.45	7.8	2	20	9.19	2.7	0.7
7	7.97	2	1.5	21	8.81	5.9	1.9
8	8.3	4.4	1.2	22	8.47	7.1	1.9
9	7.75	8.7	2.9	23	8.2	3.6	4.8
10	6.18	11.9	1.2	24	8.58	6.1	0.4
11	6.96	14	2.2	25	7.07	11.2	4.3
12	8.42	11.7	0.2	26	7.65	11.1	8.1
13	8.51	9.3	0.8	27	8.72	4.6	1
14	8.12	9.9	2.4				

Los resultados de textura del suelo indicaron que los sitios 23, 25, 26 y 27 se caracterizaron por tener mayor porcentaje de limo fino; el sitio 9 se caracterizó por tener mayor porcentaje de limo mediano, mientras que el sitio 14 mayor porcentaje de limo grueso. Los sitios 7 y 11 presentaron mayor porcentaje de arena muy fina; mientras que sitios que se encontraban cerca de la costa, como es el caso de los

sitios: 1, 12, 15, 18 y 24 presentaron mayor porcentaje de arena fina. Los sitios 2, 8, 10 y 13 presentaron mayor porcentaje de arena mediana. Los sitios 3, 4, 5, 6, 11, 16, 17 y 21 presentaron mayor porcentaje de arena gruesa, y los sitios 20 y 22 fueron los que mostraron mayor porcentaje de arena muy gruesa (Tabla II).

Tabla II. Análisis de textura del suelo de los sitios de muestro, de acuerdo al porcentaje de tamaño de partícula

Sitio	Limo fino (8 – 16µ)	Limo Mediano (16 - 31µ)	Limo Grueso (31 - 62µ)	Arena muy fina (62 - 125µ)	Arena Fina (125-250µ)	Arena mediana (250 - 500µ)	Arena Gruesa (500 - 1000µ)	Arena muy gruesa (1000 - 2000µ)
1	6.35	4.48	9.18	17	20.23	16.62	15.34	2.57
2	8.16	5.65	6.9	13.97	19.43	20.43	15.6	4.56
3	5.04	3.57	5.07	10.47	14.73	20.94	25.64	7.88
4	15.63	5.94	3.71	6.38	10.44	18.62	22.16	2.39
5	12.11	8.56	6.91	8.41	9.00	13.17	20.67	12.34
6	14.73	11	12.98	13.64	9.27	12.32	15.86	1.38
7	13.27	10.87	13.02	17.56	16.39	12.97	8.6	1.59
8	6.22	5.51	6.11	10.72	19.95	20.62	13.68	11.04
9	14.47	18.03	17.98	10.69	5.39	5.42	9.26	11.38
10	7.35	8.15	13.54	17.59	15.75	17.67	15.59	0.42
11	8.04	8.77	10.85	10.78	8.91	12.02	22.82	10.04
12	5.12	3.11	4.31	12.35	32.97	32.88	6.96	0
13	6.53	5.98	9.03	15.5	19.13	21.36	16.85	1.41
14	16.17	19.69	21.04	15.35	10.18	11.18	2.3	0
15	8.17	7.13	10.2	16.04	20.44	20.29	12.23	0.4
16	3.55	2.93	3.41	5.11	7.65	13.81	30.99	20.54
17	3.12	2.77	3.72	4.99	6.56	10.45	41.54	13.67
18	10.06	11.86	15.77	17.01	21.11	17.2	2.61	0
19	12.34	12.38	14.18	14.47	11.65	12.09	13.72	2.67
20	2.3	2.43	3.99	5.43	10.05	16.16	20.31	25.22
21	3.69	2.74	2.69	2.63	3.79	9.68	31.88	26.79
22	5.38	5.45	5.76	6.51	7.12	6.85	12.71	31.97
23	20.67	15.55	13.56	11.76	7.97	5.76	8.7	4.37
24	6.67	6.74	11.59	19.15	26.97	18.53	6.88	0
25	15.58	15.31	15.29	11.09	6.5	8.0	12.88	6.57
26	17.64	14.82	17.77	16.17	8.49	6.6	7.33	2.32
27	35.99	23.53	11.39	7.06	6.38	2.87	0	0

7.2 Población de endófitos

Se encontró que las U.F.C., estuvieron en un rango de 3.04 a 5.33, en raíces de jojoba, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los sitios de muestreo en base a la prueba de Tukey (Fig. 5). En los sitios 13 y 19 se registró la mayor densidad de endófitos, mientras que en los sitios 8 y 20 presentaron las poblaciones más baja de endófitos.

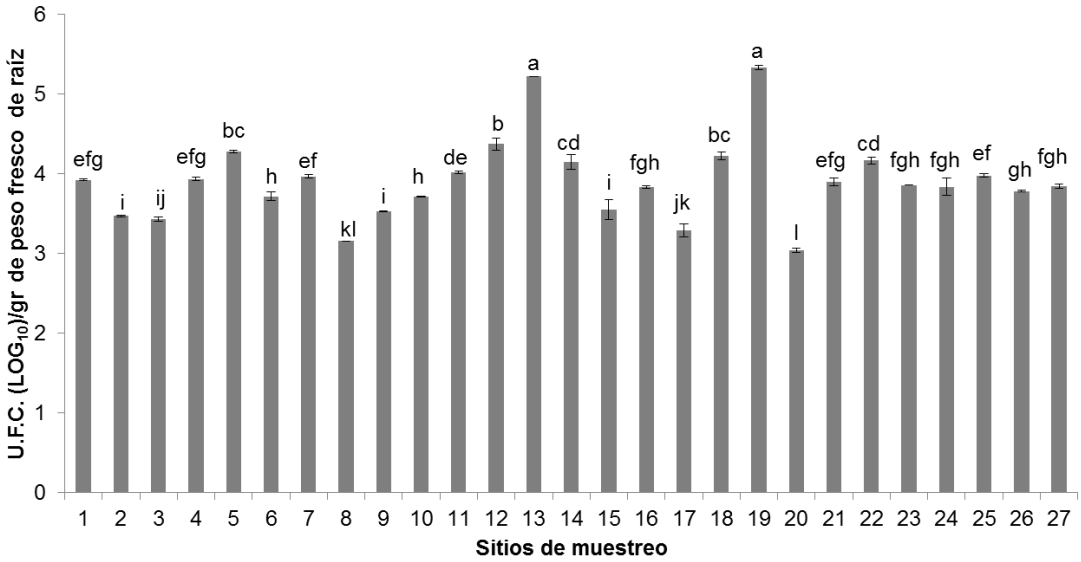

Figura 5. Población de bacterias endófitas en los sitios de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) prueba Tukey. Cada valor representa tres repeticiones en cada sitio de muestreo. Barras de error ± indican desviación estándar.

7.3 Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas

Basados en la diferencia morfológica colonial se obtuvo un total de 101 aislamientos diferentes, de los cuales 24 fueron identificados presuntivamente como actinomicetos de acuerdo a las características morfológica y tinción de Gram. En relación a la morfología celular se encontraron principalmente bacilos y cocobacilos de diferentes tamaños. Los resultados obtenidos de las pruebas para determinar si las cepas aisladas presentaban algún mecanismo de promoción de crecimiento en plantas, mostraron que todas las cepas presentaban al menos un mecanismo (Tabla III).

Tabla III. Caracterización de bacterias endófitas aisladas de raíces de jojoba.

Cepa	Sitio de colecta	Forma	Gram	Solubilización de fósforo	Fijación de nitrógeno	AIA (µg/mL)	Sideróforos	ACCD	Antagonismo
JRP1	5	Bacilos delgados	-	++	-	0.1	-	-	+
JRP2	5	Bacilos cortos	-	+	-	-	+	-	+
JRP3	5	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP4	4	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRP5	4	Bacilos delgados	-	+	+	5.4	+	-	-
JRP6	3	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP7	3	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP8	3	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP9	2	Bacilos cortos y delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP10	2	Bacilos delgados	-	+	+	3.2	+	+	+
JRP11	2	Bacilos largos	-	+	-	-	+	-	+
JRP12	1	Bacilos largos	-	+	+	0.3	+	+	+
JRP13	1	Bacilos medianos	-	+	-	-	+	-	+
JRP14	1	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP15	7	Bacilos delgados	-	+	-	-	-	-	-
JRP16	8	Cocobacilos	-	+	+	-	+	+	+
JRP17	8	Bacilos medianos	-	+	-	-	+	-	-
JRP18	9	Bacilos medianos	-	+	+	0.4	+	+	-
JRP19	9	Bacilos largos y delgados	-	+	-	4.25	+	-	+
JRP20	9	Bacilos cortos	-	+	-	0.4	+	-	+
JRP21	11	Bacilos pequeños	-	+	-	0.6	-	-	-
JRP22	11	Bacilos largos	-	+	+	0.19	+	+	-
JRP23	12	Bacilos largos	-	+	+	0.1	+	+	+
JRP24	12	Bacilos pequeños	-	+	+	0.9	-	+	-
JRP25	12	Bacilos largos	-	+	+	0.6	-	+	-
JRP26	9	Bacilos pequeños	-	+	+	0.1	-	+	+
JRP27	9	Bacilos medianos	-	+	+	-	-	+	+
JRP28	13	Bacilos pequeños	-	++	-	0.8	-	-	-
JRP29	13	Bacilos pequeños	-	+	-	0.1	-	-	+
JRP30	14	Bacilos pequeños	-	+	+	-	-	+	-
JRP31	14	Bacilos pequeños	-	+	+	-	-	+	-
JRP32	15	Bacilos largos	-	+	-	0.18	-	-	-
JRP33	16	Bacilos pequeños	-	+	-	0.21	-	-	+

Continuación de Tabla III…

Cepa	Sitio de colecta	Forma	Gram	Solubilización de fósforo	Fijación de nitrógeno	AIA (µg/mL)	Sideróforos	ACCD	Antagonismo
JRP34	16	Bacilos largos	-	+	+	0.21	-	+	-
JRP35	17	Bacilos medianos	-	+	+	0.17	+	+	-
JRP36	18	Bacilos medianos	-	+	+	0.1	+	+	-
JRP37	18	Bacilos largos	-	+	+	0.8	-	+	+
JRP38	19	Bacilos largos	-	+	+	0.3	-	+	+
JRP39	20	Bacilos largos	-	++	+	0.1	+	+	+
JRP40	20	Bacilos largos	-	+	+	-	+	+	-
JRP41	21	Bacilos largos	-	+	-	-	+	-	-
JRP42	22	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRP43	22	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRP44	25	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRP45	25	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRP46	27	Bacilos largos	-	+	+	-	-	+	-
JRP47	27	Bacilos largos	-	+	-	-	-	-	-
JRR1	2	Bacilos pequeños	-	-	+	0.3	+	+	+
JRR2	2	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR3	4	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR4	5	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR5	6	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR6	6	Bacilos pequeños	-	+	+	0.12	+	-	-
JRR7	6	Bacilos pequeños	-	-	+	0.3	-	-	+
JRR8	7	Bacilos pequeños	-	+	+	0.4	-	-	+
JRR9	8	Bacilos largos	-	-	+	-	-	+	+
JRR10	9	Bacilos pequeños	-	+	+	-	+	-	+
JRR11	9	Bacilos pequeños	-	+	+	0.28	-	+	+
JRR12	10	Bacilos delgados	-	+	+	0.4	+	-	+
JRR13	12	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR14	14	Bacilos delgados	-	-	+	-	+	-	-
JRR15	15	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR16	15	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR17	16	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR18	17	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR19	18	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-

Continuación de Tabla III…

Cepa	Sitio de colecta	Forma	Gram	Solubilización de fósforo	Fijación de nitrógeno	AIA (µg/mL)	Sideróforos	ACCD	Antagonismo
JRR20	20	Bacilos pequeños	-	+	+	0.1	-	+	-
JRR21	20	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR22	20	Bacilos pequeños	-	+	+	0.3	+	+	+
JRR23	21	Bacilos pequeños	-	-	+	-	-	-	-
JRR24	22	Bacilos pequeños	-	-	+	0.12	-	-	-
JRR25	23	Bacilos pequeños	-	-	+	0.4	-	-	+
JRR26	24	Bacilos pequeños	-	-	+	0.7	+	-	+
JRR27	24	Bacilos pequeños	-	+	+	-	-	-	-
JRR28	24	Bacilos pequeños	-	-	+	0.8	-	-	+
JRR29	25	Bacilos pequeños	-	+	+	0.22	+	-	+
JRR30	26	Bacilos pequeños	-	-	+	0.5	-	-	-
JRA1	1	Bacilos ramificados	+	+	+	0.18	-	+	-
JRA2	1	Bacilos ramificados	+	-	-	0.7	-	+	-
JRA3	1	Bacilos ramificados	+	+	-	0.17	+	-	+
JRA4	1	Bacilos ramificados	+	+	+	0.6	+	+	-
JRA5	1	Bacilos ramificados	+	-	-	0.13	-	+	-
JRA6	5	Bacilos ramificados	+	+	-	0.8	-	-	-
JRA7	9	Bacilos ramificados	+	+	-	0.7	+	-	+
JRA8	10	Bacilos ramificados	+	+	+	0.3	-	+	-
JRA9	12	Bacilos ramificados	+	+	-	0.6	-	-	-
JRA10	12	Bacilos ramificados	+	+	+	0.21	-	+	+
JRA11	12	Bacilos ramificados	+	-	-	0.9	+	+	+
JRA12	14	Bacilos ramificados	+	-	-	0.8	-	-	-
JRA13	15	Bacilos ramificados	+	-	-	-	-	-	-
JRA-14	17	Bacilos ramificados	+	+	-	0.5	+	-	+
JRA15	16	Bacilos ramificados	+	-	-	-	-	-	-
JRA16	21	Bacilos ramificados	+	+	-	-	-	-	+
JR-17	21	Bacilos ramificados	+	+	-	0.4	-	-	+
JRA18	20	Bacilos ramificados	+	-	-	0.8	-	-	+
JRA19	21	Bacilos ramificados	+	+	-	0.1	-	-	+
JRA20	26	Bacilos ramificados	+	+	-	0.7	-	-	-

Continuación de Tabla III…

Cepa	Sitio de colecta	Forma	Gram	Solubilización de fósforo	Fijación de nitrógeno	AIA (µg/mL)	Sideróforos	ACCD	Antagonismo
JRA21	26	Bacilos ramificados	+	-	-	-	-	-	-
JRA22	27	Bacilos ramificados	+	-	-	-	-	-	-
JRA23	27	Bacilos ramificados	+	+	-	0.4	-	-	-
JRA24	27	Bacilos ramificados	+	-	-	0.3	-	-	-

7.3.1 Solubilización de fósforo *in vitro*

Para determinar la capacidad de las cepas para solubilizar fosfato se utilizó un medio que contenía $Ca_3(PO_4)_2$ como única fuente de fósforo. De los 101 aislamientos sólo 56 bacterias y 10 actinomicetos crecieron bien en este medio, formando un halo de solubilización alrededor de las colonias (Fig. 6), de las cuales las cepas JRP1, JRP28 y JRP39 presentaron el mayor halo de solubilización (Tabla III).

Figura 6. Halo de solubilización producido por las cepas JRP1y JRP2.

7.3.2 Fijación de nitrógeno

En la prueba de fijación de nitrógeno sólo 51 bacterias y 4 actinomicetos fueron capaces de crecer y formar una película en el medio libre de nitrógeno semisólido afirmando su capacidad de fijar nitrógeno (Fig. 7, Tabla III).

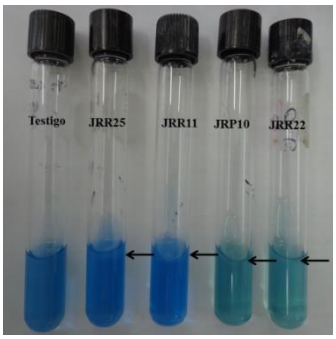

Figura 7. Crecimiento de las cepas en medio semisólido libre de nitrógeno. Flechas indican la formación de una película.

7.3.3 Producción de AIA

La capacidad de producción de auxinas, fue positiva en 37 cepas de bacterias y 19 actinomicetos. Entre estas la mayor producción fue observada en las cepas JRP 5, JRP 10, JRP19 (Fig. 8, Tabla III).

Figura 8. Producción de ácido indol-acético; el color rosa muestra la producción de la hormona.

7.3.4 Producción de sideróforos

La producción de siderófos se realizó en el medio CAS. Un total de 38 cepas de bacterias y 5 actinomicetos, formaron un halo alrededor de las colonias en este

medio, por lo que se considera como producción de sideróforo positiva (Fig. 9, Tabla III).

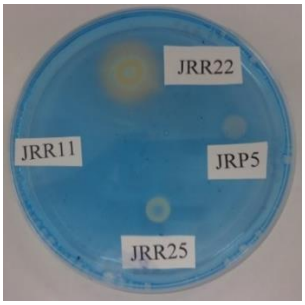

Figura 9. Halo alrededor de la colonia indica que la bacteria produce sideróforos.

7.3.5 Actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa

De un total de 101 cepas endófitas asociadas a las raíces de jojoba, sólo 31 cepas de bacterias y 7 actinomicetos crecieron en medio de agar DF modificado con ACC (Fig. 10), lo que indica que tienen la actividad de la enzima ACC desaminasa (Tabla III).

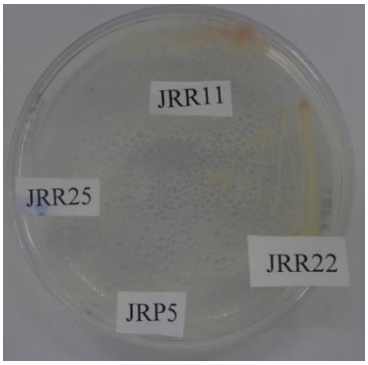

Figura 10. Prueba de producción de ACC-desaminasa, si la bacteria crece en el medio se toma como positiva.

7.3.6 Actividad antagonista

En relación a la actividad antagonista 39 cepas de bacterias y 9 actinomicetos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Alternaria* sp. (Fig. 11) del total de

bacterias solo 10 presentaron la mayor inhibición en el crecimiento del hongo patógeno (Tabla III).

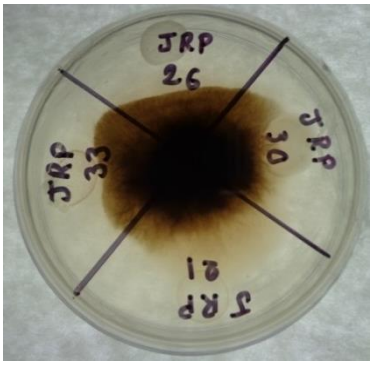

Figura 11. Confrontación de las bacterias endófitas contra el hongo *Alternaria* sp.

7.4 Identificación de las cepas aisladas

De todos los aislamientos, sólo ocho presentaron el mayor número de características para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. La identificación se realizó a través de 16S rRNA. Los aislamientos bacterianos fueron identificados como especies de los géneros *Bacillus, Methylobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Oceanobacillus* (Tabla IV).

Tabla IV. Identificación de 8 cepas bacterianas aisladas en raíces de jojoba. Se utilizó la secuenciación parcial de la región 16S rRNA.

Cepa	Orden	Identificación	GenBank Accession No.
JRP5	Bacillales	*Bacillus* sp.	KT964149
JRP12	Bacillales	*Bacillus* sp.	KR815510
JRP19	Bacillales	*Bacillus* sp.	KT964150
JRP39	Bacillales	*Bacillus* sp.	KR815511
JRR22	Rhizobiales	*Methylobacterium aminovorans*	KT964148
JRR11	Actinimycetales	*Rhodococcus pyridinivorans*	KT985910
JRA3	Actinimycetales	*Streptomyces sp.*	KT964152
JRA8	Bacillales	*Oceanobacillus kimchii*	KT964151

El análisis filogenético ubicaron a los aislados JRP5, JRP12, JRP19 y JRP39, en el clado de los *Bacillus*, con un valor soportado de hasta el 97%, mientras que la cepa JRR22 presento mayor similitud con *Methylobacterium aminovorans.* Las cepas JRR11 y JRA 3 pertenecen al orden de los Actinimycetales, la cepa JRA8, pertenece al género *Oceanobacillus,* mismo que se encontró cerca al clado de los *Bacillus* (Fig. 12). Así mismo se observa la formación de 6 grupos.

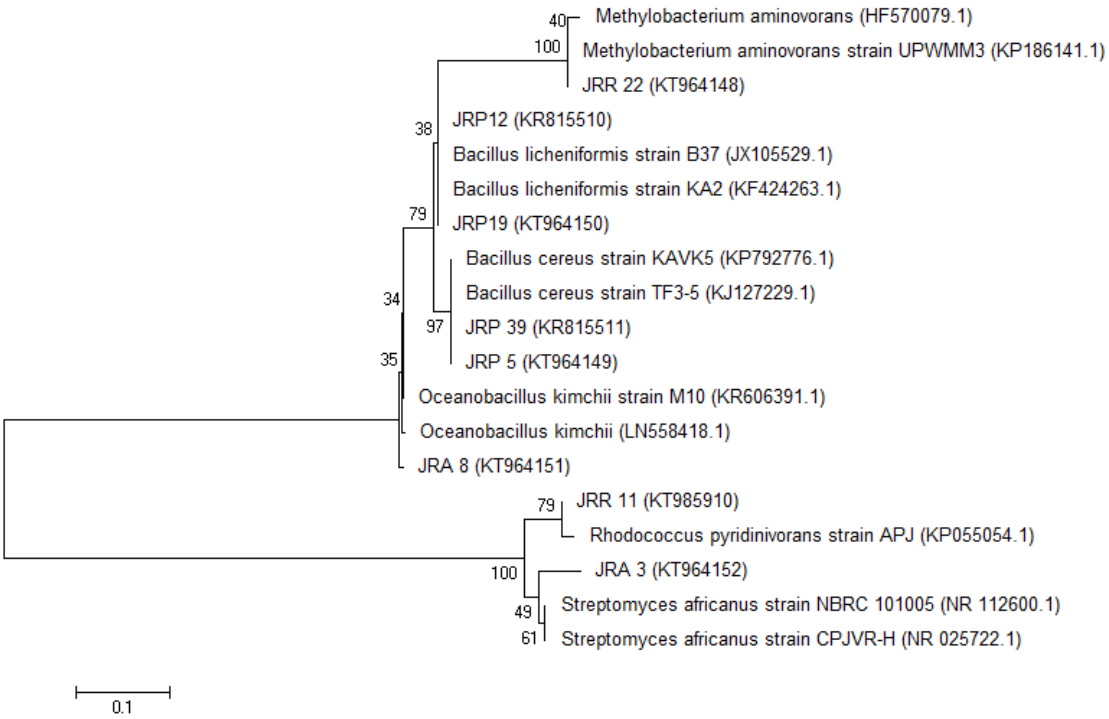

Figura 12. Filogenia de bacterias endófitas de *S. chinensis* por secuencias de 16S rRNA. Los números en los nodos indican el nivel de apoyo de arranque, con base en el análisis de vecino más cercano. La barra de escala indica 0.1 tasas de cambio.

7.5 Cinéticas de crecimiento

Cada una de las 8 cepas seleccionadas con el mayor número de características de promoción de crecimiento en plantas; fueron inoculadas en cultivos *in vitro* de jojoba, para observar su efecto en las plantas, pero sólo dos de estas cepas presentaron resultados positivos en el crecimiento de las plantas. A

estas dos cepas, se les realizaron cinéticas de crecimiento. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa *M. aminovorans* (JRR 22) a las 12 h mostró un crecimiento acelerado, pero hasta las 56 h su crecimiento disminuyó, a las 72 h su crecimiento fue mínimo (Fig. 13 A). La cepa *R. pyridinivorans* (JRR11), presentó un crecimiento más rápido que JRR22, aunque también su crecimiento disminuyo a las 56 h, a las 72h fue mínimo (Fig. 13 B).

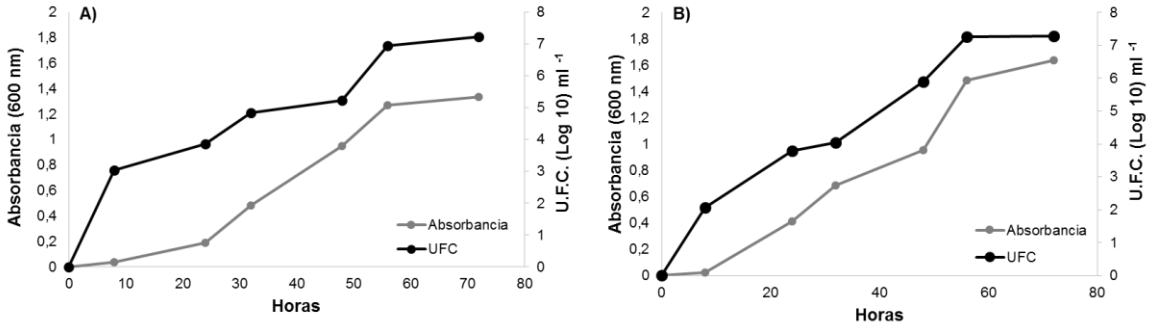

Figura 13. Cinéticas de crecimiento. Cepas cultivadas en medio mínimo con 0.5% de metanol A) *M. aminovorans* (JRR22), B) *R. pyridinivorans* (JRR11).

7.6 Etapa *in vitro* de jojoba

En relación a la altura de planta en los cultivos *in vitro* de jojoba, se observó que en plantas femeninas y masculinas no se encontraron diferencias significativas de acuerdo a la prueba *t* ($p \leq 0.05$) (Fig. 14). Sin embargo, en el número de brotes por explante, las plantas de sexo masculino presentaron el mayor número de brotes por planta (4.3±0.48), encontrando diferencias significativas de acuerdo a la prueba *t*, con respecto a las plantas femeninas (2.1±0.56) ($p \leq 0.05$) (Fig. 14).

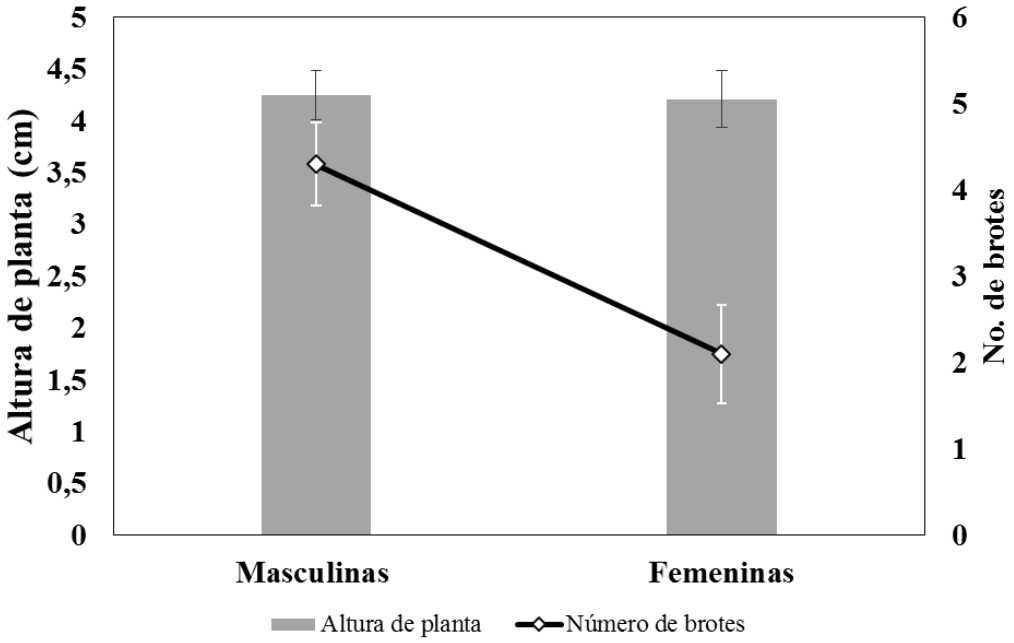

Figura 14. Cultivos *in vitro* de jojoba en la etapa de multiplicación. n=10 plantas, letras minúsculas diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$), de altura de planta, de acuerdo a la prueba *t* de Student en altura de plantas; letras mayúsculas diferencias significativas ($p \leq 0.05$), de número de brotes, de acuerdo a la prueba de *t* de Student en número de brotes.

7.6.1 Etapa de enraizamiento

A los 45 días, cuando se obtuvo el mayor número de brotes, las plantas fueron colocadas en el medio de enraizamiento (RIM), fue en este paso donde se realizó la inoculación de las cepas seleccionadas. Después de 60 días se evaluó la altura de la planta y longitud de raíz. Los resultados obtenidos demostraron que la inoculación con las cepas *A. brasilense* (Cd) *M. aminovorans* (JRR 22) y *R. pyridinivorans* (JRR 11) y la combinación entre JRR11 y JRR22, incrementaron el crecimiento en plantas y la longitud de raíces de jojobas con respecto al control, tanto en plantas del sexo femenino como el sexo masculino (Tabla V).

Tabla V. Altura de brotes y raíces de plantas femeninas y masculinas de jojoba inoculadas con suspensión de bacterias en condiciones *in vitro.*

Sexo	Tratamientos	Altura de las plantas (cm)	Longitud de la raíz (cm)
Masculino	Control	2.4 ± 0.22 b	2.4 ± 0.21 b
	Cd	4.02 ± 0.43 a	4.02 ± 0.18 a
	JRR22+JRR11	4.12 ± 0.25 a	4.12 ± 0.13 a
	JRR22	4.24 ± 0.32 a	4.38 ± 0.08 a
	JRRb11	4.38 ± 0.27 a	4.24 ± 0.08 a
Femenino	Control	3.2 ± 0.13 B	4.12 ± 0.13 C
	Cd	4.86 ± 0.11 A	4.54 ± 0.11 B
	JRR22+JRR11	4.38 ± 0.18 A	5 ± 0.18 A
	JRR22	5 ± 0.2 A	5.2 ± 0.2 A
	JRR11	4.92 ± 0.30 A	5.04 ± 0.30 A

Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos del sexo masculino y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos del sexo femenino ($p \leq 0.05$ por Tukey).

7.6.2 Clorofila α, β, total y carotenoides en etapa de enraizamiento

En la etapa de enraizamiento *in vitro*, en los análisis de clorofila α se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey), entre las plantas que fueron inoculadas y el control; así mismo, la mayor concentración de clorofilas fue en plantas masculinas inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) (Figs. 15 A, B y C). En relación a la concentración de clorofila β y clorofila total, las plantas masculinas inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) presentaron mayor concentración de estos pigmentos en comparación con el control (Figs.15 B y C) ($p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey).

Los carotenoides en plantas inoculadas presentaron mayor concentración en comparación con el control ($p \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba Tukey), sin embargo las plantas femeninas co-inoculas con la cepa *M. aminovorans* y *R. pyridinivorans*, (JRR22 y JRR11) presentaron la mayor concentración (Fig.15 D).

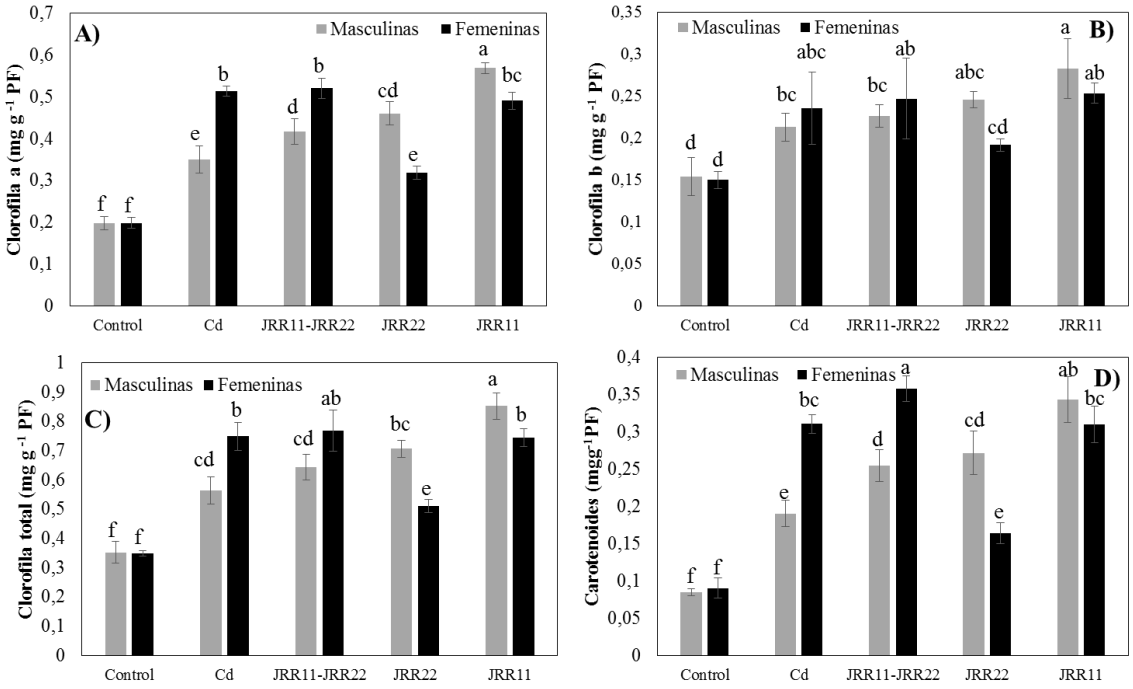

Figura 15. Datos de la concentración de clorofila α (A), clorofila β (B), clorofila total (C), carotenoides (D) en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p≤0.05).

7.6.3 Actividad enzimática en la etapa de enraizamiento

La actividad de la enzima SOD en hojas de plantas inoculadas con la cepa *M. aminovorans* (JRR22) presentaron mayor actividad en comparación con el control, tanto en plantas femeninas como en masculinas (de acuerdo con la prueba Tukey $p \leq 0.05$) (Fig. 16 A). En raíces, el tratamiento control de las plantas femeninas presentó la mayor actividad de esta enzima, encontrando diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos (de acuerdo con la prueba Tukey $p \leq 0.05$) (Fig. 16 B).

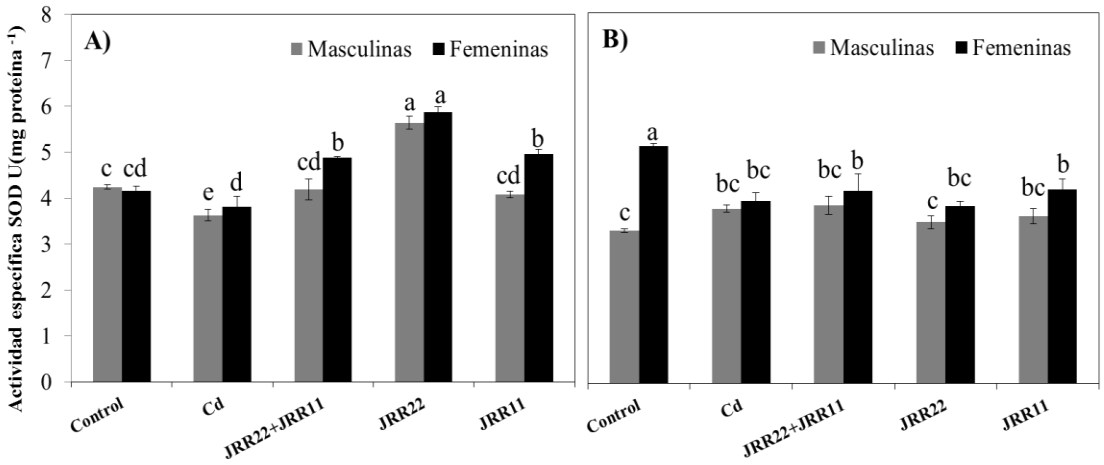

Figura 16. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La actividad de la enzima CAT fue más alta en hojas que en raíces (Fig. 17 A y 17 B). En hojas la mayor actividad de esta enzima se presentó en el tratamiento inoculado con la cepa de *A. brasilense* (Cd) de plantas femeninas, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. Mientas que la menor actividad se presentó en el tratamiento donde se realizó co- inoculación en plantas de ambos sexos. En raíces la actividad enzimática fue mayor en plantas femeninas que en masculinas, excepto en el tratamiento donde se inoculó la cepa *M. aminovorans* (JRR22) encontrando diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Fig. 17 B).

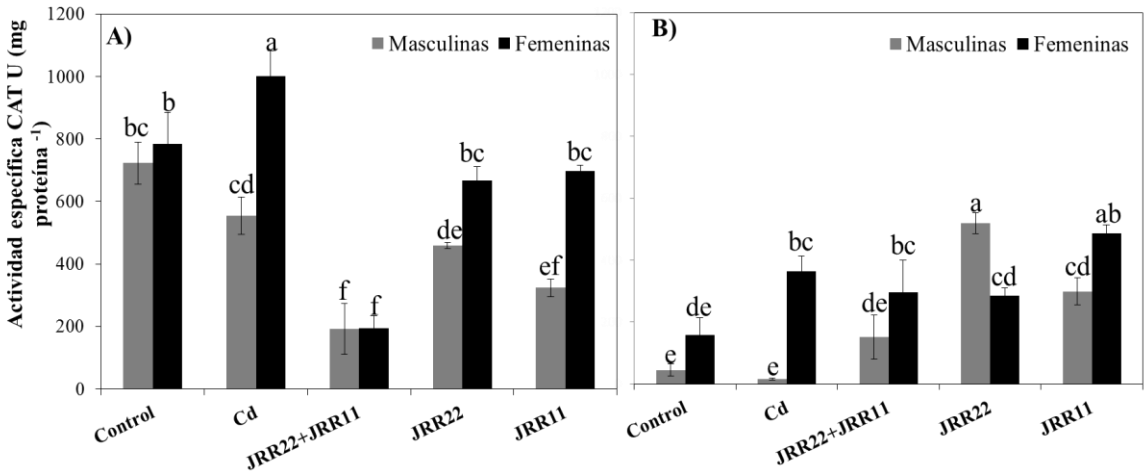

Figura 17. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La actividad de la enzima POX en hojas, presentó mayor actividad en el tratamiento donde se realizó la co-inoculación en plantas de ambos sexos, mientras que el control de plantas masculinas presentó la menor actividad enzimática encontrando diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Fig. 18 A). En raíces, las plantas femeninas que fueron co-inoculadas presentaron la mayor actividad enzimática, mientras que, las plantas inoculadas con las cepas JRR11 y JRR22 por separado, presentaron la actividad enzimáticas más baja; encontrando diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). En plantas masculinas la actividad más alta fue en el control, y los tratamientos donde se inocularon las cepas *A. brasilense* (Cd) y *M. aminovorans* (JRR22); la actividad más baja se registró en el tratamiento donde se inoculó la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) (Fig. 18 B).

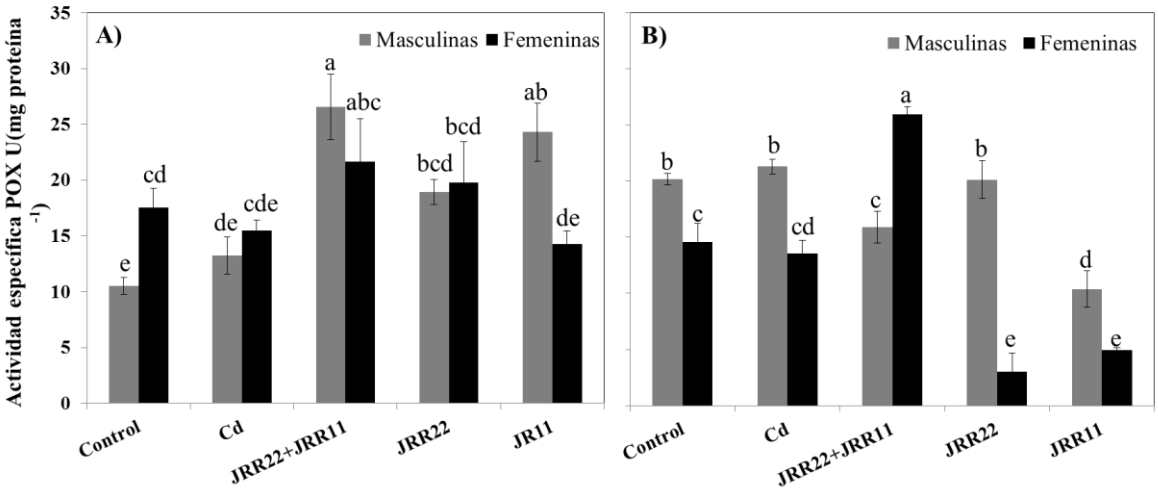

Figura 18. Actividad de la enzima peroxidasa (POX) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En hojas y raíces de jojoba, se encontró que la actividad de la enzima APx, fue mayor en plantas masculinas que en plantas femeninas, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey (Fig. 19 A y 19 B). En hojas, el tratamiento donde se realizó la co-inoculación presentó la mayor actividad de esta enzima en plantas de ambos sexos, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey (Fig. 19 B). Mientras que en raíces de plantas masculinas mostraron mayor actividad enzimática en el tratamiento donde se realizó la co-inoculación, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey. En plantas femeninas el tratamiento donde se inoculó la cepa *A. brasilense* (Cd) se observó la mayor concentración, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 19 B).

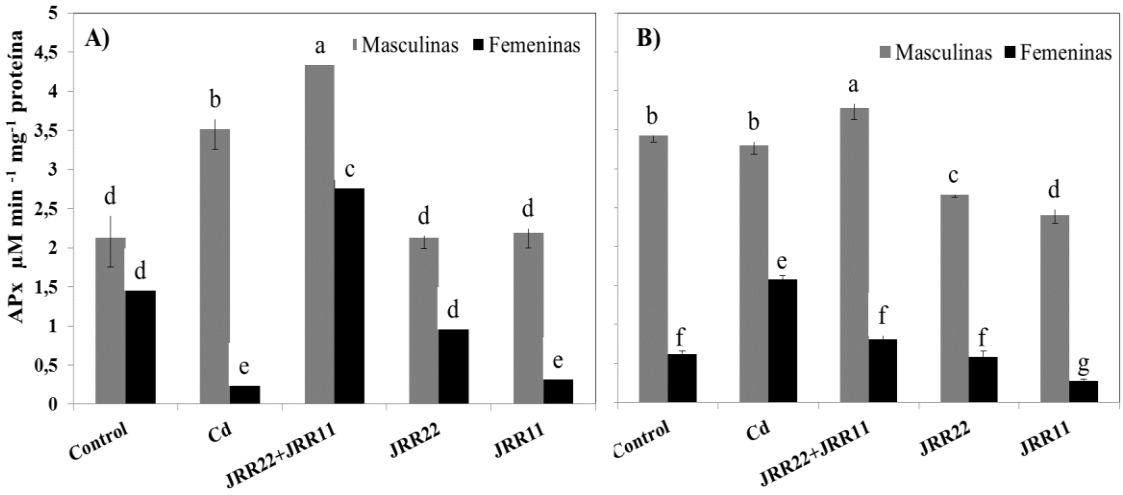

Figura 19. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APx) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La actividad de la enzima PAL en hojas fue menor en los tratamientos en los cuales se inoculó alguna bacteria, excepto en plantas femeninas inoculadas con la cepa *M. aminovorans* (JRR22) (Fig. 20 A). En raíces, las plantas femeninas que fueron inoculadas tuvieron una mayor actividad de la enzima PAL, excepto las plantas donde se realizó la co-inoculación (Fig. 20 B), mientras que en plantas masculinas el tratamiento donde se realizó la co-inoculación registró la mayor actividad encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey.

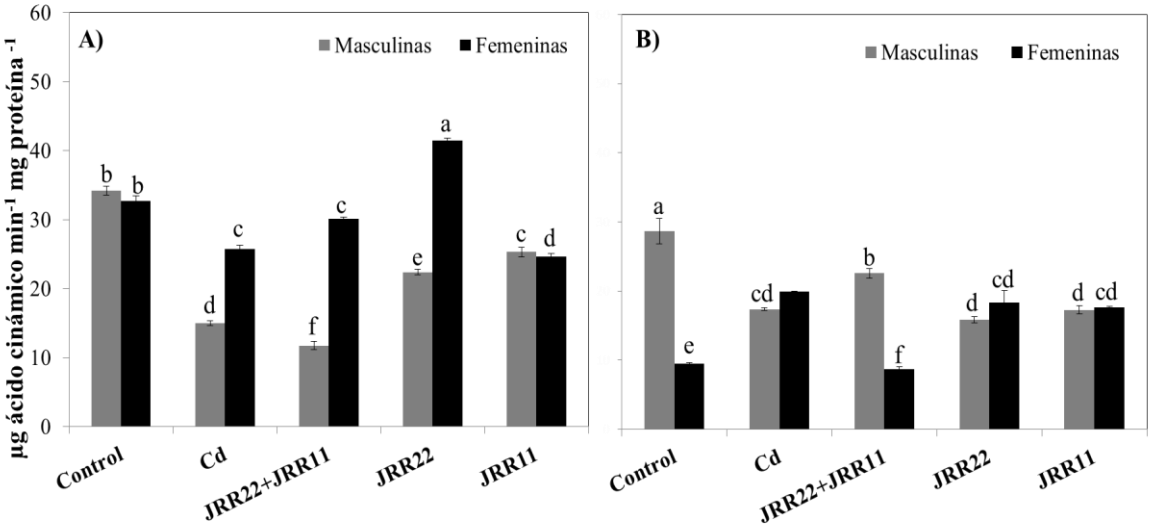

Figura 20. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de enraizamiento inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n = 5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.7 Etapa de pre-aclimatación

Después de un período de 60 días de cultivo *in vitro* las plantas fueron transferidas a la etapa de pre-aclimatación, donde se evaluó altura de las plantas y longitud de raíz (Fig. 21).

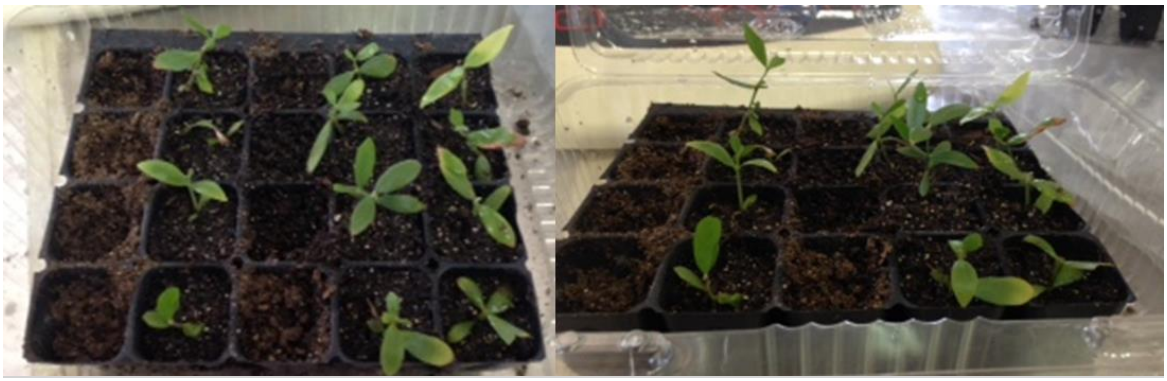

Figura 21. Plantas de jojoba en etapa de pre-aclimatación.

7.7.1 Parámetros de crecimiento

Los resultados obtenidos en la altura de las plantas, confirmaron que la inoculación de bacterias endófitas aumentó el crecimiento de jojoba, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey; entre el control y las plantas inoculadas, tanto en plantas femeninas como masculinas. La longitud de raíz aumentó en plantas inoculadas, en comparación con plantas no inoculadas, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VI). En el tratamiento donde se realizó la co-inoculación se observó la mayor altura de las plantas y longitud de raíz de plantas de ambos sexos.

Tabla VI. Altura de plantas y raíces de plantas femeninas y masculinas de jojoba inoculadas con suspensión de bacterias en condiciones de pre-aclimatación.

Sexo	Tratamientos	Altura de las plantas (cm)	Longitud de la raíz (cm)
Masculino	Control	4.2 ± 0.21 b	4.8 ± 0.35 c
	Cd	5.24 ± 0.27 a	5.62 ± 0.08 b
	JRR11+JRR22	5.48 ± 0.13 a	6.37 ± 0.06 a
	JRR22	5.14 ± 0.38 a	5.78 ± 0.08 b
	JRR11	5.12 ± 0.10 a	5.9 ± 0.2 b
Femenino	Control	4.22 ± 0.22 B	5.58 ± 0.13 D
	Cd	4.62 ± 0.23 B	5.94 ± 0.08 C
	JRR11+JRR22	5.38 ± 0.35 A	6.7 ± 0.12 A
	JRR22	5.16 ± 0.15 A	6.44 ± 0.13 B
	JRR11	5.2 ± 0.18 A	6.5 ± 0.12 AB

Letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos del sexo masculino y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos del sexo femenino ($p \leq 0.05$ por prueba Tukey).

7.7.2 Clorofila α, β total y carotenoides en etapa de pre-aclimatación

De acuerdo a los resultados obtenidos en la concentración de clorofila α, β y total se observó que las plantas masculinas presentaban mayor concentración en comparación con las plantas femeninas, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey. En el análisis de la clorofila α, las plantas co-inoculadas presentaron mayor concentración de este pigmento en comparación con

el control (Fig. 22 A). El tratamiento donde se realizó la co-inoculación registro los valores más altos en clorofila β, de plantas masculinas (Fig. 15 A).

En relación a la clorofila total, los tratamientos donde fueron inoculados por bacterias presentaron los valores más altos en comparación con el control, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey. En plantas femeninas y masculinas, el tratamiento donde se realizó la co-inoculación de las cepas JRR11 y JRR22 obtuvieron la mayor concentración en comparación con el control (Fig. 22 C). En relación a la concentración de carotenoides, las plantas inoculadas presentaron mayor concentración en comparación con el control, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 22 D). En plantas masculinas las plantas inoculadas con la cepa JRR11 registro el valor más alto, mientras que en plantas femeninas, el tratamiento donde se realizó la co-inoculación registró el valor más alto.

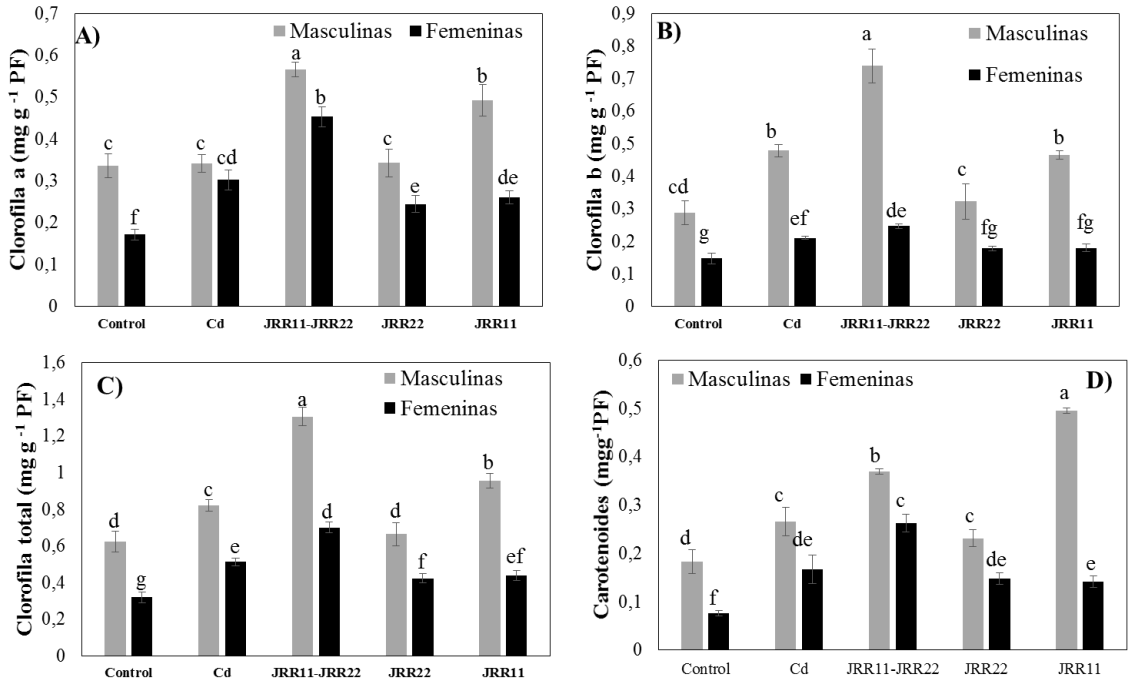

Figura 22. Análisis en la concentración de clorofila α (A), clorofila β (B), clorofila total (C), carotenoides (D) en etapa de pre-aclimatación inoculados con bacterias endófitas. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.7.3 Actividad enzimática en la etapa de pre-aclimatación

La actividad de la enzima SOD disminuyó en comparación a la etapa de enraizamiento, tanto en hojas como en raíces. En la etapa de pre-aclimatación los tratamientos que registraron la mayor actividad enzimática en hojas fueron donde se realizó la co-inoculación en plantas de ambos sexos; el tratamiento que fue inoculado con la cepa *M. aminovorans* (JRR22) en plantas femeninas y los tratamientos controles de ambos sexos; encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey con los otros tratamientos (Fig. 23 A). En raíces, las plantas masculinas presentaron mayor actividad. Mientras que el tratamiento control de plantas masculinas presentó la mayor actividad, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey. No obstante, dentro de los tratamientos inoculados de plantas masculinas, el tratamiento donde se realizó la co-inoculación registró la mayor actividad (Fig. 23 B).

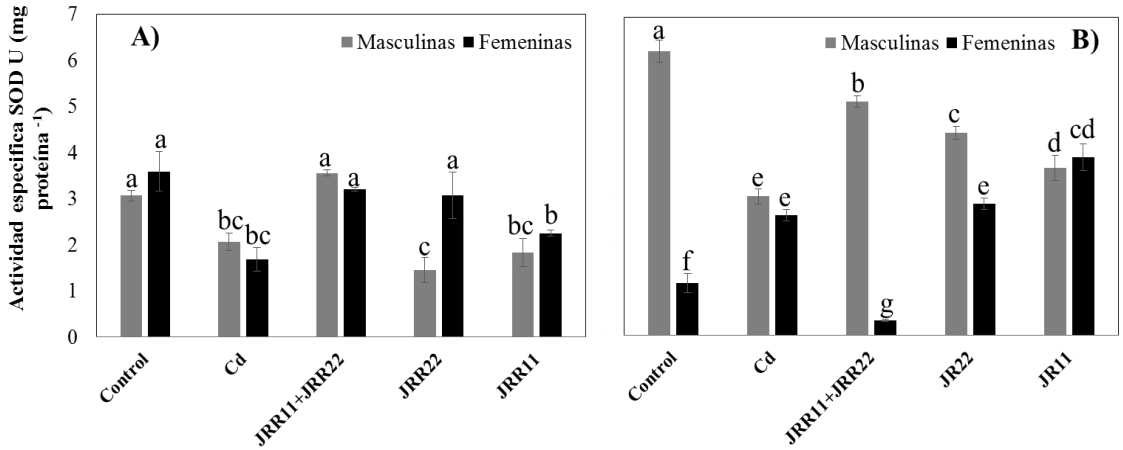

Figura 23. Actividad de la enzima superoxido dismutasa (SOD) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

De igual manera como sucedió en la etapa de enraizamiento, la actividad de la CAT fue más alta en hojas que en raíces. Además los tratamientos: control, y los

inoculados por las cepa *A. brasilense* (Cd) y *M. aminovorans* (JRR22) de plantas masculinas presentaron mayor actividad en hojas tanto en las etapas de pre-aclimatación y de enraizamiento (Fig. 24 A). En raíces la actividad de la enzima CAT fue menor en comparación con hojas, los tratamientos inoculados con *A. brasilense* (Cd) y donde se realizó la co-inoculación de plantas masculinas presentaron la mayor actividad, encontrando diferencias significativas en los otros tratamientos ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 24 B).

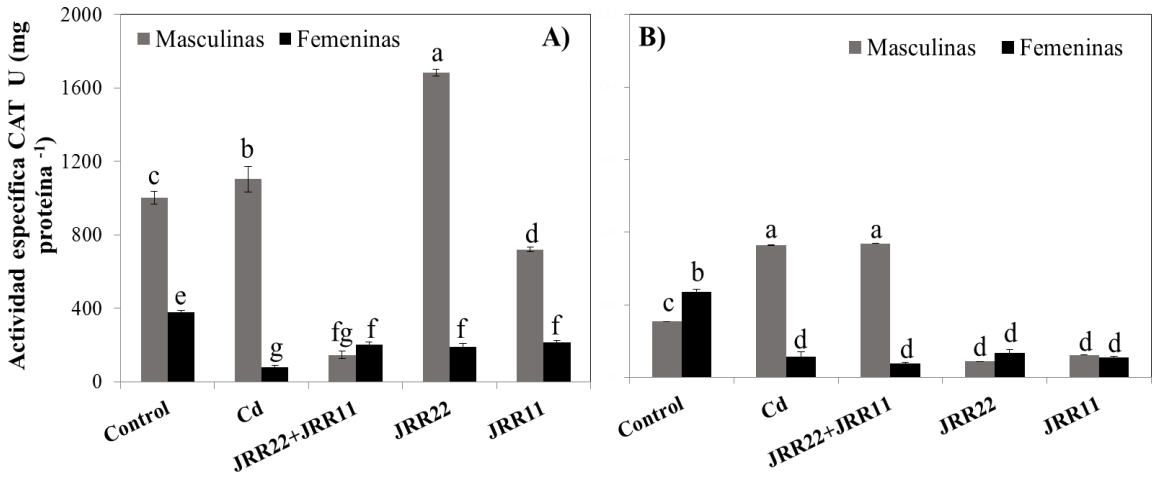

Figura 24. Actividad de la enzima catalasa (CAT) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

La actividad de la enzima POX en hojas fue mayor en plantas masculinas que en plantas femeninas; el tratamiento donde se inoculó la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11), registró la mayor actividad, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey, en comparación con los otros tratamientos (Fig. 25 A). En raíces la actividad enzimática fue menor en comparación con hojas; sin embargo el tratamiento donde se realizó la co-inoculación de plantas de ambos sexos presentó la mayor actividad, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los otros tratamientos de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 25 B).

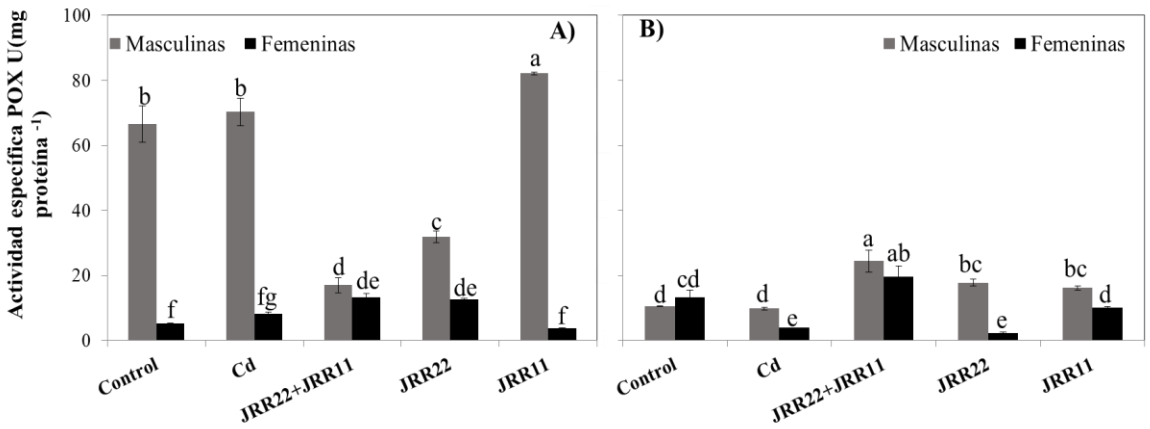

Figura 25. Actividad de la enzima peroxidasa (POX) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq <0.05$). Entre la inoculación de bacterias por cada órgano analizado.

La actividad de la APx, disminuyó en la etapa de pre-aclimatación comparado con la etapa de enraizamiento. En hojas, la actividad de esta enzima fue mayor en plantas del sexo masculino que femenino, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey. Sin embargo, el tratamiento donde se inoculó la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) presentó la mayor actividad (Fig. 26 A). En raíces la actividad de la APx fue mayor en plantas de sexo masculino que femenino. El tratamiento control fue donde se encontró la mayor actividad con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 26 B).

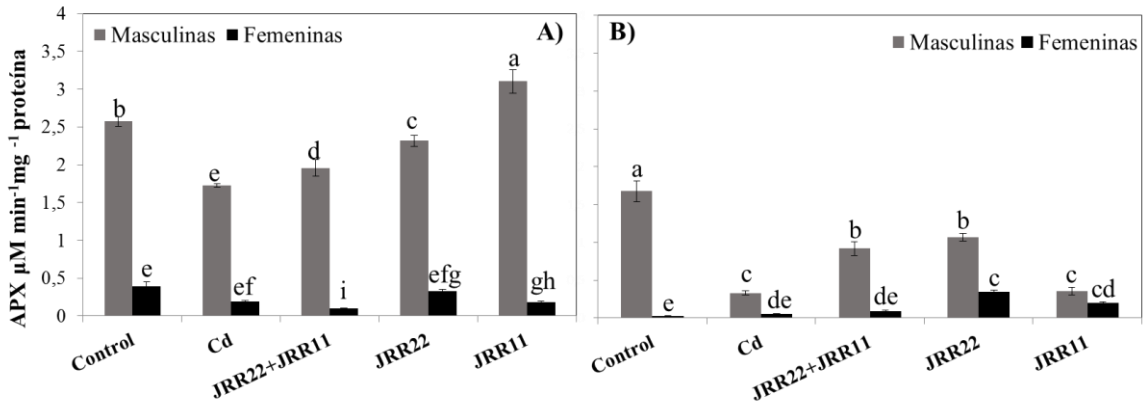

Figura 26. Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En la actividad de la enzima PAL en hojas, se encontró que las plantas masculinas inoculadas con las cepas *A. brasilense* (Cd) y *R. pyridinivorans* (JRR11), fue la mayor actividad; mientras que en plantas femeninas con los mismos tratamientos la actividad de esta enzima fue la menor registrada, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 27 A). En raíces la actividad fue menor en comparación con hojas; el tratamiento control de plantas masculinas, presentó mayor actividad, observando diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 27 B).

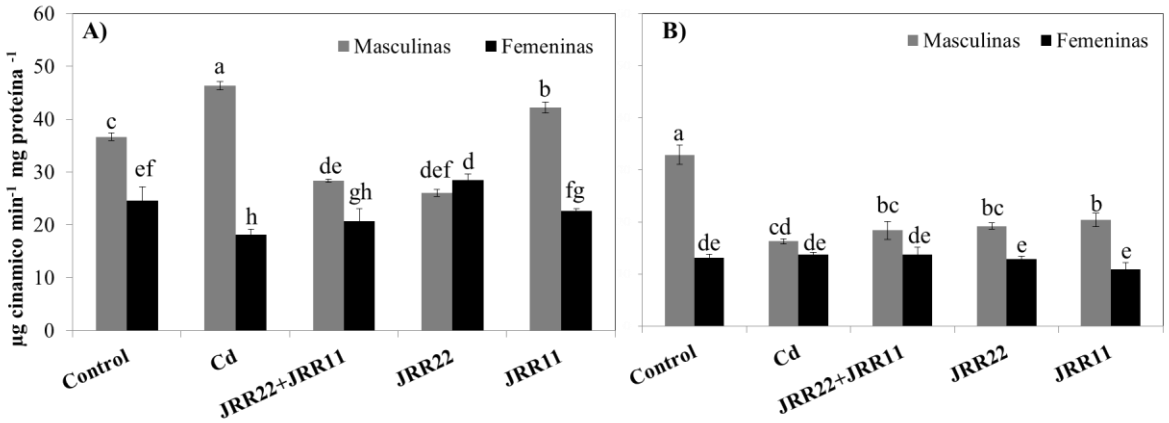

Figura 27. Actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) de plantas femeninas y masculinas de jojoba en etapa de pre-aclimatación, inoculadas con bacterias endófitas. A) análisis en hojas, B) análisis en raíces. Los valores son las medias ± D.E. (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.8 Cortes histológicos de etapa *in vitro* y pre-aclimatación

Las plantas de jojoba en etapa de enraizamiento *in vitro*, presentaron una longitud de la epidermis adaxial con valores de 10. 22 a 15.21 µm (Tabla VII). Las plantas femeninas inoculadas presentaron mayor longitud de la epidermis adaxial, en comparación con plantas masculinas, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 28). Plantas masculinas y femeninas inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) registraron el valor más alto en este parámetro. En la longitud de la epidermis abaxial, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey entre plantas masculinas y femeninas. En plantas masculinas se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con JRR22 y control ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VII). Sin embargo, en plantas femeninas donde se realizó la co-inoculación, presento la mayor longitud de la epidermis abaxial, observando diferencias significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba Tukey (Fig. 29).

Tabla VII. Análisis morfométrico de cortes histológicos de hojas de plantas de jojoba en etapa de enraizamiento *in vitro* y pre-aclimatación: control e inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Etapa	Sexo	Tratamientos	Epidermis adaxial (µm)[a]	Epidermis abaxial (µm) [a]	Parénquima empalizado (µm) [a]	Parénquima esponjoso (µm) [a]
Enraizamiento *in vitro*	Masculino	Control	11.87 ±1.52 cde	12.58 ± 1.38ab	108.01 ± 5.944a	145.23 ± 5.58a
		Cd	11.42 ±1.34de	12.28 ± 1.84ab	91.52 ± 5.54d	115.88 ± 4.10c
		JRR11+JRR22	11.70 ±1.39cde	12.07 ± 1.58ab	68.99 ± 5.48f	66.21 ± 4.59g
		JRR22	10.22 ± 1.26f	10.79 ± 1.49d	96.71 ± 4.07bc	91.28 ± 5.90e
		JRR11	12.53 ± 1.49c	11.59 ± 1.21bcd	99.86 ± 5.57b	97.23 ± 5.0d
	Femenino	Control	11.163 ± 1.32ef	10.65 ± 1.32d	55.47 ± 3.13g	61.45 ± 3.84h
		Cd	12.43 ± 0.87cd	12.98 ± 1.53a	83.45 ± 4.32e	84.57 ± 3.0f
		JRR11+JRR22	15.21 ± 1.12a	13.03 ± 1.76a	99.58 ± 4.09b	128.55 ± 4.89b
		JRR22	12.09 ± 1.84cde	10.94 ± 1.50cd	92.75 ± 6.74cd	100.052 ± 6.66d
		JRR11	14.07 ± 1.00b	12.27 ± 1.54ab	71.80 ± 4.16f	98.08 ± 4.19d
Pre-aclimatación	Masculino	Control	9.10 ± 1.44E	9.53 ± 1.87F	71.60 ± 6.35F	77.40 ± 6.8E
		Cd	12.45 ± 1.92AB	14.27 ± 1.41A	98.09 ± 5.63C	105.71 ± 3.86B
		JRR11+JRR22	11.17 ± 1.44CD	10.30 ± 1.24EF	76.43 ± 3.22E	73.67 ± 3.34EF
		JRR22	13.59 ± 1.52A	12.79 ± 1.87BC	67.44 ± 5.06G	99.94 ± 5.91C
		JRR11	12.44 ± 1.27B	11.70 ± 1.5CD	120.27 ± 4.58A	100.32 ± 5.34C
	Femenino	Control	11.94 ± 1.05BC	13.45 ± 1.82AB	74.42 ± 3.88EF	65.88 ± 4.77G
		Cd	10.30 ± 1.28D	11.23 ± 1.66DE	56.51 ± 5.63H	56.44 ± 5.21H
		JRR11+JRR22	11.86 ± 1.11BC	13.17 ± 1.54AB	64.37 ± 3.52G	70.52 ± 4.61F
		JRR22	11.61 ± 1.27BC	11.44 ± 1.97CDE	89.68 ± 5.27D	92.69 ± 6.24D
		JRR11	12.00 ± 1.48BC	11.33 ± 1.45DE	109.02 ± 4.48B	111.46 ± 5.85A

Letras minúsculas indican diferencias significativas entre etapa de enraizamiento *in vitro* y letras mayúsculas indican diferencias significativas entre etapa de pre-aclimatación (ANOVA de dos vías, $p \leq 0.05$ por prueba Tukey).

En la etapa de pre-aclimatación; la longitud de la epidermis adaxial, en plantas masculinas el tratamiento donde se inoculó la cepa *M. aminovorans* (JRR 22), presentó el valor más alto (13.59 ±1.52) encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al control de acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VII). En plantas femeninas el tratamiento donde se inoculó la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) (Figs. 30-31) registró el valor más alto (12.00 ±1.48) (Figs. 30-31). En la epidermis abaxial en las plantas masculinas se observó, que el tratamiento inoculado con la cepa *A. brasilense* (Cd) presentó la mayor longitud (14.27±1. 41) (Tabla VII),

mientras que en plantas femeninas se observó menor longitud en plantas inoculadas con *A. brasilense* (Cd), *M. aminovorans* (JRR22) y *R. pyridinivorans* (JRR11) (Figs. 30-31).

En etapa de enraizamiento *in vitro* el parénquima empalizado presentó longitudes entre 108.01 µm en el control masculino de 55.47 µm en el control femenino; en plantas masculinas se observó la mayor longitud al inocularlas con las bacterias JRR11 y la mayor longitud en plantas femeninas en el tratamiento donde se realizó la co-inoculación, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VII, Fig. 29). En el parénquima esponjoso se observó, que el control de las plantas masculinas registró la mayor longitud, seguido por el tratamiento inoculado con la cepa *A. brasilense* (Cd). En plantas femeninas se observó un fenómeno diferente, ya que el control registró el valor más bajo en comparación con los trataientos inoculados, siendo el tratamiento donde se realizó la co-inoculación el que obtuvo la mayor longitud en el parénquima esponjoso (128.55±4.89) (Figs. 28-31).

En etapa de pre-aclimatación, la mayor longitud en el parénquima empalizado fue en las plantas inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) (120.27± 4.58; 109. 02 ±4.48) encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al control de acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VII). En el parénquima esponjoso de plantas masculinas inoculadas con la cepa *A. brasilense* (Cd) registró la mayor longitud (105.71±3.86), seguido de plantas inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) (100.32±5.34), encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al control de acuerdo con la prueba Tukey (Tabla VII); en tanto que en plantas femeninas que fueron inoculadas con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) registro la mayor longitud (111.46±5.85) (Tabla VII). Aparte es importante considerar que tanto el parénquima empalizado y el parénquima esponjoso, disminuyeron su longitud de la etapa de enraizamiento *in vitro* a la etapa de pre-aclimatación (Figs. 28-31).

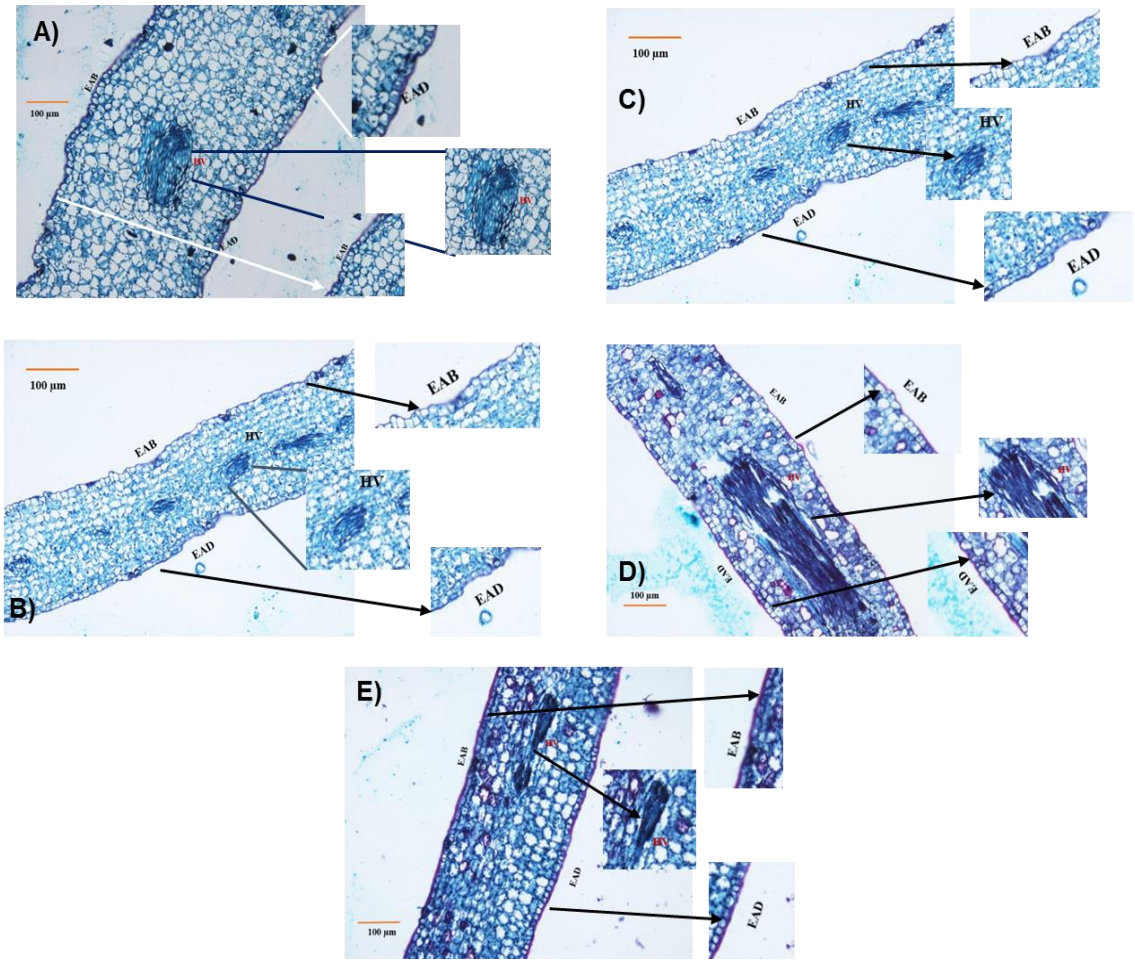

Figura 28. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas masculinas en etapa de enraizamiento. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). **HZ** haz vascular, **EAD** epidermis adaxial, **EAB** epidermis abaxial.

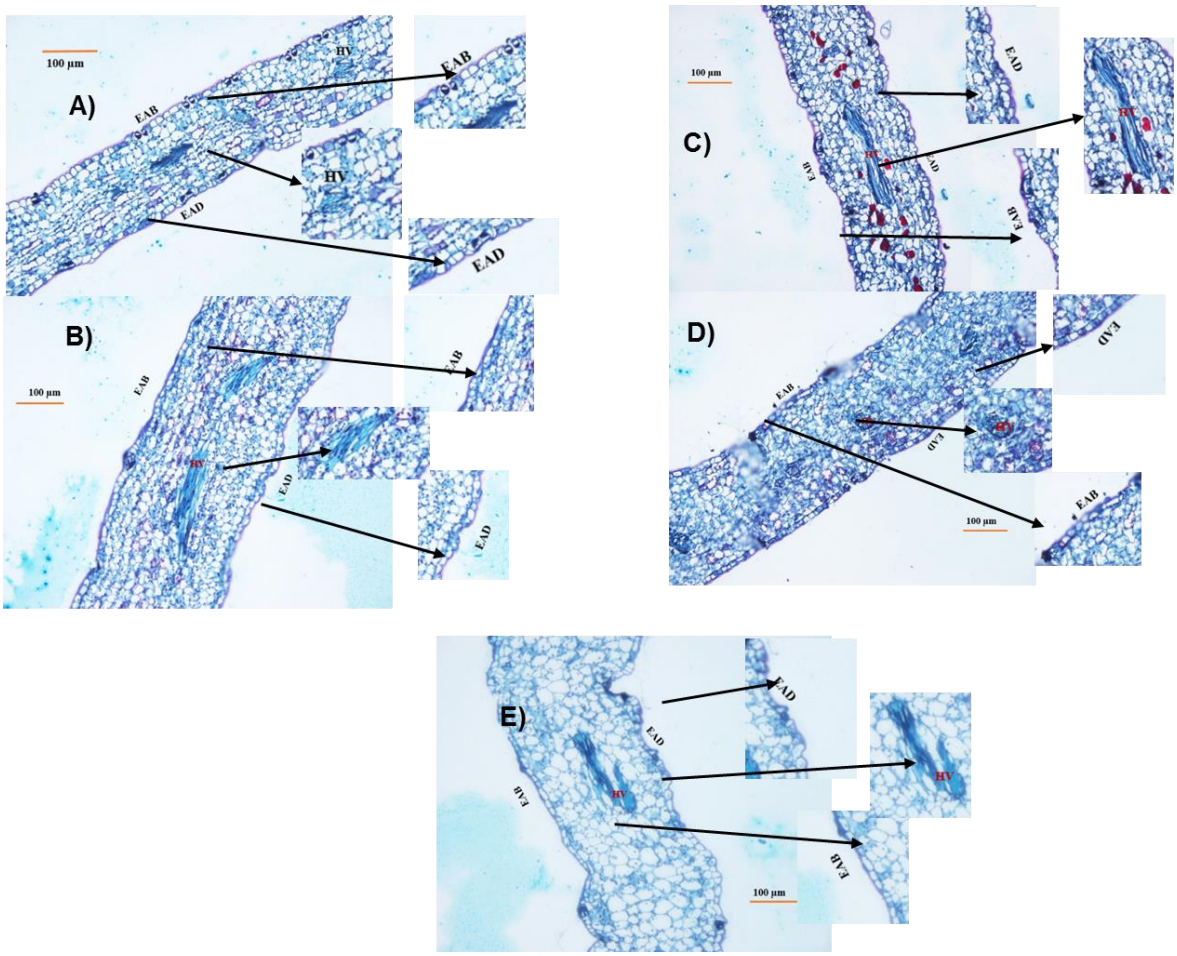

Figura 29. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas femeninas en etapa de enraizamiento. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). **HZ** haz vascular, **EAD** epidermis adaxial, **EAB** epidermis abaxial.

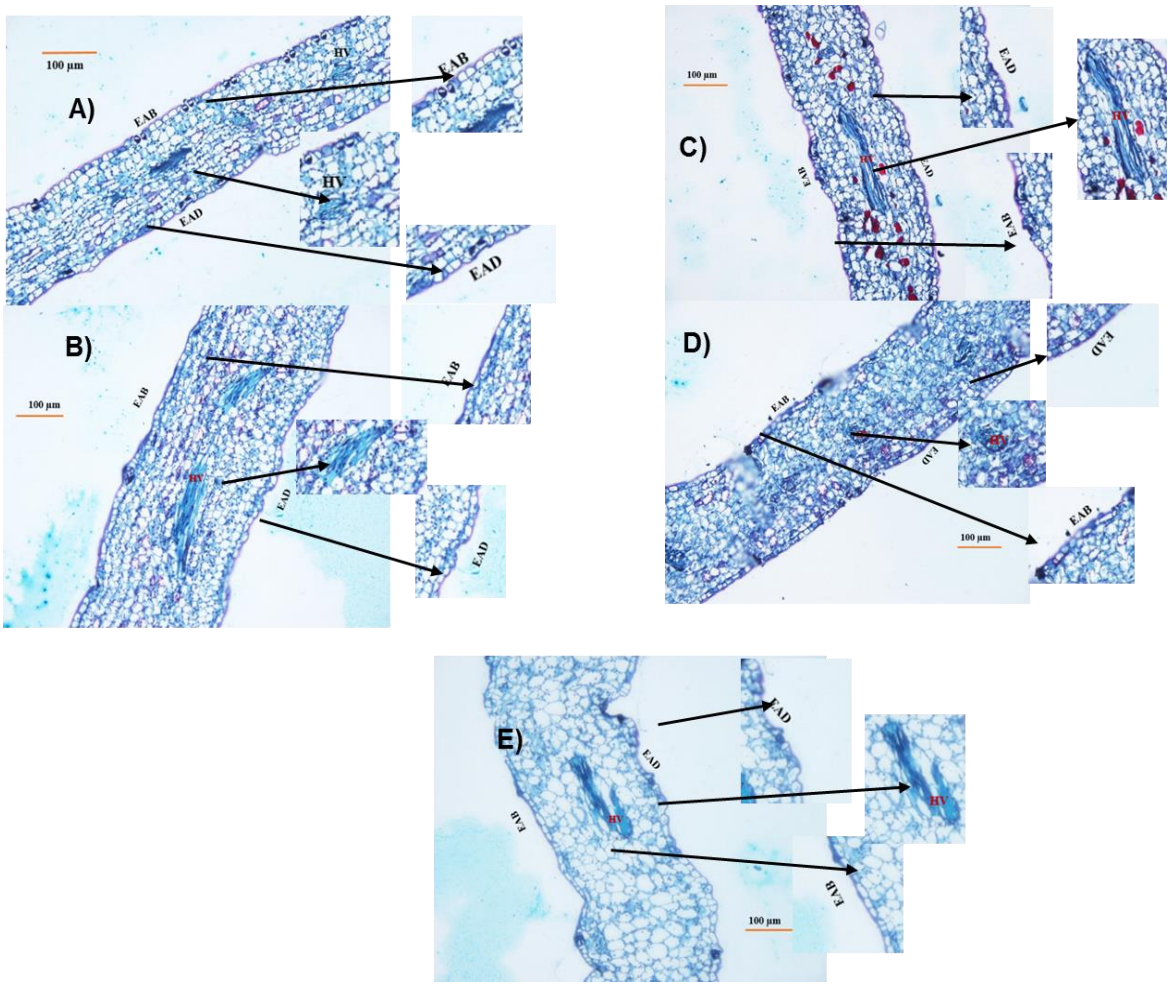

Figura 30. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas masculinas en etapa de pre-aclimatación. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). **HZ** haz vascular, **EAD** epidermis adaxial, **EAB** epidermis abaxial.

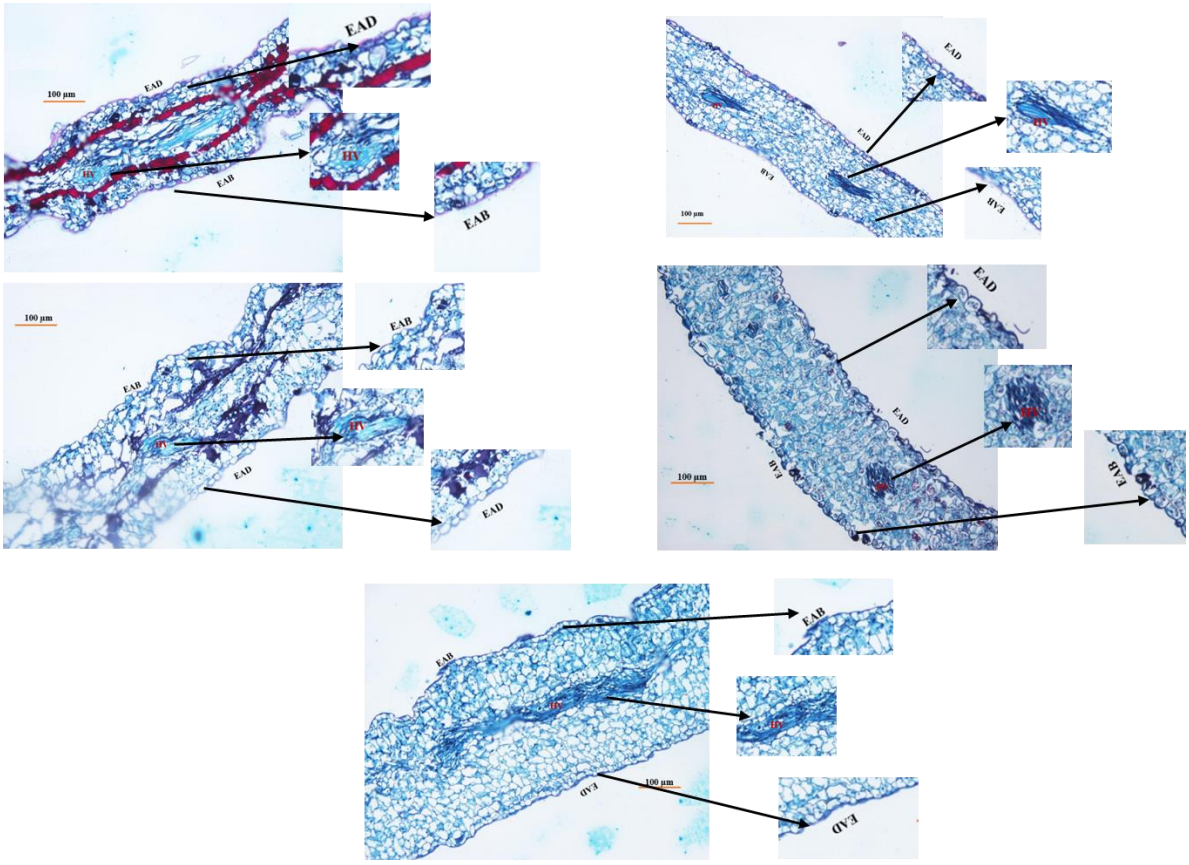

Figura 31. Corte transversal de hoja de jojoba (*S. chinensis*). Plantas femeninas en etapa de pre-aclimatación. A) control, B) *A. brasilense* (Cd) C) cepas JRR22+JRR11, D) *M. aminovorans* (JRR22), E) *R. pyridinivorans* (JRR11). **HZ** haz vascular, **EAD** epidermis adaxial, **EAB** epidermis abaxial.

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de los sitios de muestreo

De acuerdo a la bibliografía jojoba es un arbusto que se encuentra en zonas áridas y semiáridas donde la precipitación es de 80 a 120 mm por año y la temperatura de -5 a 54 °C y suelos con pH de 5 a 8 (Hosseini *et al.,* 2011). Sin embargo, nuestros resultados demostraron que esta planta puede crecer en lugares donde el pH es de 6.1 a 9.19; lo cual puede estar asociado a que en ambientes tan hostiles las plantas tienden a asociarse con bacterias endófitas, para mejorar el desarrollo y crecimiento vegetal (Sun *et al.,* 2013), mientras que, las plantas proporcionan los nutrientes y hospedaje a las bacterias (Knoth *et al.,* 2013).

8.2 Densidad de bacterias endófitas en los sitios de muestreo

En relación a los resultados obtenidos de densidad de bacterias endófitas a través de las UFC no excedieron 10^5 UFC g^{-1}. Lo que es común en poblaciones de bacterias endófitas de plantas (Krishna *et al.,* 2012). El-Deeb *et al*. (2013) encontraron que la población de bacterias endófitas de plantas de zonas desérticas son más bajas (1.1×10^2 – 1.5×10^2 UFC g^{-1}) en comparación con plantas que crecen en otras condiciones ambientales (5.2×10^6 UFC g^{-1}). De igual manera en este estudio la abundancia de bacterias endófitas fue diferente en cada uno de los sitios de muestreo, lo cual puede deberse a que en cada uno de los sitios de muestreo las variables ambientales y físico-químicas del suelo fueron diferentes; y de acuerdo con Andrew *et al.* (2012), variables ambientales y tipo de suelo tienen una fuerte influencia en la abundancia y la composición de bacterias endófitas de las plantas. De igual manera las variables ambientales están estrechamente relacionadas con la producción de exudados radicales, los cuales son señales químicas para atraer a las bacterias endófitas. En este estudio por ejemplo, el pH y la materia orgánica influyeron en la menor abundancia de bacterias endófitas del sitio 19 (con el valor más alto de pH y un valor de 0.7% de materia orgánica). Lo cual nos confirma que estas variables pueden afectar en la densidad de bacterias

endófitas, aunque hay otros factores que influyen en la densidad de este tipo de bacterias (tipo de órgano analizado, suelo, edad de la planta etc.).

8.3 Potencialidad de los aislamientos bacterianos como promotores de crecimiento en plantas

Generalmente, se aíslan bacterias endófitas que tienen la capacidad de secretar metabolitos secundarios, los cuales influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (El-Deeb *et al.,* 2013). En este estudio se logró aislar un total de 77 bacterias Gram negativas y 24 actinobacterias Gram positivas, que presentan características que probablemente influyen en el crecimiento y desarrollo de la jojoba. Para corroborar lo anterior se realizaron diferentes pruebas.

Por ejemplo, la solubilización de fosfato se realizó en placas de medio Pikovskaya, la cual se basa en la formación de halos visibles en este medio, como resultado de la producción de ácidos orgánicos (Gaiero *et al.,* 2013). En esta investigación se logró aislar un total de 66 endófitos capaces de solubilizar fosfatos. Las cepas JRP1, JRP28 y JRP39 mostraron la mayor capacidad de solubilizar fósforo, lo que el uso de estos microorganismos probablemente aumentaría la absorción de fósforo por las plantas. Esto es importante ya que en zonas áridas y semiáridas el fósforo es limitado (Dias *et al.,* 2009).

La capacidad de las bacterias endófitas de fijar nitrógeno se realizó cualitativamente a través del cultivo en un medio libre de nitrógeno (JNFb). El crecimiento de las bacterias en este medio sugiere que tienen la capacidad de producir la enzima nitrogenasa reductasa (Ngamau *et al.,* 2012), sin embargo se tiene que realizar un estudio para analizar el gen nifH. En este trabajo se lograron aislar e identificar diferentes géneros (*Bacillus, Methylobacterium, Rhodococcus, Oceanobacillus,* y *Streptomyces*) que crecieron en el medio JNFb indicando que presentan la habilidad de fijar nitrógeno. Recientes estudios demuestran que especies de *Bacillus* (Ngamau *et al.,* 2012) y *Methylobacterium (*Ardanov *et al.,* 2012) tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. No obstante, son pocos los

estudios al respecto (Valdés *et al.,* 2005) que demuestren que el género de actinomicetos presentan esta característica; por lo que el aislamiento de actinomicetos es muy importantes. Por otra parte, este es el primer reporte donde *R. pyridinivorans* (JRR11) demostró la capacidad de fijar nitrógeno.

La auxina mejor caracterizada y fisiológicamente más activa en las plantas es la AIA (Li *et al.,* 2012). La cual está relacionada en la fisiología de las plantas, por ejemplo, en la división celular, la iniciación de la raíz y la tasa de crecimiento (Faria *et al.,* 2013). Para determinar si las bacterias aisladas producían esta fitohormona se utilizó como precursor el L-Triptófano, teniendo como resultado que, 37 cepas de bacterias y 19 actinomicetos sintetizaron AIA. En relación a la producción de AIA está en los rangos reportados (0.1 a 4.25 $\mu g/mL^{-1}$) en comparación con otros estudios realizados donde reportan que especies de bacterias endófitas producen niveles de 1.0 a 20.0 $\mu g/ml^{-1}$ (Dias *et al.,* 2009). Lo cual se debe a que la producción de AIA por bacterias puede variar entre las diferentes especies y cepas, además de las condiciones de cultivo, y etapa de crecimiento de las plantas (Kumar *et al.,* 2012). Se ha reportado que, una baja producción de AIA (2.01 $\mu g\ mL^{-1}$) promueve la elongación de la raíz primaria (Chen *et al.,* 2010). Considerando estos resultados, las cepas aisladas que producen AIA pueden ser capaces de estimular el desarrollo de las plantas.

Las bacterias producen la enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) la cual mitiga el estrés (biótico o abiótico) de las plantas reduciendo los niveles de etileno (Senthilkumar *et al.,* 2008). En este estudio, 38 cepas aisladas tienen la capacidad de producir esta ACC-desaminasa (31 bacterias y 4 actinomicetos); de estas bacterias solo 25 presentaban la capacidad de sintetizar AIA, lo cual es muy importante ya que como mencionan Biswas *et al.* 2012, las bacterias que se encuentran adheridas a las raíces, emplean el triptófano que se encuentra en los exudados para sintetizar AIA (antagónico del etileno), éste unido con el AIA que se encuentra en las plantas estimula la división celular y sintetizan la enzima ACC sintasa que transforma al s-adenosilmetionina en

ACC. Finalmente, el ACC presente en los exudados es hidrolizado en α-ketobuterano y amonio y este último es utilizado por las plantas y bacterias como fuente de nitrógeno. Es por esto que las cepas que presentan ambas características son útiles para el desarrollo de las plantas.

La determinación de sideróforos, se realizó a través del medio de cromo-azul, el cual se basa en la afinidad por el hierro (III) (Gull y Hafez, 2012), donde el complejo cromo azurol, el hierro (III) y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio son utilizados como indicadores (Alexander y Zuberer, 1991). En otras palabras la fuente quelante, que en este caso es el sideróforo elimina el hierro del complejo cromo azurol del medio y cambia de color azul a naranja. Por lo tanto los halos naranja de las colonias bacterianas son indicativos de la excreción de sideróforos (Ngamau *et al.,* 2012). Halos de color naranja se observaron en 43 cepas aisladas (38 bacterias y 5 actinomicetos). El aislamiento y utilización de cepas con esta capacidad pueden mejorar la nutrición asimilando hierro en las plantas, ya que los sideróforo son responsables de la disolución, la quelación y el transporte de hierro (III) (Colombo *et al.,* 2014). Así mismo, estos compuestos influyen en la absorción de otros metales como el Zn y Cu, además estimulan la biosíntesis de otros compuestos por los microrganismos, mediante el aumento de la disponibilidad de estos minerales (Hye *et al.,* 2014). Por lo que los sideróforos aparte de transformar el hierro pueden inhibir el crecimiento de antagonistas, debido al secuestro de hierro del ambiente y por lo tanto restringiendo el crecimiento de patógenos (Gull y Yusuf-Hefeez, 2012).

El aislamiento e identificación de bacterias con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos, es una alternativa útil para reducir pérdidas económicas causadas por los hongos. La prueba de cultivo doble se utiliza para una detección preliminar de agentes de control biológico, aunque los resultado dependerán del medio de cultivo y la producción de los metabolitos secundarios (Gull y Hafeez, 2012). De acuerdo a trabajos reportados por otros autores, esta técnica ha demostrado que muchas rizobacterias aisladas, tienen efectos antagónicos contra hongos del suelo como: *F. oxysporum* (Ma *et al.,* 2013). En este

estudio se demostró que algunas cepas endófitas de jojoba 39 cepas de bacterias y 9 actinomicetos presentaban la capacidad de inhibir el crecimiento de *Alternaria* sp., lo cual se ha reportado en este tipo de bacterias, como lo demuestra el trabajo de Li *et al.* (2012), donde encontraron que 12 bacterias endófitas tenían la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio de hongos *F. oxysporum* y *R. solani*. Ardonov *et al.* (2012), encontraron que cepas del género *Methylobacterium* han sido caracterizadas por producir biofilms y la capacidad de inducir el sistema de defensa, lo cual fortalece nuestros resultados ya que nosotros encontramos que *M. aminovorans* (JRR22) inhibió el crecimiento de *Alternaria* sp. Este estudio también demostró que la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) inhibió el crecimiento del patógeno, aunque solo se había reportado por su habilidad de degradar micotoxinas (Cserháti *et al.,* 2013)

8.3.1 Identificación de bacterias endófitas

De las cepas aisladas, 8 fueron identificadas a través del 16s rADN, se seleccionaron porque presentaban el mayor número de mecanismos de promoción de crecimiento en plantas. Las cuales mostraban un metabolismo versátil, y un corto tiempo de generación, son competitivas y no requieren muchos factores de crecimiento, siendo ideales para la producción de bioproductos.

De las 8 cepas, 4 cepas fueron identificadas como *Bacillus* sp. 1 *M. aminovorans*, 1 *R. pyridinivorans*, 1 *Streptomyces* sp. y 1 *O. kimchii*. Estas especies de bacterias han sido estudiadas, por ejemplo el género *Bacillus* es reportado como bacteria endófita de plantas de zonas áridas (El-Deeb *et al.,* 2013; Senthilkumar *et al.,* 2008). Por otra parte el género *Methylobacterium* es comúnmente clasificada como endófita, capaz de producir biopeliculas y tolerante a metales pesados (Ardanov *et al.,* 2012). Mientras que algunas cepas de *Streptomyces* se han clasificado como actinobacterias endófitas productoras de metabolitos secundarios que se encuentran en plantas medicinales como *Plectranthus tenuiflorus* (El-Deeb *et al.,* 2013). Sin embargo, *R. pyridinivorans* y *O. kimchii* no han sido reportadas

como endófitas de plantas, y *R. pyridinivorans* es considerada como biodegradadora y se ha encontrado principalmente en suelos contaminados (Cserháti *et al.,* 2013).

8.4 Desarrollo de explantes *in vitro* de jojoba

En la actualidad, se tienen protocolos establecidos para la multiplicación *in vitro* de jojoba (Apóstolo *et al.,* 2001; Llorente *et al.,* 2007); utilizando principalmente citoquininas (BAP, KN, y 2-ip) a diferentes concentraciones, demostrando efectos en la inducción de brotes (Naz *et al.,* 2015). Sin embargo, en estos trabajos generalmente no especifican el sexo de las plantas con las que trabajan. Lo que observamos es que la brotación para el caso de plantas masculinas es muy efectivo, y la tasa de brotación fue menor para plantas femeninas. Lo cual es similar a lo reportado por Kumar-Rai *et al*. (2012) donde encontraron que la tasa de multiplicación de plantas femeninas de *Momordica dioica* fue menor en comparación con plantas masculinas, ellos mencionan que a bajas concentraciones de BAP (0.9-2.2 µM) las plantas femeninas tienen una mejor tasa de brotación. El sexo de las plantas es un punto muy importante ya que para establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de jojoba es un factor limitante al querer regenerar esta planta.

8.5 Inoculación de bacterias endófitas en etapa de enraizamiento *in vitro* de jojoba

8.5.1 Crecimiento y enraizamiento de jojoba

Las bacterias endófitas tienen efecto sobre el crecimiento de las plantas, especialmente bajo condiciones de estrés, además desempeñan un papel importante en la fisiología de las plantas, a través de una combinación de mecanismos directos e indirectos (Gaiero *et al.,* 2013). En este trabajo se utilizaron las cepas *M. aminovorans* (JRR 22), *R. pyridinivorans* (JRR11) las cuales fueron aisladas de jojoba, además se utilizó la cepa *A. brasilense* (Cd) como control positivo, ampliamente estudiada por ser promotora de crecimiento vegetal en plantas (Larraburu y Llorente 2015). Se observó que la inoculación con las cepas

de *A. brasilense, M. aminovorans* y *R. pyridinivorans* incrementaron la altura de las planta y la longitud de las raíces de jojobas, tanto en plantas del sexo femenino como del sexo masculino. Se ha reportado que cepas de bacterias capaces de sintetizar AIA incrementan la rizogénesis en condiciones *in vitro* (Ngoma *et al.,* 2013). El desarrollo y el crecimiento de las plantas fueron claramente estimulados por la inoculación de las bacterias; lo que nos demuestra que esta técnica es efectiva para incrementar el área de superficie de la raíz.

8.5.2 Clorofila α, β, total y carotenoides

Estudios anteriores sugieren una relación entre la actividad fotosintética y la incorporación de nitrógeno, que contribuye a la formación de la clorofila (Lucas *et al.,* 2014), nuestros resultados en la etapa de enraizamiento, mostraron aumento en la concentración de pigmentos, de plantas inoculadas, en comparación con el control. De acuerdo con Stefan *et al*. (2013) la utilización de cepas con capacidad de fijar nitrógeno aumenta la concentración de clorofila en plantas, lo que ocurrió en este trabajo ya que las cepas utilizadas presentan la capacidad de fijar nitrógeno. Benson *et al*. (2014) encontraron resultados similares en plantas *in vitro* de *Naravelia zeylanica* inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans*, mostrando un aumento en la concentración de clorofila.

Un incremento en la concentración de carotenoides protegen a la clorofila de la degradación, por lo que las plantas inoculadas que presentaron altos niveles de carotenoides reciben fotoprotección y eliminación de ROS (Dias *et al.,* 2014), ayudando a adaptarse a las plantas a tolerar las condiciones de estrés en la etapa de pre-aclimatación. También se observó que, la tasa fotosintética fue diferente entre plantas femeninas y masculinas, lo cual puede no estar relacionado con la inoculación por bacterias, sino por la genética de las plantas.

8.5.3 Actividad enzimática de plantas de jojoba en etapa de enraizamiento

Algunos mecanismos asociados al estrés oxidativo son regulados por la interacción planta-huésped (Araújo *et al*., 2015; Ruuhola *et al*., 2013). Por ejemplo, al inocular plantas de *Arabidopsis thaliana* con *Methylobacterium extorquens* se producen varios reguladores antioxidantes y se expresan genes asociados al estrés (PhyR) cuando la bacteria se asocia con las plantas (Gourion *et al.,* 2006). El sistema antioxidante, actúa como un sistema de control de daños, proporcionando protección contra el estrés oxidativo, que de otro modo podría causar la peroxidación de lípidos, que resulta en daños a la membrana celular, organelos, proteínas y la estructura del ADN, inhibiendo la fotosíntesis y la actividad de algunas enzimas (Jha y Subramanian, 2013).

La eliminación de radicales libres es un mecanismo en el que varias enzimas antioxidantes juegan un papel importante como parte de la respuesta de defensa de las plantas (Helepciuc *et al.,* 2014). En este caso la primera línea de defensa es la superóxido dismutasa (SOD) la cual transforma $O_2^{-\cdot}$ en agua (Perveen *et al.,* 2013). En el presente trabajo la actividad de la enzima SOD en hojas, fue mayor en plantas femeninas en comparación con plantas masculinas, lo cual se puede deber a que las plantas femeninas son más sensibles al estrés biótico y abiótico (Feng *et al.,* 2014) y por lo tanto hay mayor actividad de esta enzima. Las plantas inoculadas con la cepa *M. aminovorans* (JRR22) presentaron mayor actividad en comparación con el control, tanto en plantas femeninas como masculinas. El género *Methylobacterium* se ha utilizado con éxito en la tolerancia a metales pesados, promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a enfermedades (Joe *et al.,* 2013), se ha reportado que el género *Methylobacterium* tiene la capacidad de incrementar la producción de SOD cuando se encuentra bajo estrés, esta enzima puede ser tomada por las plantas y disminuir la producción de radicales de oxígeno disminuyendo el estrés de la planta (Giri *et al.,* 2013).

Por otra parte, en raíces, el control de las plantas femeninas presentó la mayor actividad enzimática, así mismo, en los tratamientos donde se realizó la co-inoculación (JRR11 y JRR22) también presentó una alta actividad enzimática de las plantas inoculadas. Se ha observado que la co-inoculación de *Methylobacterium* con alguna otra bacteria que produzca la enzima ACC desaminasa, tiene la capacidad de reducir el estrés en plantas (Joe *et al.,* 2013) como fue en este caso, cuando se utilizó *M. aminovorans* (JRR22) y *R. pyridinivorans* (JRR11) las cuales son cepas capaces de sintetizar esta enzima.

Después de que actúa la enzima SOD, la enzima CAT elimina el peróxido de hidrógeno, al descomponer este en H_2O (Jha y Subramanian, 2013), ésta se localiza en los peroxisomas y por lo tanto proporciona a las células vegetales un mecanismos eficiente para eliminar el peróxido de hidrógeno (Patel y Saraf, 2013). En el presente trabajo, la CAT en hojas, produjo la mayor actividad en el tratamiento inoculado con la cepa de *A. brasilense* (Cd). Se ha reportado que algunas bacterias promotoras de crecimiento vegetal tienen la capacidad de sintetizar CAT, la cual ha demostrado tener una interacción benéfica al ser inoculadas en plantas disminuyendo un posible estrés (Baqir-Hussain *et al.,* 2014); así mismo se ha observado que cepas de *Azospirillum,* induce algunos mecanismos a las plantas para aumentar los sistemas de defensa, a través de la activación de las enzimas de defensa, facilitándose a adaptarse a algún tipo de estrés (Arzanesh *et al.,* 2011), lo cual pudo observase en este trabajo donde se inoculó la cepa *A. brasilense* (Cd) presentó la mayor actividad enzimática en hojas y raíces, por lo tanto la inoculación de bacterias endófitas aumentó la CAT confiriéndole una señalización adecuada para la desintoxicación de H_2O_2 a las plantas de jojoba.

La enzima POX está vinculada en la biosíntesis de lignina por la oxidación de los compuestos fenólicos fortaleciendo así la pared celular (Daros-Salla *et al.,* 2014). Así mismo esta enzima se encarga de eliminar radicales libres y peróxido de hidrogeno (Indiragandhi *et al.,* 2008). Los resultados obtenidos de la enzima POX en hojas y raíces mostraron un aumento significativo en el tratamiento donde se

realizó la co-inoculación, tanto en plantas femeninas como masculinas de ambos sexos. Daros-Salla *et al.* (2014), observaron que la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal producen una mayor actividad en las enzimas PPO (polifenol oxidasa) y POX, de igual manera, Indiragandhi *et al.* (2008), demostraron que la inoculación de cepas de *Methylobacterium* en plantas de tomate aumentan la actividad POx, confiriéndole a las plantas tolerancia a hongos patógenos.

La enzima ascorbato peroxidasa (APx) juega un papel importante en la eliminación de peróxido de hidrogeno en el cloroplasto y citosol de las células vegetales, esta enzima cataliza la oxidación del ascorbato por el peróxido de hidrogeno, generando monodehidroascorbato radical, sin embargo, si no se reduce rápidamente se transforma en ascorbato y deshidroascorbato, y cuando se reduce a ascorbato por la reductasa de dehidroascorbato genera glutatión oxidado (GSSG) (Jain *et al.,* 2013; Karatas *et al.,* 2014). En la presente investigación, la APx, se observó con una mayor actividad en plantas masculinas que en plantas femeninas, tanto en hojas como en raíces; así mismo, se observó que el tratamiento donde se realizó la co-inoculación presentó la mayor actividad de esta enzima. En raíces, los tratamientos donde solo se inoculó una cepa presentó menor actividad enzimática en comparación con el control, de acuerdo con Jha y Subramanian (2013) la disminución de la enzima APx proporciona mayor estabilidad a la membrana celular, mostrando menor perdida de agua por la transpiración.

La enzima PAL es una de las enzimas de defensa de mayor interés, debido a que fluctúa significativamente en intervalos cortos de tiempo como respuesta a una variedad de estímulos (Mishra *et al.,* 2014). Estudios con diferentes especies de plantas mostraron que la actividad de la PAL aumenta con el estrés biótico incluyendo infección bacteriana (Jain *et al.,* 2013). En este trabajo la actividad de la PAL en hojas fue menor en plantas inoculadas en comparación con el control, excepto las plantas femeninas inoculadas con la cepa *M. aminovorans* (JRR22), lo que puede ser una respuesta de defensa de las plantas y prepararse a una potencial

infección de algún patógeno. Sin embargo, Figueredo *et al.* (2014), reportan lo contrario a lo que ocurrió en este trabajo, ya que ellos encontraron mayor actividad de la enzima PAL en hojas de cacahuate al ser inoculado con *Bradyrhizobium* sp. en comparación con plantas no inoculadas. En raíces las plantas femeninas inoculadas tuvieron una mayor estimulación de la PAL, excepto con el tratamiento donde se realizó la co-inoculación, la interacción planta-bacteria muestra un reflejo del sistema inmune de las plantas ya que se ha demostrado que la actividad de PAL aumenta con el estrés biótico, incluyendo la inoculación de bacterias benéficas como *Pseudomonas aeruginosa* (PJHU15) y *Bacillus subtilis* (BHHU1) (Jain *et al.,* 2013).

8.6 Inoculación de bacterias endófitas en etapa de pre-aclimatación de jojoba

8.6.1 Crecimiento y desarrollo de raíces en plantas de jojoba

Los resultados obtenidos de esta investigación, confirmaron que las cepas probadas utilizadas promovieron el crecimiento de las plantas, esto se determinó a través de la altura de las plantas y la longitud de las raíces. Los resultados obtenidos demostraron que la inoculación de cepas aisladas de la jojoba, *M. aminovorans* (JRR22) y *R. pyridinivorans* (JRR11), presentaron mejores resultados que la inoculación de una cepa comercial promotora de crecimiento vegetal, como es el caso de *A. brasilense* (Cd), lo cual concuerda con los resultados encontrados por Dias *et al.* (2009) quienes encontraron que la inoculación de cepas aisladas de la misma planta promovían mejor el crecimiento en comparación con las cepas ajenas a las plantas. Aunque se ha observado que la inoculación de cepas de *A. brasilense* en combinación con otras cepas indígenas de las plantas, promueven el crecimiento y además es compatible con otros microorganismos de la rizósfera (Madhaiyan *et al.,* 2010).

En el presente trabajo, en el tratamiento donde se realizó la co-inoculación se observó el mayor crecimiento de las plantas; lo cual coincide con el trabajo realizado por Kim *et al.* (2014) donde encontraron que el tratamiento donde se

realizó la co-inoculación de *B. iodinum* (RS16) y *M. oryzae* (CBMB20), presentó mayor crecimiento de las plantas. Lo cual se puede deber a un sinergismo que se encontró entre ambas cepas capaces de mejorar el crecimiento de las plantas, lo que se observa en las cepas *R. pyridinivorans* (JRR11) y *M. aminovorans* (JRR22) que fueron compartibles, generando un mayor efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas de jojoba.

Los microorganismos capaces de producir indol, especialmente aquellos que producen AIA tienen la capacidad de aumentar el número de raíces, lo que puede dar lugar a un aumento del crecimiento de las plantas (Madhaiyan *et al.,* 2010); en este trabajo se encontró que la inoculación de cepas con capacidad de producir AIA aumentaron la longitud de raíz; aunque los valores registrados en este estudio están por debajo de los observados por Faria *et al.* (2013) de bacterias endófitas aisladas de plantas de orquídeas; esto se puede deber a la cantidad de L-triptófano que añadieron al medio. Sin embargo, el aumento de la longitud de la raíz es mayor en comparación con el control.

El uso de bacterias con diferentes mecanismos de promoción de crecimiento, como la capacidad de fijar nitrógeno o síntesis de AIA y solubilización de fosfatos, presentan un resultado positivo en la promoción del crecimiento de las plantas. Ya que como menciona Ribeiro y Nogueira-Cardoso (2012) cepas con múltiples mecanismos de promoción de crecimiento, presentan mejores resultados que cepas que tienen sólo un mecanismo.

8.6.2 Clorofila α, β, total y carotenoides

El tratamiento donde se realizó la co-inoculación, en la etapa de pre-aclimatación produjo un efecto sinérgico que originó un aumentó en la longitud de la raíz y la longitud de las plantas, lo cual se puede deber a un aumento en la nutrición de las plantas que conduce a un aumento en la concentración de las clorofilas α, β y total. Así mismo, un aumento en la concentración de pigmentos es

una medida indirecta del buen funcionamiento del aparato fotosintético (Vafadar *et al.,* 2014).

Se observó un aumentó en la concentración de pigmentos desde la etapa de enraizamiento hasta pre-aclimatación. Los resultados concuerdan con Perveen *et al.* (2013), donde indican que plántulas de *Abrus precatorius* muestran un aumento en la contenido de clorofila α, β y carotenoides, después de ser transferidas a etapa de aclimatación. Este aumento de pigmentos ayuda a las plantas a hacer frente al posible estrés foto-oxidativo y proteger la maquinaria fotosintética (Osório *et al.,* 2013). Resultados similares se han encontrado en *Cassia occidentalis* (Naz *et al.,* 2015), donde se encontró un aumento en el contenido de clorofila y carotenoides durante la aclimatación. La otra posible razón para un aumento constante del contenido de clorofila podría ser el endurecimiento de las plántulas provocando un mejor crecimiento en invernadero.

8.6.3 Actividad enzimática

Después de la trasferencia de *in vitro* a condiciones *ex vitro*; las plantas están expuestas a mayor radiación solar, generando una fotoinhibición y como consecuencia generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En el presente trabajo, en la etapa de pre-aclimatación, la actividad de la SOD en hojas, disminuyó en comparación con la etapa de enraizamiento; se ha observado que la actividad de esta enzima en un principio es elevada, sin embargo, en un período más largo de aclimatación disminuye (Ahmed y Anis, 2014b). Por otra parte la actividad de esta enzima, en raíces de plantas masculinas aumentó; sin embargo en las plantas que fueron inoculadas, la actividad de esta enzima fue menor en comparación con el control; se ha reportado que en plantas inoculadas con rizobacterias, la actividad de la enzima SOD disminuye (Joe *et al.,* 2013); esto es importante ya que el O^{2-} reduce el ion férrico a ion ferroso, que reacciona con el H_2O_2 para formar radicales hidroxilo reactivos de ADN, que se encuentra en todos los compartimentos subcelulares de las células, el buen funcionamiento de la enzima SOD causa

dismutación de radicales O^{2-} en H_2O_2, los cuales son menos reactivos que los radicales hidroxilo (Ahmed y Anis, 2014b).

La CAT es muy importante para el mantenimiento de los procesos celulares, ya que se encarga de eliminar los radicales libres que se pueden producir (Ahmed y Anis, 2014a). En la etapa de pre-aclimatación la actividad fue mayor en hojas que en raíces; normalmente, se encuentra una mayor actividad en hojas en comparación con tallo y raíz (Habib *et al.,* 2014). Esto se debe a que mientras las plantas se desarrollan, se activa la vía metabólica de los tejidos y por lo tanto un aumento en la producción de H_2O_2 y el sistema antioxidante enzimático, indicando un buen funcionamiento de esta enzima. Así mismo se registró mayor actividad enzimática en plantas masculinas que en femeninas, indicando que hay una mayor producción de H_2O_2 en plantas masculinas, éste aumento en la actividad CAT sugiere una regulación positiva de los mecanismos de protección de plantas contra el estrés oxidativo por medio de la eliminación de H_2O_2 mediante su transformación a O_2 y H_2O en los peroxisomas (Ahmed y Anis, 2014a). Sin embargo, el tratamiento donde se realizó la co-inoculación, la actividad enzimática disminuyó, en comparación con el control, esto se puede deber a un sinergismo que se encuentra planta-bacteria confiriéndole mayor tolerancia en la etapa de aclimatación (Arzanesh *et al.,* 2011).

La POX es una enzima que se encarga de la tolerancia de las plantas, a reacciones de hipersensibilidad, el proceso de lignificación, síntesis de fenoles, glicoproteínas, suberización y producción de fitoalexinas (Yanti*,* 2015). En este trabajo se registró mayor actividad POX en hojas que en raíces, lo cual es lo contrario a lo registrado por Habib *et al.* (2014), donde registraron mayor actividad en raíces que en hojas, nuestros resultados indican que la CAT desempeña un papel más importante para proteger las plantas contra el estrés oxidativo en comparación con la POX. Por otra parte en hojas, se registró un aumento de la POX, en plantas masculinas que fueron inoculadas con *R. pyridinivorans* (JRR11), de acuerdo a lo que menciona Yanti (2015), se registra un aumento de la peroxidasa cuando las plantas son inoculadas por rizobacterias en comparación con el control;

provocando un aumento en la tolerancia de las plantas a enfermedades bacterianas. Así mismo, se observó que no todas las bacterias pueden inducir un aumento en la peroxidasa, lo cual si ocurrió en el presente trabajo.

La APX es una enzima que mantiene en equilibrio el redox celular bajo condiciones de estrés por H_2O_2 en cloroplastos, citosol, vacuolas y el espacio apoplástico (Ahmed y Anis, 2014a). Los resultados muestran que, de etapa *in vitro* a pre-aclimatación, el tratamiento con la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) en plantas masculinas, aumentó la actividad de la APX, esto probablemente se debe a que en este lapso de tiempo se produce mayor estrés por lo que aumenta la actividad de APX. Lo anterior sugiere que, las plantas desarrollaron un sistema protector antioxidante enzimático que favorece la capacidad de sobrevivir, además nuestros resultados sugieren que APX puede actuar como eliminadores de peróxido de hidrógeno tal como se produce durante el cambio de *in vitro* a *ex vitro* (Habib *et al.,* 2014). Aunque en los otros tratamientos la actividad enzimática no aumentó, al contrario disminuyó, se puede deber a que otras enzimas están actuando eliminando el H_2O_2.

Como se mencionó anteriormente la actividad de la PAL juega un papel importante en la biosíntesis de los fenilpropanoides que sintetiza los fenoles, fitoalexinas, y precursores para la biosíntesis de la lignina, todos los cuales tienen actividad antifúngica, además está relacionada con resistencia sistémica inducida por rizobacterias (ISR) (Tonelli *et al.,* 2013). La inoculación de las cepas *A. brasilense* (Cd) y *R. pyridinivorans* (JRR11) indujo el aumento de la actividad de la fenilalanina amonio liasa, de acuerdo con Thomas *et al.* (2010), plantas en etapa de aclimatación son fácilmente atacadas por patógenos, sin embargo el uso de microorganismos benéficos, promueven la supervivencia de las plántulas, además aumentan la actividad de las enzimas de defensa, incluyendo peroxidasa y fenilalanina amonio liasa. Esto debido a que la sincronización y expresión de los mecanismos de defensa son importantes para la supresión de patógenos, debido a

una alta expresión de proteínas relacionadas con la defensa, previene la colonización de patógenos en plántulas (Nagendran *et al.*, 2014).

8.7 Cortes histológicos de la etapa *in vitro* y pre-aclimatación

Las plantas *in vitro* se encuentran en condiciones de baja radiación solar, alta humedad y disponibilidad de azúcares, esto genera que las plantas no presenten adaptaciones estructurales necesarias para sobrevivir en condiciones *ex vitro* (Lando *et al.,* 2016). Por lo que en la aclimatación, es necesaria para una adaptación progresiva al nuevo entorno. Cambios morfológicos en plantas inoculadas y no inoculadas han sido reportados con anterioridad (Larraburu *et al.,* 2010), teniendo como resultado que la inoculación favorece la adaptación de las plantas a condiciones *ex vitro*.

En este trabajo se encontró que la epidermis disminuyo su longitud, cuando las plantas se transfirieron de *in vitro* a pre-aclimatación; este efecto debido a una mayor concentración de azúcar que reduce el alargamiento celular y aumenta el adelgazamiento de la pared celular, dando como resultado la formación de menos células (Misălová *et al.,* 2009). Así mismo, se observó aumento de la epidermis cuando las plantas fueron inoculadas por bacterias, lo cual demuestra que este cambio en la morfología es importante ya que la epidermis es la interfaz entre el medio ambiente y las plantas. Además, el aumento de la epidermis ayuda a la captura y distribución de la radiación solar a través del tejido fotosintético (Kapchina-Toteva *et al.,* 2014). De acuerdo con Lando *et al.* (2016) al aumentar la epidermis abaxial y adaxial, aumenta la captura de radicación solar, además ayudan a reflejar el exceso de radiación solar, a reducir la pérdida de agua debido a la transpiración y ejercen control sobre la cantidad de radiación solar que entra en la hoja, como ocurrió en el presente experimento, donde las plantas inoculadas aumentaron la concentración de clorofilas y carotenoides, generando plantas con mayor capacidad de adaptación a condiciones *ex vitro*.

Por otra parte, se encontró que aumentó el grosor del parénquima empalizado de la etapa *in vitro* a pre-aclimatación, es importante mencionar que las plantas que fueron inoculadas presentaron un mayor aumento en grosor del parénquima empalizado. De acuerdo a Sáez *et al.* (2012) las plantas que se encuentran en condiciones *ex vitro*, el parénquima empalizado es más grueso, indicando una mayor adaptación. En comparación con plantas que se encuentran *in vitro*. Esto debido a que en condiciones *in vitro* el parénquima es delgado y sin espacios de aire en el mesófilo esponjoso, que podría ser el resultado de un alto contenido de azúcar en el medio de cultivo. En relación al parénquima esponjoso se observó una disminución de in vitro a pre-aclimatación, lo cual es característica que las plantas de adaptación, ya que cuando se encuentra un parénquima esponjoso con espacios intracelulares las plantas sufren una hiperhidratación (Kapchina-Toteva *et al.,* 2014), en plantas masculinas este efecto se vio reflejado en el tratamiento inoculado con la cepa *A. brasilense* (Cd); mientras que en plantas femeninas el tratamiento donde se realizó la co-inoculación disminuyó en grosor del parénquima esponjoso.

9. CONCLUSIONES

- Esta investigación ha demostrado la presencia de bacterias endófitas en raíces de plantas de jojoba (*S. chinensis*). De las 101 bacterias que se aislaron, 8 presentaron el mayor número de mecanismos de promoción de crecimiento (crecimiento en medio sin nitrógeno, solubilización de fosfato tricálcico, producción ácido indol acético, ACC desaminasa y sideróforos).
- En la etapa de enraizamiento *in vitro* la inoculación de la cepa *R. pyridinivorans* (JRR11) promovió el enraizamiento y crecimiento de plantas de jojoba, además aumentó la concentración de clorofila y carotenoides. Sin embargo se registró una mayor actividad de enzimas de defensa, en los tratamientos donde se realizó la co-inoculación. Lo cual se puede deber a que cada una de las cepas desencadena una ruta de síntesis de las enzimas confiriéndole más tolerancia a las plantas a un posible estrés.
- Uno de los resultados más importantes de esta investigación es, el reporte de *R. pyridinivorans*, como bacterias promotoras de crecimiento en las plantas.
- En la etapa de pre-aclimatación, la co-inoculación de las bacterias endófitas seleccionadas, promovió el crecimiento de las plantas, longitud de la raíz y aumentó la concentración de pigmentos, además de sintetizar enzimas de defensa que le sirvieron a las plantas para adaptarse a condiciones de pre-aclimatación. Así mismo la inoculación de bacterias endófitas indujo modificaciones morfológicas que ayudan a mitigar el estrés.
- El análisis morfométrico realizado con los cortes histológicos, mostraron que la inoculación de bacterias, propician cambios en la estructura que les pueden servir a una mejor adaptación a condiciones de pre-aclimatación.
- Este estudio demuestra la importancia del uso de bacterias endófitas, mostrando el beneficio de los inoculantes endófitos seleccionados de las plantas de Jojoba con el proceso de biotización para mejorar la adaptación de las plantas en condiciones de pre-aclimatación.

10. LITERATURA CITADA

Aebi, H., 1974. Catalases. En: Bergmeyer H.U. (eds.). Methods of enzymatic analysis. Academic, New York, pp 673-684.

Ahmed, M.R., M. Anis. 2014a. *In vitro* regeneration and the antioxidant enzymatic system on acclimatization of micropropagated *Vitex trifolia* L. Agrofor. Syst. 88:437–447.

Ahmed, M.R., M. Anis. 2014b. Changes in activity of antioxidant enzymes and photosynthetic machinery during acclimatization of micropropagated *Cassia alata* L. plantlets. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. 50:601–609.

Alexander, D.B., D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils.12 (1): 39-45.

Allawzi, M., S. Al-Asheh, H. Allaboun, O. Borini. 2010. Assessment of the natural jojoba residues as adsorbent for removal of cadmium from aqueous solutions. Desalin Water Treat. 21: 60-65.

Al-Soqeer, A., M.I. Motawei, M. Al-Dakhil, R. El-Mergawi, N. Al-Khalifah. 2012. Genetic variation and chemical traits of selected new jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) Genotypes. J. Am. Oil Chem. Soc. 89:1455-1461.

Aly M.A., E.A. Amer, W.A. Al-Zayadneh, A.E. Negm-Eldin. 2008. Growth regulators influence the fatty acid profiles of *in vitro* induced jojoba somatic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult. 93:107-114.

Andreote, F.D., W.L. de Araújo, J.L. de Azevedo, J.D. van Elsas, U. Rocha, L.S. van Overbeek. 2009. Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* Strain P9, and its effect on associated bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75(11): 3396-3406.

Andrew, D.R., R.R. Fitak, A. Munguia-Vega, A. Racolta, V. Martinson, K. Dontsava. 2012. Abiotic factors shape microbial diversity in sonoran desert soils. Appl. Environ. Microbiol. 78(21):7527-7537.

Apóstolo, N.M., C. Brutti, A. Ferrarotti, B.E. Llorente, N Krymkiewicz. 2001. Stimulation of root development with cyclodextrins on jojoba shoots *in vitro*. *In Vitro* Cell.Dev.Biol.-Plant. 37: 414-418.

Araújo, W.L., L. Souza-Santos, F. Dini-Andreote, J.K. Salgueiro-Londoño, A.A. Camargo-Neves, F.D. Andreote, M.N. Nóbrega-Dourado. 2015. Genes related to

antioxidant metabolism are involved in *Methylobacterium mesophilicum*-soybean interaction. Antonie Van Leeuwenhoek. 108: 951-963.

Ardanov, P., A. Sessitsch, H. Haggman, N. Kozyrovska, A.M. Pirttila. 2012. *Methylobacterium*-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. PLoS One. 7(10): 1-7.

Arzanesh, M.H., H.A. Alikhani, H. Khavazi, H.A. Rahimian, M. Miransari. 2011. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. World J. Microbiol. Biotechnol. 27: 197-205.

Ash, G.J., E.B. Stodart, J.W. Hyun. 2012. Black scab of jojoba (*Simmondsia chinensis*) in Australia caused by a putative new pathotype of *Elsinoë australis*. Plant Dis. 96:629-634.

Bafana, A. 2013. Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. World J. Microbiol. Biotechnol. 29:63-74.

Baqir-Hussain, M., Z. Ahmad-Zahir, H. Naeem-Asghar, M. Asgher. 2014. Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat? Int. J. Agric. Biol. 16: 3-13.

Bashir, M.A., M.A. Anjum, Z. Chaudhry, H. Rashid. 2009. Response of jojoba (*Simmondsia chinensis*) cuttings to various concentrations of auxins. Pak. J. Bot. 41(6): 2831-2840.

Batková, P., J. Pospíšilová, H. Synková. 2008. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. Biol. Plant. 52 (3): 413-422.

Belimov, A.A., N. Hontzeas, V. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, B.R. Glick. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol Biochem. 37: 241-250.

Benson, A., M. Melvin-Joe, B. Karthikeyan, T. Sa, C. Rajasekaran. 2014. Role of *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 in micropropagation of endangered medicinal plant *Naravelia zeylanica* (L.) DC. J Plant Growth Regul. 33:202–213.

Bhardwaj, M., S. Uppal, S. Jain, S. Kharb, R. Dhillon, R.K. Jain. 2010. Comparative assessment of ISSR and RAPD marker assays for genetic diversity analysis in jojoba

[*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider]. J. Plant Biochem. Biotechnol. 19(2): 255-258.

Biswas, R.B., P. Jourand, C. Chaintreuil, B. Dreyfus, A. Singh, S. Narayan, N. Mukhopadhyay. 2012. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolli* SN 10 promore rice growth and in the process undergo colonization and chemotaxis. Biol Fertil Soils. 48: 173-182.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.

Carletti, S.M., B. Llorente, E. Rodríguez-Cáceres, S. Tandecarz. 1998. Jojoba inoculation with *Azospirillum brasilense* stimulates *in vitro* root formation. Plant Tissue Cult. & Biotech. 4(3) 165-174.

Casella, T.M., V. Eparvier, H. Mandavid, A. Bendelac, G. Odonne, L. Dayan, C. Duplais, L.S. Espindola, D. Stien. 2013. Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. Phytochemistry. 96: 370-377.

Chakrabarty, D., S. Kumar–Datta. 2008. Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. Acta Physiol Plant. 30:325-331.

Chandra, S., V. Kumar, R. Bandopadhyay, R. Chandra. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. Biotechnol. Lett. 32:1199-1205.

Chen, G.X., K. Asada. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30:987–998.

Chen, L., S. Lou, X. Xiao, H. Guo, J. Chen, Y. Wan, B. Li, T. Xu, Q. Xi, C. Rao, C. Liu, G. Zeng. 2010. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum ningrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soil. Appl Soil Ecol. 46:383-389.

Coates, W., R. Ayerza. 2008. Supplemental pollination-increasing jojoba (*Simmondsia chinensis* L. [Schneider]) seed yields in the Arid Chaco environment. Ind Crops Prod. 27: 364–370.

Colombo, C., G. Palumbo, J. He, R. Pinton, S. Cesco. 2014. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. J. Soils Sediments.14:538-548.

Cserháti, M., B. Kriszt, Cs. Krifaton, S. Szoboszlay, J. Háhn, Sz. Tóth, I. Nagy, J. Kukolya. 2013. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains. Int J Food Microbiol. 166: 176–185.

Daros-Salla, T., T. Ramos da Silva, L. Vieira-Astarita, E. Romanato-Santarém. 2014. *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of *Eucalyptus* plants. Plant Physiol Biochem. 85: 14-20.

Dias, A.C.F., F.E.C. Costa, F.D. Andreote, P.T. Lacava, M.A. Teixeira, L.C. Assumpção, W.L. Araújo, J.L. Azevedo, I. Melo. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:189-195.

Dias, M.C., C. Correia, J. Moutinho-Pereira, H. Oliveira, C. Santos. 2014. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. Plant Cell Tiss Organ Cult. 117:213–224.

Dini-Andreote, F., J.D. van Elsas. 2013. Back to the basics: The need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behaviour in the rhizosphere. Plant Soil. 373: 1-15.

Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, Y. Okon. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. CRC Crit Rev Plant Sci. 22:107-149.

Döbereiner, J., V.L.D. Baldani, J.I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, Embrapa-SP: Itaguaí Embrapa-CNPAB. p. 60.

Duffy, E.M., E.M. Hurley, A.C. Cassells. 1999. Weaning performance of potato microplants following bacterization and mycorrhization. Potato Res. 42:521-527.

Dworkin, M., J.W. Foster. 1958. Experiments with some microorganisms, which utilize ethane and hydrogen. J Bacteriol. 75(5):592-601.

El-Deeb, B., K. Fayez, Y. Gherbawy. 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. J Plant Interact. 8(1): 56-64.

El-Mallah, M.H., S.M. El-Shami. 2009. Investigation of liquid wax components of egyptian jojoba seeds. J Oleo Sci. 58 (10): 543-548.

Faria, D.C., I.S. Melo, A.C. Franco, E.F. de Carvalho. 2013. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. World J Microbiol Biotechnol. 29:217-221.

Farzana, Y., O. Radziah, M.S. Saad, K. Sijam. 2007. Screening for beneficial properties of rhizobacterias isolated from sweet potato rhizosphere. Biotechnology. 6: 49-42.

Fedorov, D.N., G.A. Ekimova, N.V. Doronina, Y.A. Trotsenko. 2013. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC. FEMS Microbiol Lett. 343: 70-76.

Feng, L., H. Jiang, Y. Zhang, S. Zhang. 2014. Sexual differences in defensive and protective mechanisms of *Populus cathayana* exposed to high UV-B radiation and low soil nutrient status. Physiol. Plant. 151: 434–445.

Figueredo, Ms., M.I. Tonelli, T. Taurian, J. Angelini, F. Ibañez, L. Valetti, V. Muñoz, Ms. Anzuay, L. Ludueña, A. Fabra. 2014. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. J. Biosci. 39 877-885.

Gaiero, J.R., C.A. McCall, K.A. Thompson, N.J. Day, A.S. Best, K.E. Dunfield. 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. Am J Bot. (9): 1738-1750.

Gamborg, O.L., R.A. Miller, K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 50:151–158.

Gayol, M., D.O., Labuckas, J. Aparicio, J. Oberti, N.R. Grosso, C.A. Guzman. 2009. Chemical quality evaluation of damaged jojoba seeds (*Simmondsia chinensis*). J. Am. Oil Chem. Soc. 86:65-70.

Geng, H., L. Shi, W. Li, B. Zhang, C. Chu, H. Li, G. Zhang. 2008. Gene expression of jojoba (*Simmondsia chinensis*) leaves exposed to drying. Environ Exper Bot. 63: 137–146.

Gianinazzi, S., L. Oubaha, M. Chahbandar, B. Blal, M.C. Lemoine. 2003. Biotization of microplants for improved performance. Acta Hort. 625: 165-172.

Giri, D.D., A. Kumar, P.N. Shukla, R. Singh, P.K. Singh, K. Deo-Pandey. 2013. Salt stress tolerance of methylotrophic bacteria *Methylophilus* sp. and *Methylobacterium* sp. isolated from coal mine spoils. Pol. J. Microbiol. 62(3): 273-280.

Gordon, S.A., R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. 26:192-195.

Gosal, S.K., A. Karlupia, S.S. Gosal, I.M. Chihibba, A. Varma. 2010. Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas flourescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponin content of micropropagated *Chlorophytum* sp. Indian J. Biotechnol. 9: 289-297.

Gourion, B., M. Rossignol, J.A. Vorholt. 2006. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 103(35): 13186-13191.

Guang-Kai, B., F. Zhao-Zhong, Q. Sheng, X. Ke, W. Zhe, C. Cheng-Liang, L. Chang-Hong, D. Chuan-Chao, J. Ji-Hong. 2012. *Kineococcus endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a coastal halophyte in Jiangsu, China. Antonie Van Leeuwenhoek. 102(4): 621-628.

Gull, M., F.Y. Hafeez. 2012. Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. Afr. J. Microbiol. Res. 33:6308-6318.

Habib, D., M. Fayyaz, M. Zia. 2014. The study of ascorbate peroxidase, catalase and peroxidase during *in vitro* regeneration of *Argyrolobium roseum*. Appl Biochem Biotechnol. 172:1070-1084.

Hardoim, P.R., L.S. van Overbeek, J.D. van Elsas. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends Microbiol. 16(10): 463-471.

Hardoim, P.R., C.P. Hardoim, L.S. van Overbeek, J.D. van Elsas. 2012. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. PLoS One. 7(2): 1-13.

Hariprasad, P., S.R. Niranjana. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. Plant Soil. 316:13–24.

Helepciuc F., M.E. Mitoia, A. Manole-Păunescua, F. Aldea, A. Brezeanu, C. Petruţa. 2014. Induction of plant antioxidant system by interaction with beneficial and/or pathogenic microorganisms. Rom Biotech Lett. 19(3): 9366-9375.

Hentschel, U., M. Schmid, M. Wagner, L. Fieseler, C. Gernert, J. Hacker. 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. FEMS Microbiol Ecol. 35: 303-312.

Hernández-Mendoza, J.L., J.D. Quiroz-Velásquez, V.R. Moreno-Medina, N. Mayek-Pérez. 2008. Biosíntesis de ácido antranílico y ácido indolacético a partir de triptófano en una cepa de *Azospirillum brasilense* nativa de Tamaulipas, México. Avances en Investigación Agropecuaria.12:57-67.

Hosseini, F.S., H. Shahsavand-Hassani, M.J. Arvin, A. Baghizadeh, G. Mohammadi-Nejad. 2011. Sex determination of jojoba (*Simmondsia chinensis* cv. Arizona) by random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers. Afr. J. Biotechnol. 10 (4): 470-474.

Hye, J.S., M.A. Gururani, S. Chun. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiol. Res. 169:83-98.

Ikeda, A.C., L.L. Bassani, D. Adamoski, D. Stringari, V.K. Cordeiro, C. Glienke, V.B. Reynaud-Steffens, M. Hungria, L.G. Galli-Terasawa. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. Microb. Ecol. 65:154–160.

Ince, A.G., M. Karaca. 2011. Early determination of sex in jojoba plant by CAPS assay. J Agr Sci. 49: 327–336.

Indiragandhi, P., R. Anandham, K. Kim, W. Yim, M. Madhaiyan, T. Sa. 2008. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. World J. Microbiol. Biotechnol. 24: 1037-1045.

Jackson, M.L. 1973. Soil Chemical Analysis. Printice Hall of India, New Delhi. Jackson.

Jain, A., A. Singh, S. Singh, S. Bahadur-Singh. 2013. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*. J Plant Growth Regul. 32: 388-398.

Jha, Y., R.B. Subramanian. 2013. Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline conditions. Chil. J. Agr. Res. 73(3): 213-219.

Jha, B.K., M.G. Pragash, J. Cletus, G. Raman, N. Sakthivel.2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new *Pseudomona fluorescent* strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. moselii.* World J. Microbiol. Biotechnol. 25:573-581.

Joe, M.M., V.S. Saravanan, M.R. Islam, T. Sa. 2013. Development of alginate-based aggregate inoculants of *Methylobacterium* sp. and *Azospirillum brasilense* tested under *in vitro* conditions to promote plant growth. J Appl Microbiol. 116: 408-423.

Jorquera, M.A., M.T. Hernández, Z. Rengel, P. Marschner, M.L. Mora. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate–mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. Biol Fertil Soils. 44:1025-1034.

Kapchina-Toteva, V., M.A. Dimitrova, M. Stefanova, D. Koleva, K. Kostov, Zh.P. Yordanova, D. Stefanov, M.K. Zhiponova. 2014. Adaptive changes in photosynthetic performance and secondary metabolites during white dead nettle micropropagation. J Plant Physiol. 171: 1344–1353.

Karatas, Í, L. Öztürk, Y. Demir, A. Ünlükara, A. Kurunc, O. Düzdemir. 2014. Alterations in antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. Toxicol Ind Health. 30(8): 693-700.

Kim, K., C. Kwak, Y. Lee, T. Sa. 2014. Effect of co-inoculation of *Brevibacterium iodinum* RS16 and *Methylobacterium oryzae* CBMB20 on the early growth of crop plants in Saemangeum reclaimed soil. Korean J. Soil Sci. Fert. 47(1): 1-7.

Knoth, J.L., S.H. Kim, G. Ettl, S. Doty. 2013. Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophyte on growth and leaf physiology of maize. Glob Change Biol Bioenergy. 5:408-418.

Krishnan, P., R. Bhat, A. Kush, P. Ravikumar. 2012. Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. J Appl Microbiol. 113: 308-317.

Kumar, S., N. Singh, M. Mangal, A.K. Dhawan. 2012. Biotechnological advances in jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider]: recent developments and prospects for further research. Plant Biotechnol Rep. 6:97-106.

Kumar-Pandey, P., S. Kumar-Yadav, A. Singh, B. Kumar-Sarma, A. Mishra, H. Bahadura-Singh. 2012. Cross-species alleviation of biotic and abiotic stresses by the endophyte *Pseudomonas aeruginosa* PW09. J Phytopathol. 160:532–539.

Kumar-Rai, G., Singh, M. Prakash-Rai, N. Bhardwaj, D.R. K. Sanjeev. 2012. In vitro propagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. Physiol Mol Biol Plants. 18(3):273-280.

Lando, A.P., M.R. Wolfart, P.C.P. Fermino, M. Santos. 2016. Structural effects on Cattleya xanthina leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. Biol. Plant. 60 (2): 219-225.

Larraburu, E.E., S.M. Carletti, E. Rodríguez, B.E. Llorente. 2007. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. Plant Cell Rep. 26:711-717.

Larraburu, E.E., B.E. Llorente, N.M. Apóstolo. 2010. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia* X 3 fraseri Dress) *in vitro* plants inoculated with rhizobacteria. Trees. 24:635-642.

Larraburu, E., B. Llorente. 2015. *Azospirillum brasilense* enhances *in vitro* rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. Ann. For. Sci. 72: 219-229.

Lebeis, S.L., M. Rott, J.L. Dangl, P. Schulze-Lefert. 2012. Culturing a plant microbiome community at the cross-Rhodes. New Phytol.196: 341-344.

Li, L., H. Sinkko, L.M. Ontonen, G. Wei, K. Lindström, L.A. Räsänen. 2012. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal Glycyrrhiza species in China. FEMS Microbiol Ecol.79: 46-68.

Llorente, B.E., L.M. Juarez, M. Apóstolo. 2007. Exogenous trehalose affects morphogenesis *in vitro* of jojoba. Plant Cell Tissue Organ Cult. 89:193-201.

Llorente, B.E., N.N. Apóstolo. 1998. Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* propagation of jojoba. New Zeal J Crop Hort. 26:55-62.

Lucas, J. A., J. García-Cristobal, A. Bonilla, B. Ramos, J. Gutierrez-Mañero. 2014. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. Plant Physiol Biochem. 82: 44-53.

Ludueña, L.M., T. Taurian, M.L. Tonelli, J.G. Angelini, M.S. Anzuay, L. Valetti, V. Muñoz, A.I. Fabra. 2012. Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. Eur J Soil Biol. 53: 48-55.

Lugtenberg, B., F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol. 63:541–56.

Ma, L., Y. Hong-Cao, M. Hui-Cheng, Y. Huang, M. He-Mo, Y. Wang, J. Zhong-Yang, F. Xiang-Yang. 2013. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. Antonie Van Leeuwenhoek. 103:299-312.

Madhaiyan, M., S. Poonguzhali. B. Kang,Y. Lee, J. Chung, T. Sa. 2010. Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. Plant Soil. 328:71–82.

Mantilla-Paredes, A.J., G.I. Cardona, C.P. Peña-Venegas, U. Murcia, M. Rodríguez, M.M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Rev Biol Trop. 57: 915-927.

Mendes, R., P. Garbeva, J.M. Raaijmakers. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol Rev. 37: 634-663.

Misălová, A. Ď urkovič, M. Mamoňová, T. Priwitzer, A. Lengyelová, D. Hladká, A. Lux. 2009. Changes in leaf organisation, photosynthetic performance and wood formation during *ex vitro* acclimatisation of black mulberry (*Morus nigra* L.). Plant Biol. 11: 686–693.

Mishra, A.K., P. Morang, M. Deka, S. Nishanth-Kumar, B.S. Dileep-Kumar. 2014. Plant growth-promoting rhizobacterial strain-mediated induced systemic resistance in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) through defense-related enzymes against brown root rot and charcoal stump rot. Appl Biochem Biotechnol. 174:506-521.

Mocali, S., A. Benedetti. 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. Res Microbiol. 161: 497-505.

Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497.

Nagendran, K., G. Karthikeyan, P. Mohammed-Faisal, P. Kalaiselvi, M. Raveendran, K. Prabakar, T. Raguchander. 2014. Exploiting endophytic bacteria for the management of sheath blight disease in rice. Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems. 30:8-23.

Nair, D.N., S. Padmavathy. 2014. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. T Scientific World J. 14:1-11.

Naz, R., M. Anis, H.A. El Atta. 2015. Micropropagation of *Cassia occidentalis* L. and the effect of irradiance on photosynthetic pigments and antioxidative enzymes. Biol. Plant. 59 (1): 1-10.

Nga, N.T.T., N.T. Giau, N.T. Long, M. Lübeck, N.P. Shetty, E. Neergaard, T.T.T. Thuy, P.V. Kim, H.J.L. Jorgensen. 2010. Rhizobacterially induced protection of watermelon against *Didymella bryoniae*. J Appl Microbiol. 109: 567-582.

Ngamau, C.N., V.N. Matiru, A. Tani, C.W. Muthuri. 2012. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. Afr. J. Microbiol. Res. 6(34): 6414-6422.

Ngoma, L., B. Esau, O.O. Babalola. 2013. Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng, South Africa. Afr. J. Biotechnol. 12(26): 4105-4114.

Nissinen, R.M., M.K. Mannisto, J.D. van Elsas. 2012. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific. FEMS Microbiol Ecol. 82: 510–522.

Nowak, J. 1998. Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. 34:122-130.

Okon, Y., S.L. Albrecht, 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.

Osório, M. L., S. Gonçalves, N. Coelho, J. Osório, A. Romano. 2013. Morphological, physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfer of micropropagated *Tuberaria* major plants. Plant Cell Tiss Organ Cult. 115:85–97.

Park, M., H. Lee, S.G. Hong, O. Kim. 2013. Endophytic bacterial diversity of an Antarctic moss, *Sanionia uncinata*. Antarct Sci. 25(1): 51-54.

Patel, D., M. Saraf. 2013. Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of *Jatropha curcas* L. under saline condition. Eur J Soil Biol. 55: 47-54.

Paynet, M., C. Martin, M. Girand. 1971. Activité phenylalanine ammonia lyase et hypersensibilite au virus de la mosaique du tabac. Académie des Sciences, Paris, p. 537–539.

Pérez, E., M. Sulbarán, M.M. Ball, L.A. Yarzábal. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the southeastern Venezuelan region. Soil Biol Biochem. 39: 2905-2914.

Perez-Rosales, E., L. Alcaraz-Meléndez, M.E. Puente, R. Vázquez-Juárez, E. Quiroz-Guzmán, T. Zenteno-Savín, E. Morales-Bojórquez. 2017. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with roots of jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneid). Curr. Sci. 112 (2): 1-6.

Perveen, S., M. Anis, I.M. Aref. 2013. Lipid peroxidation, H_2O_2 content, and antioxidants during acclimatization of *Abrus precatorius* to *ex vitro* conditions. Biol. Plant. 57 (3): 417-424.

Pikovskaya, R.I.1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17: 362-370.

Pineda, A., S. Zheng, J.J. Van-Loon, C. Pieterse, M. Dicke. 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. Trends Plant Sci. 15: 507-514.

Pious, T., S. Kumari, G.K. Swarna, T.K.S. Gowda. 2007. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host–endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. Can J Microbiol. 53: 380–390.

Puente, M.E., C.Y. Li, Y. Bashan. 2009a. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. Environ Exper Bot. 66 (3): 402-408.

Puente, M.E., C.Y. Li, Y. Bashan. 2009b. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. Environ Exper Bot. 66 (3): 389-401.

Rai, M.K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant. 37:158-167.

Ranzato, E., S. Martinotti, B. Burlando. 2011. Wound healing properties of jojoba liquid wax: An in vitro study. J Ethnopharmacol. 134: 443-449.

Rashid, S., T.C. Charles, B.R. Glick. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. Appl. Soil Ecol. 61: 217-224.

Reinhold-Hurek, B., T. Hurek. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. Plant Biol. 14:435-443.

Ribeiro, C.M., E.J. Nogueira-Cardoso. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucariaan gustifolia*). Microbiol. Res. 167:69-78.

Ruuhola, T., L. Nybakken, R. Julkunen-Tiitto. 2013. Sex-related differences of two ecologically divergent *Salix* species in the responses of enzyme activities to atmospheric CO_2 enrichment. Biol. Plant. 57 (4): 732-738.

Sáez, P.L., L.A. Bravo, K.L. Sáez, M. Sánchez-Olate, M.I. Latsague5, D.G. Ríos. 2012. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between *in vitro* and nursery plants. Biol. Plant. 56 (1): 15-24.

Schmeisser, C., H. Steele, W.R. Streit. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. Appl Microbiol Biotechnol. 75:955-962.

Senthilkumar, M., M. Madhaiyan, S.P. Sundaram, H. Sangeetha, S. Kannaiyan. 2008. Induction of endophytic colonization in rice (*Oryza sativa* L.) tissue culture plants by *Azorhizobium caulinodans*. Biotechnol. Lett. 30:1477–1487.

Souza, S.A., A.A. Xavier, M.R. Costa, A.M.S. Cardoso, M.C.T. Pereira, S. Nietsche. 2013. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. Genet Mol Biol. 36 (2): 252-264.

Stefan, M., N. Munteanu, V. Stoleru, M. Mihasan. 2013. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. Rom Biotech Lett. 18(2): 8132-8143.

Sun, H., Y. He, Q. Xiao, R. Ye, Y. Tian. 2013. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. Afr. J. Microbiol. Res. 7(16):1496-1504.

Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. In: Taniguchi N, Gutteridge, eds. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press, New York, p. 91–95.

Tamura, K., D.Peterson, N.Peterson, G.Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Thomas, J., D. Ajay, R. Raj-Kumar. 2010. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of *in vitro*-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. Plant Cell Tiss Organ Cult. 101:365–370.

Tonelli, M.L., F. Ibañez, T. Taurian, J. Argüello, A. Fabra. 2013. Analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene sequence from *Arachis hypogaea* L. and its transcript abundance in induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii*. J. Plant Pathol. 95(1): 191-195.

Vafadar, F., R. Amooaghaie, M. Otroshy. 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. J Plant Interact. 9(1): 128-136.

Valdés, M., N.O. Pérez, P. Estrada-de los Santos, J. Caballero-Mellado, J.J. Peña-Cabriales, P. Normand, A.M. Hirsch. 2005. Non-frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. Appl. Environ. Microbiol. 71(1): 460-466.

Van Elsas, J.D., F.G.H. Boersma. 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil ant the mycosphera. Eur J Soil Biol. 47:77-87.

Van-Horn, M.L., J.E. Barrett, M.N. Gooseff, A.E. Altrichter, K.M. Geyer, L.H. Zeglin, C.D. Takacs-Vesbach. 2013. Factors controlling soil microbial biomass and bacterial diversity and community composition in a cold desert ecosystem: role of geographic scale. PLoS One. 8(6): 1-12.

Varvara, P.G., B.R. Glick. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol Biochem. 39: 11-17.

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, S. Gianinazzi. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. Appl. Soil Ecol. 27:243-258.

Vestergard, M., L. Bjornlund, F. Henry, R. Ronn. 2007. Decreasing prevalence of rhizosphere IAA producing and seedling root growth promoting bacteria with barley development irrespective of protozoan grazing regime. Plant Soil. 295:115-125.

Walkley, A., I.A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid tritation method. Soil Science. 37: 29-38.

Yanti, Y. 2015. Peroxidase enzyme activity of rhizobacteria-introduced shallots bulbs to induce resistance of shallot towards bacterial leaf blight (*Xanthomonas axonopodis* pv *allii*). Procedia Chem. 14: 501-507.

Xiao-fei, L., S. Wei-min, L. Ze-qin, B. Rui-xue, L. Jing-xiao, S. Zi-han, G. Hongwei, Z. Ying, Z. Jun, Z. Gen-fa. 2013. Over-expression of ScMnSOD, a SOD gene derived from jojoba, improve drought tolerance in *Arabidopsis*. J Integr Agric. 12(10): 1722-1730.

Xinxian, L., C. Xuemei, C. Yagang, W.J. Woon-Chung, W. Zebin, W. Qitang. 2011. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. World J. Microbiol. Biotechnol. 27:1197-1207.

Zeng-Zhang, Y., E. Tao-Wang, M. Li, Q. Li, Y. Ming-Zhang, S. Zhao, X. Jia, L. Zhang, W. Chen, W. Xin-Chen. 2011. Effects of rhizobial inoculation, cropping systems and growth stages on endophytic bacterial community of soybean roots. Plant Soil. 347:147–161.

Zhou, W.J., M. Leul. 1999. Uniconazole-induced tolerance of rape plants to heat stress in relation to changes in hormonal levels, enzyme activities and lipid peroxidation. J Plant Growth Regul. 27: 99-104.