



Efecto del Azofert®-F en la respuesta estomática del frijol ante el déficit hídrico¹

Effect of Azofert®-F on the stomatal response of beans to water deficit

Wilfredo Estrada-Prado², Licet Chávez-Suárez², Yariuska Caridad Maceo-Ramos², Eduardo Jerez-Mompie³,
María Caridad Nápoles-García³

¹ Recepción: 21 de julio, 2020. Aceptación: 15 de octubre, 2020. Este trabajo forma parte de una tesis doctoral del primer autor, titulada “Efecto de la inoculación con Azofert®-F en la tolerancia de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al déficit hídrico”, la cual se encuentra respaldada y financiada por los proyectos Nacionales “Los rizobios como alternativa a la fertilización nitrogenada en Cuba”, y “Aplicación de tecnologías nucleares para la obtención de genotipos con mayor adaptación a los efectos del cambio climático (altas temperaturas, sequía, salinidad) en diferentes cultivos de importancia económica”.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”, Departamento de Investigaciones Agrícolas y Dirección de Investigaciones Agropecuarias. Carretera Vía Manzanillo Km 16 1/2, Bayamo, Granma, Cuba. estrada@dimitrov.cu (autor para la correspondencia; <https://orcid.org/0000-0001-8591-8133>), licet@dimitrov.cu (<https://orcid.org/0000-0002-7837-2168>), yariuska@dimitrov.cu (<https://orcid.org/0000-0002-1934-3412>).

³ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Carretera Tapaste km 3, Mayabeque, Habana, Cuba. ejerez@inca.edu.cu (<https://orcid.org/0000-0001-6509-8932>), tere@inca.edu.cu (<https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>).

Resumen

Introducción. El déficit hídrico es el estrés abiótico de mayor incidencia en el crecimiento y rendimiento de las plantas de frijol. Por ello, se buscan alternativas que permitan mitigar sus efectos adversos, como el uso de biofertilizantes a partir de la biodiversidad microbiana existente en el suelo. **Objetivo.** Se evaluó el efecto del inoculante Azofert®-F en el índice estomático (IE) de plantas de frijol en condiciones de estrés hídrico. **Materiales y métodos.** El experimento se desarrolló en el período 2016-2017 en un cuarto con lámparas fluorescentes del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Para el estudio anatómico la epidermis foliar se observó al microscopio óptico de luz (Motic) y se fotografió con una cámara acoplada. Las variables estomáticas se midieron mediante el programa morfométrico ImageJ y se procesaron con el paquete estadístico SPSS Versión 22.0. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Se seleccionaron diez plantas al azar por cada tratamiento para evaluar la densidad y el índice estomático. **Resultados.** El Azofert®-F incrementó el IE de los cultivares estudiados. La estructura de las células epidérmicas se alteró en ambas superficies foliares cuando disminuyó la humedad en el suelo; la densidad estomática se modificó con la presencia del producto. En la superficie abaxial las células oclusivas se mostraron más estrechas, lo que evidenció que las hojas de mayor IE presentaron estomas más pequeños. El Azofert®-F provocó que los estomas permanecieran semicerrados cuando hubo deficiencia hídrica en las plantas, debido a que estas bacterias ayudaron a aliviar el déficit hídrico mediante la producción de hormonas y otras enzimas que regulan la pérdida de agua por transpiración. **Conclusión.** La aplicación de Azofert®-F incrementó la densidad e índice estomático de plantas de frijol en condiciones de estrés hídrico.

Palabras claves: *Phaseolus vulgaris* L., biofertilizante, índice estomático, células epidérmicas.



Abstract

Introduction. Water deficit is the abiotic stress with the highest incidence on the growth and yield of bean plants. For this reason, alternatives are being sought to mitigate its adverse effects, such as the use of biofertilizers based on the microbial biodiversity existing in the soil. **Objective.** The effect of Azofert®-F inoculant on the stomatal index (IE) of bean plants was evaluated under water stress conditions. **Materials and methods.** The experiment was carried out in the period 2016-2017 in a room with fluorescent lamps of the Department of Plant Physiology and Biochemistry of the National Institute of Agricultural Sciences, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. For the anatomical study, the leaf epidermis was observed with an optical light microscope (Motic) and photographed with a coupled camera. Stomatal variables were measured using the ImageJ morphometric program and processed with the SPSS Version 22.0 statistical package. A completely randomized design was used. Ten plants were randomly selected for each treatment to evaluate density and stomatal index. **Results.** Azofert®-F increased the IE of the studied cultivars. The structure of the epidermal cells was altered in both leaf surfaces when the humidity in the soil decreased; the stomatal density was modified with the presence of the product. On the abaxial surface, the occlusive cells were narrower, which showed that the leaves with the highest IE had smaller stomata. The Azofert®-F caused the stomata to remain semi-closed when there was a water deficiency in the plants, because these bacteria helped to alleviate the water deficit by producing hormones and other enzymes that regulate the loss of water through transpiration. **Conclusion.** The application of Azofert®-F increased the density and stomatal index of bean plants under conditions of water stress.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L., biofertilizer, stomatic index, epidermal cells.

Introducción

La superficie epidérmica foliar presenta un gran número de poros microscópicos llamados estomas. La apertura de los estomas se controla a través de los cambios en el tamaño y la forma de dos células especializadas, llamadas células oclusivas, que flanquean la apertura estomática y poseen una estructura característica que les permite regular la apertura del poro estomático (Taiz & Zeiger, 2006). Estas estructuras se encuentran en todas las partes aéreas de la planta, con mayor abundancia en las hojas, dado que la epidermis y la cutícula de los órganos aéreos forman una capa continua y los estomas son las discontinuidades por donde la planta realiza la mayor parte del intercambio de O₂, CO₂, vapor de agua y otros gases (Clément et al., 2011).

La forma de los estomas es distintiva entre diferentes grupos de plantas, es muy conocida la diferencia entre mono y dicotiledóneas. Los patrones de desarrollo y estructura estomática han sido abordados en diversos estudios (Ogaya et al., 2011), así como la respuesta de los estomas en cuanto a tamaño, apertura y densidad en función de la concentración de CO₂ (Zhou et al., 2013), intensidad de la luz (Čaňová et al., 2012) régimen hídrico (Lake & Woodward, 2008) y variación de la temperatura (Álvarez & Reynaldo, 2015; Zhao et al., 2006).

El déficit hídrico en las plantas genera el cierre de estomas y disminuye la entrada del CO₂, lo cual reduce la tasa fotosintética (Dubberstein et al., 2018). De manera que este carácter es susceptible a cambiar en ciertas etapas de crecimiento de la planta o en respuesta a diversos estímulos ambientales (O’Carrigan et al., 2014; Yang et al., 2014).

En función de la disponibilidad de agua, las plantas ajustan la densidad, la cantidad de hojas y la distribución de los estomas. Estos últimos establecen un control sobre el gasto del agua a lo largo del día en función de la cantidad de luz, temperatura y disponibilidad del agua en las hojas (Quintana et al., 2017).

Las legumbres que comúnmente se asocian a los rizobios, en condiciones de déficit hídrico, mantienen su contenido de agua en las hojas y evitan la deshidratación del tejido, además regulan su conductancia estomática, la abscisión de las hojas y el cierre estomático (Polania et al., 2016; Zegaoui et al., 2017). Esto conduce posteriormente

a una disminución en las concentraciones internas de CO₂, lo que limita la fotosíntesis y el crecimiento de los brotes. El control estomático o regulación estomática, es un fenómeno de suma importancia para las plantas, debido a que permite evitar la deshidratación y asegurar la entrada de CO₂ (Dell' Amico et al., 2017).

En la búsqueda de alternativas para aumentar la producción de alimentos surgen diversos productos naturales, entre los que se encuentran los biofertilizantes. Estos bioproductos han mostrado la capacidad de estimular el crecimiento, el desarrollo y el rendimiento vegetal y de permitir a las plantas tolerar situaciones de estrés (Khan et al., 2019). En tal sentido Azofert®-F es un inoculante a base de bacterias del género *Rhizobium*, capaz de asociarse con las plantas leguminosas y formar nódulos en sus raíces, dentro de los cuales fijan el nitrógeno del aire y lo brindan directamente a la planta (Nápoles et al., 2016). Los inoculantes bacterianos tienen la capacidad de producir hormonas como ABA, AIA, fijar el nitrógeno atmosférico al suelo, solubilizar el fósforo y además de presentar actividad con la enzima ACC desaminasa que regula los niveles de etileno para evitar la pérdida de agua, por tanto, disminuye la densidad y cierre estomático.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del Azofert®-F en la densidad e índice estomático de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de estrés hídrico.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el periodo 2016 - 2017, en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), perteneciente al Ministerio de Educación Superior, Cuba. Se utilizó para el desarrollo del experimento un suelo pardo mullido sin carbonatos, según la Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba (Hernández et al., 2015), el mismo se obtuvo del Huerto Intensivo Las Celias, situado en el municipio Guisa, provincia Granma, Cuba, perteneciente al Ministerio de Agricultura. Se emplearon semillas comerciales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de dos variedades, con diferentes grados de tolerancia a la sequía: CC-25-9 Roja (Tolerante) y Tomeguín-93 Negra (Susceptible), de acuerdo con Baldoquín (2015) y Estrada et al. (2016), respectivamente. Las principales características de las variedades se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Algunas características de las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) CC-25-9 (Roja) como tolerante a la sequía y Tomeguín-93 (Negra) como susceptible, utilizadas en la evaluación del efecto del Azofert®-F en la densidad e índice estomático, en condiciones de estrés hídrico (Faure et al., 2014). Cuba. 2017.

Table 1. Some characteristics of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties CC-25-9 (Red) as drought tolerant and Tomeguín-93 (Black) as susceptible, used in the evaluation of the effect of Azofert®-F on density and stomatal index, under water stress conditions (Faure et al., 2014). Cuba. 2017.

Variedades	Días después de la siembra			Hábito Cto.	Long. tallo principal (cm)	Masa de 100 semillas (g)	Rend. potencial kg ha ⁻¹
	Flor	Madurez fisiológica	Madurez cosecha				
CC-25-9 (Roja)	35	72	86	III	40,0	17	3 300
Tomeguín-93 (Negra)	38	69	80	II	70,0	17	2 987

Crecimiento (Cto): II- Indeterminado arbustivo; III- Indeterminado postrado. / Growth (Cto): II- Indeterminate bush; III- Indeterminate prostrate.

Se empleó el biofertilizante Azofert®-F (Az), producido y comercializado por el INCA y compuesto por la cepa *Rhizobium radiobacter* Hg, procedente del cepario del Instituto de Suelos del Ministerio de Agricultura, Cuba y por lipoquitinolisacáridos o factores de nodulación. Al momento de su empleo el producto contenía una concentración bacteriana de 6×10^8 UFC ml⁻¹.

El experimento se realizó en un cuarto de luces con lámparas fluorescentes, bajo condiciones controladas para evitar el efecto de las precipitaciones y el rocío, con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad, a 24 ± 2 °C de temperatura y 67 % de humedad relativa. Se utilizaron recipientes plásticos de 7,5 cm de diámetro y 9,5 cm de altura, con un volumen de 357 cm³ y con perforaciones en el fondo para posibilitar el drenaje. En cada recipiente se depositaron 400 g de suelo. El mismo se repitió dos veces en el tiempo.

Semillas de ambas variedades se separaron en dos grupos para la siembra, uno que no fue inoculado y otro se inoculó con Azofert®-F, a razón de 200 ml del biofertilizante por cada 50 kg de semilla en el momento de la siembra (Nápoles, 2003).

Desde la siembra se mantuvieron los recipientes a capacidad máxima de retención de humedad, la cual se evaluó por el método gravimétrico con pesajes cada 24 h, añadiéndose el agua perdida por evapotranspiración. A partir de los 15 días después de la siembra (DDS), fase en que apareció la primera hoja trifoliada, las plantas se sometieron a dos condiciones de humedad, consistentes en: H₁: Humedad al 100 % y H₂: Humedad al 50 % de la capacidad máxima de retención (déficit hídrico).

Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma:

- T1:** CC-25-9 Roja + Humedad al 100 % + Azofert®-F
- T2:** CC-25-9 Roja + Humedad al 100 % - Azofert®-F
- T3:** CC-25-9 Roja + Humedad al 50 % + Azofert®-F
- T4:** CC-25-9 Roja + Humedad al 50 % - Azofert®-F
- T5:** Tomeguín-93 Negra + Humedad al 100 % + Azofert®-F
- T6:** Tomeguín-93 Negra + Humedad al 100 % - Azofert®-F
- T7:** Tomeguín-93 Negra + Humedad al 50 % + Azofert®-F
- T8:** Tomeguín-93 Negra + Humedad al 50 % - Azofert®-F

Por cada tratamiento se utilizaron diez recipientes con una planta en cada uno, para un total de ochenta plantas en el experimento. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para la distribución de los tratamientos.

A los 24 y 31 DDS se tomaron diez plantas por tratamiento y se les realizaron las siguientes evaluaciones:

Densidad estomática ($\mu(\text{mm}^2)^{-1}$) e índice estomático (%): para la determinación de la densidad estomática (DE) e índice estomático (IE) se tomaron muestras de diez hojas por cada tratamiento, se escogió la tercera hoja trifoliada en cada planta. Las impresiones epidérmicas abaxiales se obtuvieron con una mezcla de poliestireno-xilol, la cual se aplicó sobre la superficie foliar, después de secada la capa se removió con cinta adhesiva transparente y se colocó en un portaobjetos para su observación en un microscopio Carl Zeiss, a 400x. En cada impresión se contó el número de estomas y de células epidérmicas típicas, en un área de 0,63 mm², mediante la metodología descrita por Rodés & Collazo (2006) y las ecuaciones 1, 2 y 3:

$$DE = Ne / Ac \quad (1)$$

Donde:

DE: densidad estomática.

Ne: número de estomas por campo.

Ac: área del campo (μm^2).

$$Ac = (Ndd \times 10^2) (\pi) \quad (2)$$

Donde:

Ndd : número de divisiones del diámetro, $(\pi) = 3,14$.

$$IE = (NEc / NCe) \times 100 \quad (3)$$

Donde:

IE = índice estomático (%).

NEc = número de estomas por campo.

NCe = número de células epidérmicas típicas por campo.

Los datos obtenidos en el experimento se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS 22,0 para Windows. Se realizó un análisis de varianza de clasificación doble con arreglo factorial, se tuvo en cuenta los factores humedad, variedades y fertilización. Las medias se compararon según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados

El análisis estadístico mostró interacción significativa solo entre los factores nivel de humedad-inoculación para todas las variables evaluadas, donde aparecen los valores de F (Fischer) calculados. Los valores medios de las dos repeticiones en el tiempo se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Interacción entre los factores nivel de humedad-inoculación con Azofert®-F., para todas las variables evaluadas en dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) CC-25-9 Roja como tolerante a la sequía y Tomeguín-93 Negra como susceptible (análisis de varianza $p \leq 0,05$). Cuba. 2017.

Table 2. Interaction between moisture level-inoculation factors with Azofert®-F., for all the evaluated variables in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties: CC-25-9 Red as drought tolerant and Tomeguín-93 Black as susceptible (analysis of variance $p \leq 0.05$). Cuba. 2017.

Efecto	DE 24DDS	DE 31DDS	IE 24 DDS	IE 31 DDS
Intercepto	108.14*	135.20*	104.58*	116.70*
Variedades	127.08*	130.00*	111.96*	121.72*
Humedad	104.60*	112.00*	136.92*	142.77*
Azofert	117.00*	126.00*	140.84*	154.16*
Variedades*Humedad	15.60ns	17.75ns	12.10ns	15.29ns
Variedades*Azofert	17.07ns	19.33ns	13.22ns	16.16ns
Humedad*Azofert	147.00*	155.40*	153.20*	164.22*
Variedades*Humedad*Azofert	16.50ns	18.24ns	15.36ns	17.37ns

DE: densidad estomática; IE: índice estomático / DE: stomatal density; IE: stomatal index.

La respuesta de la densidad estomática y el índice estomático en la epidermis abaxial de las hojas en las dos variedades de frijol, inoculadas y no inoculadas, para las dos condiciones de abastecimiento hídrico se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Comportamiento de la densidad estomática y el índice estomático en la epidermis abaxial de dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): CC-25-9 Roja como tolerante a la sequía y Tomeguín-93 Negra como susceptible, con y sin inocular con con Azofert®-F y expuestos a dos niveles de humedad, a los 24 y 31 DDS. Cuba, 2017.

Table 3. Behavior of stomatal density and stomatal index in the abaxial epidermis of two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties: CC-25-9 Red as drought tolerant and Tomeguín-93 Black as susceptible, with and without inoculation with with Azofert®-F and exposed to two humidity levels, at 24 and 31 DDS. Cuba, 2017.

Tratamientos	Densidad estomática (u(mm ²) ⁻¹)		Índice estomático (%)	
	24 DDS	31 DDS	24 DDS	31 DDS
Variedad CC-25-9 Roja				
H ₁ Az	14,60 ^c	20,63 ^c	21,79 ^c	25,99 ^c
H ₁ noAz	9,05 ^d	15,87 ^d	15,93 ^d	22,71 ^d
H ₂ Az	24,29 ^a	30,16 ^a	27,65 ^a	30,16 ^a
H ₂ noAz	19,68 ^b	25,40 ^b	25,08 ^b	28,06 ^b
ESx	0,78 ^{**}	0,67 ^{**}	0,55 ^{**}	0,44 ^{**}
Variedad Tomeguín-93 Negra				
H ₁ Az	12,70 ^c	19,05 ^c	19,99 ^c	24,99 ^c
H ₁ noAz	7,94 ^d	14,29 ^d	14,66 ^d	21,41 ^d
H ₂ Az	22,86 ^a	28,57 ^a	26,95 ^a	29,50 ^a
H ₂ noAz	17,46 ^b	23,81 ^b	23,39 ^b	27,26 ^b
ESx	0,73 ^{**}	0,67 ^{**}	0,77 ^{**}	0,57 ^{**}

Az: Inoculado con Azofert®-F, noAz: no inoculado con Azofert®-F, H1: humedad al 100 %, H2: humedad al 50 %. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan para $p \leq 0,05$ / Az: inoculated with Azofert®-F, no Az: not inoculated with Azofert®-F, H1: moisture at 100 %, H2: moisture at 50 %. Means with equal letters do not differ statistically according to Duncan's multiple range test for $p \leq 0,05$.

Tanto a los 24 como a los 31 DDS se observó respuesta similar de las variedades para ambas variables. Los mayores valores se alcanzaron en las plantas de los tratamientos inoculados con Azofert®-F y que recibieron un aporte de agua del 50 % de la capacidad máxima de retención de humedad, seguido por aquellas que tuvieron igual condición de humedad, sin inocular; ambos tratamientos fueron los mejores bajo estrés. Lo anterior sugiere que el déficit hídrico podría ser el responsable de las respuestas observadas y no el Azofert®-F. Los menores valores para estas variables se obtuvieron en las plantas que recibieron el 100 % de la humedad sin la inoculación con Azofert®-F. La inoculación con *Rhizobium radiobacter* y el déficit hídrico incrementaron la densidad estomática y el índice estomático (Figura 1).

El Azofert®-F incrementó el índice estomático (IE) de los cultivares estudiados. La estructura de las células epidérmicas se alteró en ambas superficies foliares cuando disminuyó la humedad en el suelo; mientras que la densidad estomática se modificó con la presencia del producto. En la superficie abaxial, las células oclusivas se mostraron más estrechas, lo que evidenció que las hojas de mayor índice estomático presentaron estomas más pequeños. El Azofert®-F provocó que los estomas permanecieran semicerrados cuando hubo deficiencia hídrica en las plantas, debido a que estas bacterias ayudan a las plantas a aliviar el déficit hídrico mediante la producción de hormonas y otras enzimas que regulan la pérdida de agua por transpiración.

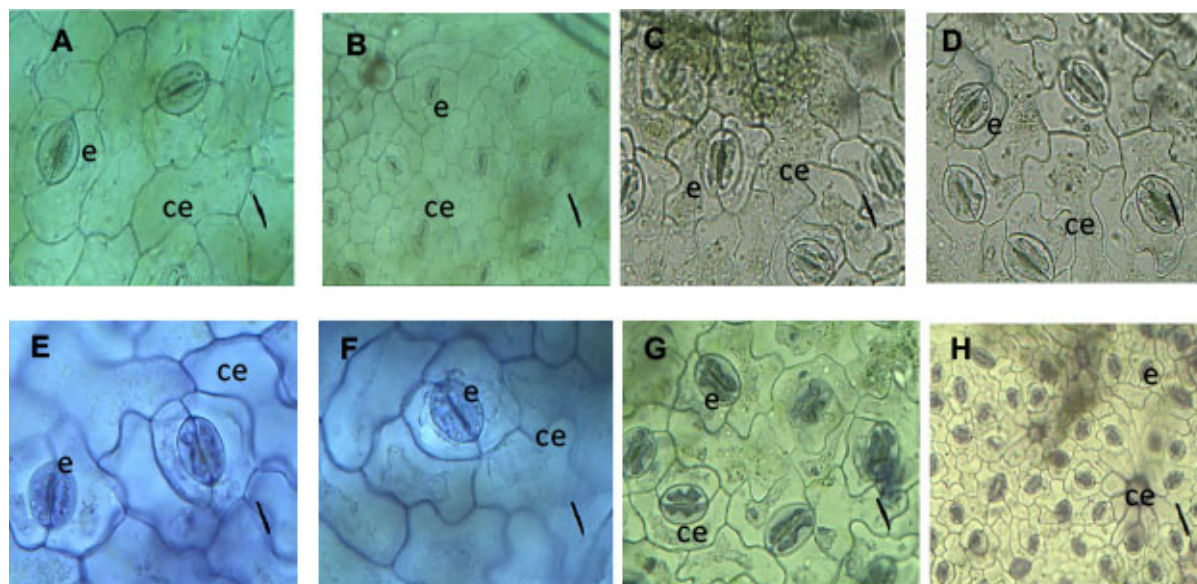


Figura 1. Microfotografías de la epidermis foliar de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con Azofert®-F (A, C) y no inoculadas (B, D) con el 100 % de humedad (H1), inoculadas con Azofert®-F (E, G) y no inoculadas (F, H) con el 50 % de humedad (H2). Variedades CC-25-9R y Tomeguín-93. Cuba, 2017.

(A, B, E, F) superficie abaxial y (C, D, G, H) Superficie adaxial al 50 % de Humedad, e: estomas, ce: células epidérmicas.

Figure 1. Photomicrographs of the foliar epidermis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with Azofert®-F (A, C) and not inoculated (B, D) with 100 % humidity (H1), inoculated with Azofert®-F (E, G) and not inoculated (F, H) with 50 % humidity (H2). Varieties CC-25-9R y Tomeguín-93. Cuba, 2017.

(E, F) abaxial surface and (G, H) adaxial surface at 50% humidity, e: stomata, ce: epidermal cells.

Discusión

Las plantas responden al estrés hídrico mediante adaptaciones evolutivas a nivel anatómico, morfológico y celular (Florido & Bao, 2014). En tal sentido, los valores informados en esta investigación y los incrementos en la densidad e índice estomático de plantas de frijol ante condiciones de estrés por déficit hídrico se encontraron en relación con lo obtenido por Gan et al. (2010), quienes obtuvieron incrementos significativos en la densidad e índice estomático en plantas de frijol ante condiciones de déficit hídrico. De manera similar, en una investigación se encontró un aumento de estas variables en plantas de alfalfa en condiciones de estrés hídrico (Han et al., 2017). Otros autores refieren un comportamiento similar en plantas de café (Quintana et al., 2017) y lenteja (Sánchez et al., 2018). Se plantea que las plantas de frijol ante el estrés por déficit hídrico aumentan la densidad estomática para evitar la pérdida de agua por transpiración (Torabian et al., 2018; Nemeskéri et al., 2018). Aunque, a medida que se intensifica el estrés hídrico, los cultivares tolerantes a sequía sobreviven por el cierre estomático (Pungulani et al., 2013).

El inoculante Azofert®-F provocó un efecto positivo en la densidad e índice estomático, tanto en condiciones de humedad como de déficit hídrico. La transpiración y la intensidad de la respiración en las plantas es directamente proporcional al número y abertura de los estomas, variables que influyen directamente en la regulación del intercambio gaseoso y en la tasa fotosintética de las plantas (Álvarez & Reynaldo, 2015).

Conclusiones

La aplicación de Azofert®-F influyó positivamente en la densidad e índice estomático de plantas de frijol en condiciones de estrés hídrico.

La inoculación con Azofert®-F en esta investigación, no solo garantizó la presencia de *Rhizobium radiobacter* como microsimbionte, sino también de altas concentraciones de estos determinantes, con su efecto nodulante y antiestrés. La inoculación con Azofert®-F garantizó la producción de hormonas que juegan un papel esencial en mitigar las condiciones adversas de déficit hídrico.

Referencias

- Álvarez, I., & Reynaldo, I. (2015). Efecto del Pectimorf® en el índice estomático de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Cultivos Tropicales*, 36(3), 82-87.
- Baldoquín, M. (2015). *Efecto de la sequía sobre el rendimiento y sus componentes de genotipos de frijol común (Phaseolus vulgaris L) en condiciones de campo* [Tesis de Maestría, sin publicar]. Universidad de Granma.
- Čaňová, I., Ďurkovič, J., Hladká, D., & Lukáčik, I. (2012). Changes in stomatal characteristics and photochemical efficiency during leaf development in six species of *Sorbus*. *Photosynthetica*, 50(4), 635-640. <https://dx.doi.org/10.1007/s11099-012-0063-1>
- Clément, M., Leonhardt, N., Droillard, M. J., Reiter, I., Montillet, J. L., Genty, B., Laurière, C., Nussaume, L., & Noël, L. D. (2011). The Cytosolic/Nuclear HSC70 and HSP90 Molecular Chaperones Are Important for Stomatal Closure and Modulate Abscisic Acid-Dependent Physiological Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(3), 1481-1492. <https://dx.doi.org/10.1104/pp.111.174425>
- Dell' Amico, Morales, D., Jerez, E., Rodríguez, P., & Álvarez, I. (2017). Efecto de dos variantes de riego y aplicaciones foliares de Pectimorf® en el desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Cultivos Tropicales*, 38(3), 129-134.
- Dubberstein, D., Rodrigues, W., Smedo, Rodrigues, J., Pais, I., Leitão, A., Partelli, Camprostrini, E., Reboredo, F., Scotti, P., Lidon, F., Ribeiro, A., DaMatta, F., & Ramalho, J. (2018). Mitigation of the negative impact of warming on the coffee crop: The role of increased air [CO₂] and management strategies. In A. Shanker, C. Shanker, & C. Srinivasarao (Eds.), *Climate resilient agriculture - Strategies and perspectives* (p. 57-85). IntechOpen <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72374>
- Estrada, W., Jerez, E., Nápoles, M. C., Sosa, A., Maceo, Y., & Cordoví, C. (2016). Respuesta de cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la sequía utilizando diferentes índices de selección. *Revista Cultivos Tropicales*, 37(3), 79-84.
- Faure, B., Benitez, R., Rodriguez, E., Grande, O., Torres, M., & Pérez, P. (2014). *Guía Técnica para la producción de frijol común y maíz*. Ministerio de la Agricultura.
- Florido, M., & Bao, L. (2014). Tolerancia al estrés por déficit hídrico en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 35(3), 70-88.
- Gan, Y., Zhou, L., Shen, Z. J., Shen, Z. X., Zhang, Y. Q., & Wang, G. X. (2010). Stomatal clustering, a new marker for environmental perception and adaptation in terrestrial plants. *Botanical Studies*, 51(3), 325-336.

- Han, R., Gao, G., Li, Z., Dong, Z., & Guo, Z. (2017). Effects of exogenous 5-aminolevulinic acid on seed germination of alfalfa (*Medicago varia* Martyn.) under drought stress. *Japanese Society of Grassland Science*, 64(2),1-8. <https://dx.doi.org/10.1111/grs.12189>
- Hernández, A., Pérez, J., Bosch, D., & Castro, N. (2015). *Clasificación de los suelos en Cuba 2015*. Ediciones INCA.
- Khan, N., Bano, A., Shahid M. A., Nasim W., & Babar, M. D. A. (2019). Interaction between PGPR and PGR for water conservation and plant growth attributes under drought condition. *Biologia. Review. Plant Science and Biodiversity Centre*, 73, 1083-1098. Springer. <https://dx.doi.org/10.2478/s11756-018-0127-1>
- Lake, J. A., & Woodward, F. I. (2008). Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist*, 179(2), 397-404. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02485.x>
- Nápoles, M. C. (2003). *Inducción de la nodulación en soya (Glycine max L Merrill) por Bradyrhizobium sp. Influencia del medio de cultivo* [Tesis de Post Doctoral, sin publicar]. Universidad de La Habana.
- Nápoles, M. C., Cabrera, J. C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández, I., Martínez, L., & Núñez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4466.8405>
- Nemeskéri, E., Molnár, K., Pék, Z., & Helyes, L. (2018). Effect of water supply on the water use-related physiological traits and yield of snap beans in dry seasons. *Irrigation Science*, 36, 143-158. <https://dx.doi.org/org/10.1007/s00271-018-0571-2>
- O'Carrigan, A., Hinde, E., Lu, N., Xu, X. Q., Duan, H., Huang, G., Mak, M., Bellotti, B., & Chen, Z. H. (2014). Effects of light irradiance on stomatal regulation and growth of tomato. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 65-73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.007>
- Ogaya, R., Llorens, L., & Peñuelas, J. (2011). Density and length of stomatal and epidermal cells in «living fossil» trees grown under elevated CO₂ and a polar light regime. *Acta Oecologica*, 37(4), 381-385. <https://dx.doi.org/10.1016/j.actao.2011.04.010>
- Polania, J., Poschenrieder, C., Rao, I. & Beebe, S. (2016). Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixation ability of common bean under drought stress using 15N natural abundance in grain. *European Journal of Agronomy*, 79, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.05.014>
- Pungulani, L. L. M., Millner, J. P., Williams, W. M., & Banda, M. (2013). Improvement of leaf wilting scoring in cowpea (*Vigna sinensis* (L.) Walp.): From qualitative scale to quantitative index. *Australian Journal of Crops Science*, 7(9), 1262-1269.
- Quintana, A., Iracheta, L., Méndez, I., & Alonso, M. (2017). Caracterización de genotipos elite de *Coffea canephora* por su tolerancia a la sequía. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 183-198. <https://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.23874>
- Rodés, G. R., & Collazo, O. M. (2006). *Manual de prácticas de fotosíntesis*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez, D., Cervera, M. T., Escolano-Miguel, A., Velez, M. D., de María, N., Díaz, L., Sánchez, R., Aranda, I., & Guevara, M. A. (2018). Drought escape can provide high grain yields under early drought in lentils. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 31, 273-286. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0136-z>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology* (4th Ed.). Palgrave Macmillan.

- Torabian, S., Reza, M. S., Mohammadi, A. D., & Toorchi, M. (2018). Exogenous spermidine affected leaf characteristics and growth of common bean under water deficit conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(11), 1289-1301. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1457157>
- Yang, X., Yang, Y., Ji, C., Feng, T., Shi, Y., Lin, L., Ma, J., & He, J. S. (2014). Large-scale patterns of stomatal traits in Tibetan and Mongolian grassland species. *Basic and Applied Ecology*, 15(2), 122-132. <https://dx.doi.org/10.1016/j.baae.2014.01.003>
- Zegaoui, Z., Planchais, S., Cabassa, C., Djebbar, R., Belbachir, O. A., & Carol, P. (2017). Variation in relative water content, proline accumulation and stress gene expression in two cowpea landraces under drought. *Journal of Plant Physiology*, 218, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.07.009>
- Zhao, X., Dai, X., Wang, G., Shen, Z., Zhang, H., & Qiu, M. (2006). Developmental mechanism and distribution pattern of stomatal clusters in *Cinnamomum camphora*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(3), 310-315. <https://dx.doi.org/10.1134/S1021443706030046>
- Zhou, Y., Jiang, X., Schaub, M., Wang, X., Han, J., Han, S., & Li, M. H. (2013). Ten-year exposure to elevated CO₂ increases stomatal number of *Pinus koraiensis* and *P. sylvestrifomis* needles. *European Journal of Forest Research*, 132(5-6), 899-908. <https://dx.doi.org/10.1007/s10342-013-0728-8>.