



Nota Fitopatológica

Efecto bioestimulante de cepas nativas de *Trichoderma* en la germinación de cuatro variedades de albahaca

Juanita Guadalupe Hollman-Aragón, Mirella Romero-Bastidas*, Pablo Misael Arce-Amezquita, Alejandro Palacios-Espinosa, Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Carretera al Sur, km 5.5, La Paz, B.C.S. Apartado Postal 19-B, México.

RESUMEN

*Autor de
correspondencia:
Mirella Romero-Bastidas
miromero@uabcs.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
15 Marzo, 2023

Aceptado:
09 Diciembre, 2023

Publicado:
19 Diciembre, 2023

Cita:
Hollman-Aragón JG,
Romero-Bastidas M,
Arce-Amezquita PM
and Palacios-Espinosa
A. 2024. Efecto
bioestimulante de cepas
nativas de *Trichoderma* en
la germinación de cuatro
variedades de albahaca.

Revista Mexicana de
Fitopatología 42(1): 3.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2303-1>

Objetivos/antecedentes. *Trichoderma* es una herramienta eficiente como bioestimulante en cultivo de albahaca. Sin embargo, solo algunas especies han sido estudiadas sobre cultivares específicos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la eficacia bioestimulante de cepas nativas de *Trichoderma* sobre la germinación y crecimiento de cuatro variedades de albahaca.

Materiales y Métodos. En el estudio se utilizaron seis especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *atroviride*, *viride*, *longibrachiatum*, *harzianum*, *koningii* y *Trichoderma sp.*), una cepa de *Trichoderma* comercial (*T. harzianum*), fertilizante sintético (T17) y el control. 30 semillas de las variedades Purple Ruffles, Lemon, Siam Queen y Nufar fueron tratadas con una suspensión de esporas de cada *Trichoderma*. 48 h después, las semillas se sembraron e incubaron a 28 °C con un fotoperíodo de 12 h luz/oscuridad. Las variables a evaluar fueron; Tasa y porcentaje de germinación, biomasa y longitud de plántulas.

Resultados. *T. atroviride* presentó el mayor efecto bioestimulante en germinación. Mientras que *T. asperellum* registró una eficacia incrementada en biomasa y longitud de la planta en las cuatro variedades. La acción del *T.* comercial fue menor en todos los casos.

Conclusión. Este estudio demuestra que las cepas nativas de *Trichoderma* poseen efecto bioestimulante en las plantas y presentan mayor eficacia que las especies de tipo comercial.

Palabras clave: Antagonista, *in vitro*, crecimiento vegetativo.



La albahaca (*Ocimum basilicum*) pertenece a la familia de las Lamiaceas (Prinsi *et al.*, 2020). Actualmente se considera un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial (Trettel *et al.*, 2018). Se espera que el consumo de hojas de albahaca incremente de 57 a 62 millones de dólares entre el 2021 y 2026 (Absolute Reports, 2020; Sipos *et al.*, 2021). Generalmente, se cultiva en las regiones mediterráneas de Europa, así como en Asia, África y áreas tropicales y subtropicales de América (Baczek *et al.*, 2019). En México, Baja California Sur, es el estado productor de mayor importancia, al presentar una superficie de siembra de 389.00 ha con una producción de 3,103.42 t y un valor cercano a 49 231.22 (SIAP, 2019). El valor comercial se debe a sus propiedades farmacéuticas, culinarias y medicinales (Vieira *et al.*, 2014), las cuales dependen de la producción de aceites esenciales como el linalol, epi- α -cadinol, α -bergamoteno, γ -cadineno, germacreno-D y alcanfor (Hussain *et al.*, 2020). La germinación es la etapa crucial del ciclo vegetal, ya que depende de factores intrínsecos (Madurez, viabilidad y latencia) y extrínsecos (Temperatura, sustrato, intensidad lumínica y humedad), los cuales limitan o promueven el establecimiento de la plántula sobre un sustrato (Bécquer *et al.*, 2017). El uso de tratamientos pregerminativos permite acelerar y homogenizar la germinación, entre los cuales se cuentan la escarificación mecánica, térmica y química, la deshidratación, la imbibición, y los reguladores de crecimiento (Hernández *et al.*, 2017). En este contexto, el uso de microorganismos con propiedades bioestimulantes, se considera un elemento importante como parte de una estrategia agrícola sostenible (Fiorentino *et al.*, 2018).

Actualmente el hongo *Trichoderma*, ha llamado la atención en la agricultura no solo como biocontrolador de microorganismos fitopatógenos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), sino también como bioestimulante vegetativo, debido a su capacidad de colonizar de una manera acelerada las raíces, incrementar la biomasa de la planta y estimular la exudación de importantes fitohormonas como el ácido indolacético (AIA) (Acurio y España, 2016; Bader *et al.*, 2020). Además, diversos estudios han reportado su efecto positivo en la mejora de la germinación y viabilidad de las semillas (Ty'skiewicz *et al.*, 2022). Las propiedades bioestimulantes son atribuidas principalmente a especies como *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. viride*, y *T. harzianum* (Losada y Moreno, 2021). Sin embargo, se ha confirmado que no todas las cepas han mostrado el efecto deseado, debido a baja capacidad de adaptación a las áreas de aplicación (Savin-Molina, 2021). Al respecto, algunas investigaciones han sugerido incrementar el uso de cepas nativas aisladas de la misma región de los sistemas de producción de interés (Cubillos *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013). De esta manera se garantiza una mayor eficacia en su acción, al poseer mayor habilidad metabólica que las hace eficientes productoras de celulasas y quitinasas (Wang *et al.*, 2017). Además, la producción de sustancias asociadas a fitohormonas se ve incrementada (Illescas *et al.*, 2021). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue

evaluar la eficacia de cepas de *Trichoderma* nativas de zonas áridas como bioestimulante en la germinación y crecimiento del cultivo de albahaca.

Durante el 2022, se realizó una investigación en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABC), en el municipio de La Paz, Baja California Sur, México ($24^{\circ}06'03''N$ $110^{\circ}18'54''O$). Las variedades de albahaca utilizadas fueron: Purple Rufles, Lemon, Siam Queen y Nufar. Las semillas fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y del proveedor de semillas Vis Seed Co. Las cepas de *Trichoderma* nativas evaluadas fueron *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *Trichoderma* sp. y una cepa comercial de la especie *harzianum*. Dichas cepas fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Fitopatología del Departamento Académico de Agronomía, aisladas previamente de la rizósfera de plantas desérticas de la región e identificadas (Savin-Molina *et al.*, 2021). Estas fueron, reactivadas y purificadas en medio Agar Dextrosa y Papa (PDA) (BD BIOXON) e incubadas a 28°C en oscuridad constante. Una suspensión de conidios en cada especie de *Trichoderma* fue realizada mediante el raspado de esporas a partir de cepas puras de siete días de crecimiento. La concentración de esporas correspondiente a cada cepa se contabilizó mediante el uso de la cámara de Neubauer (SUPE®IOR/GERMANY) y dicha solución acuosa fue empleada para el tratamiento de las semillas (Singh *et al.*, 2016). 30 semillas de albahaca, correspondiente a cada variedad fueron depositadas en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, donde se les agregó 1 mL de la suspensión de esporas de cada *Trichoderma* a una concentración de 6×10^8 esporas mL⁻¹. Como grupos control se incluyó un tratamiento a base de fertilizante sintético (T17) (1g L⁻¹ agua) y otro solo con agua destilada estéril. Las semillas tratadas se dejaron reposar por 48 h y enseguida se extrajeron y sembraron en cámaras húmedas consistentes en cajas Petri estériles de 8 cm de diámetro a las que se le colocaron papel filtro estéril (Watman No. 4). Las cajas fueron dispuestas al azar en una cámara de germinación convencional con un fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad a una temperatura de 28°C (Verma *et al.*, 2007). Para determinar el efecto bioestimulante de las cepas de *Trichoderma* sobre las semillas de albahaca, se realizaron conteos de la germinación cada 24 h durante 15 días después de la siembra (dds). Las variables a evaluar fueron la tasa de germinación, mediante el registro del número de semillas germinadas a través del tiempo, así como el porcentaje de germinación a los 15 dds, siguiendo la fórmula propuesta por Mukhtar (2008): germinación (%) = No. de semillas germinadas/total de semillas evaluadas por 100. Una vez evaluada la germinación, se determinaron las variables morfométricas asociadas a la longitud de raíz y tallo, así como la biomasa fresca y seca en las plántulas de albahaca. Para determinar la longitud se utilizó una regla común y la medición se realizó a partir del epicótilo hasta el meristemo apical del tallo o raíz. La biomasa fresca de las plántulas se obtuvo mediante el uso

de una balanza analítica (OHAUS). Posteriormente, éstas se depositaron en bolsas de papel y se colocaron en un horno de secado (BLUE M) a una temperatura de 60 °C durante 24 h. Trascurrido ese tiempo se obtuvo el peso seco de las mismas (Nieto-Garibay *et al.*, 2009). El experimento se realizó bajo un diseño completo al azar, con 10 tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento para cada variedad, donde cada unidad experimental constó de una caja Petri con 30 semillas de albahaca. El modelo matemático utilizado fue el siguiente:

$$y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$$

Donde, y_{ij} es la respuesta de la variable morfométrica bajo el i -ésimo tratamiento, en la j -ésima repetición;

m es la media general del experimento;

t_i es el efecto del i -ésimo tratamiento;

e_{ij} es el error experimental

Para el análisis estadístico de la tasa y porcentaje de germinación se realizó una regresión logística binaria. Mientras que para las variables morfométricas se utilizó un ANOVA y en su caso, una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico Minitab 19, con un nivel de confiabilidad del 95 %.

Los datos obtenidos registraron una respuesta diferencial en las cepas de *Trichoderma* evaluadas. A partir del día dos, las cepas correspondientes a *T. longibrachiatum* y *T. comercial* presentaron una acción inhibitoria en las semillas de albahaca al registrar en las cuatro variedades, un menor porcentaje de germinación a través del tiempo comparado con el control agua, donde la germinación fue mayor al 30 %. Así mismo, se registró que las cepas de *T. atroviride* y *T. koningii* generaron el mayor efecto bioestimulante en las cuatro variedades de albahaca, al incrementar el porcentaje de germinación. El resto de los tratamientos, provocaron un efecto variable en cada cultivar, donde las semillas de la variedad Siam Queen, a partir del día tres, generó una germinación mayor al 40 %, seguido de la variedad Lemon ($\geq 20\%$) y Nufar ($\geq 30\%$), donde hasta el día cuatro y cinco incrementaron la respuesta al 50 %. Mientras que la acción en la variedad Purple Ruffles, fue retardada al presentar una germinación mayor al 50 % hasta el día nueve. Al final de los 15 días de evaluación, la cepa de *T. atroviride* mostró diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos al incitar el mayor porcentaje de germinación en las variedades Purples Ruffles (94 %) y Nufar (96 %), los cuales fueron iguales estadísticamente (Figura 1). En la variedad Siam Queen, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual muestra que las diferentes especies de *Trichoderma*, aunque no estimularon la germinación de las semillas en esta variedad, tampoco

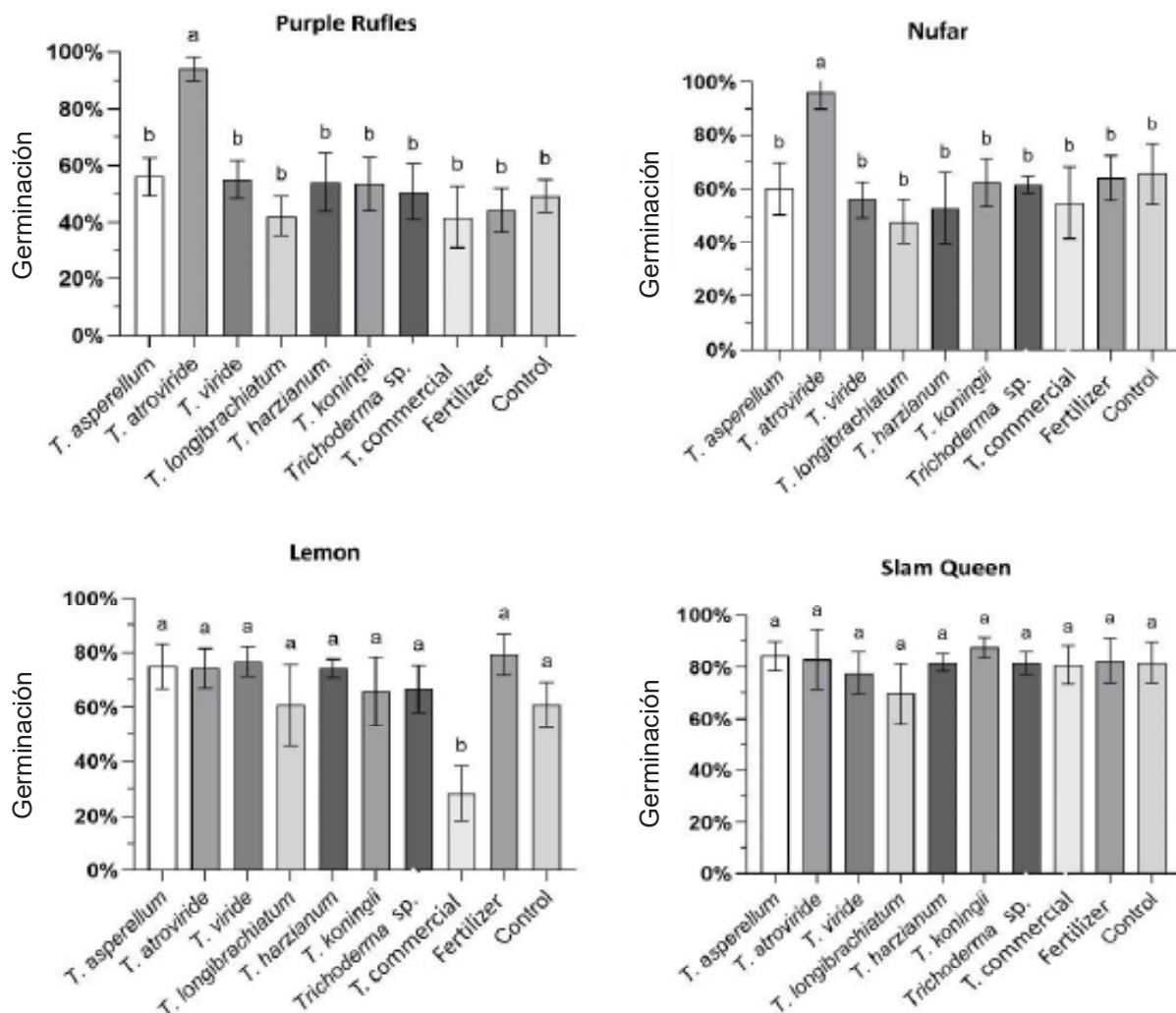


Figura 1. Acción bioestimulante de *Trichodermas* nativas en el porcentaje de semillas germinadas de cuatro variedades de albahaca.

la inhibieron al reportar resultados iguales al control. En la variedad Lemon, el único tratamiento que fue significativamente diferente fue *Trichoderma harzianum* del producto comercial el cual tuvo una respuesta menor (28 %). Mientras que los tratamientos que obtuvieron el porcentaje mayor fueron el fertilizante (79 %) y *T. viride* (77 %).

Las variables morfométricas en Var. Purple Ruffles, registraron que en biomasa fresca de tallo, las cepas de *Trichoderma* nativas no presentaron acción bioestimulante, donde *T. asperellum*, *T. viride* y *Trichoderma* sp. no mostraron diferencias significativas respecto al control, pero si respecto a *T. harzianum*, *T. koningii* y *T.*

longibrachiatum, donde éstos tres últimos disminuyeron la biomasa, seguido del comercial, el fertilizante sintético y *T. atroviride* (Cuadro 1, Figura 2). En la biomasa de raíz, todas las cepas mostraron diferencias significativas, donde *Trichoderma* sp. provocó el mayor incremento radicular, seguido de *T. viride*. No así, para, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. koningii*, al ser igual estadísticamente al fertilizante sintético y el control Agua. *T. comercial* y *T. atroviride* registraron la mayor reducción en la biomasa de la raíz. Respecto a la biomasa seca de tallo, las cepas de *Trichoderma* tampoco registraron un incremento en esta variable, pero si en la biomasa seca de raíz, donde *T. viride*, *T. harzianum* y *T. koningii* registraron el mayor valor, y mostraron diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos. En el caso de la longitud de tallo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si en longitud de raíz, al registrar *T. harzianum* y el fertilizante el mayor incremento. En la Var. Lemon los resultados obtenidos en esta variedad, mostraron que el fertilizante presentó el mayor valor en la biomasa fresca de tallo y raíz, y mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Cuadro 2, Figura 2). En la biomasa de tallo, la cepa nativa que presentó acción bioestimulante fue *T. asperellum*. Mientras que *T. harzianum* y *Trichoderma* sp. registraron una respuesta similar al control. Sin embargo, el resto de los tratamientos redujeron esta variable, mostrando diferencias significativas entre éstos. En biomasa fresca de raíz, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *Trichoderma* sp. y *T. comercial* no presentaron diferencias significativas respecto al control, es decir éstas no estimularon el crecimiento de la plántula, pero tampoco lo afectaron. Mientras que *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* lo redujeron. En la biomasa seca de tallo y raíz, *T. harzianum* y el fertilizante presentaron mayor efecto bioestimulante y no

Cuadro 1. Parámetros morfométricos de plántulas de albahaca Var. Purple Ruffles ante el efecto de diferentes aislados de *Trichoderma*.

Tratamiento	Biomasa (g)				Longitud (cm)	
	Fresca		Seca		Tallo	Raíz
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz
<i>T. asperellum</i>	0.120 ^a	0.022 ^{abc}	0.008 ^a	0.000 ^{ab}	1.059 ^a	2.098 ^{ab}
<i>T. atroviride</i>	0.003 ^c	0.002 ^c	0.000 ^c	0.000 ^b	1.000 ^a	1.820 ^{ab}
<i>T. viride</i>	0.125 ^a	0.025 ^{ab}	0.006 ^{ab}	0.001 ^a	0.878 ^a	1.651 ^b
<i>T. longibrachiatum</i>	0.094 ^{ab}	0.022 ^{abc}	0.004 ^{ab}	0.000 ^b	0.977 ^a	1.677 ^b
<i>T. harzianum</i>	0.107 ^{ab}	0.030 ^{abc}	0.007 ^{ab}	0.001 ^a	1.002 ^a	2.377 ^a
<i>T. koningii</i>	0.102 ^{ab}	0.026 ^{abc}	0.006 ^{ab}	0.001 ^a	1.024 ^a	2.054 ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp.	0.137 ^a	0.040 ^a	0.006 ^{ab}	0.0007 ^{ab}	1.024 ^a	1.980 ^{ab}
<i>T. commercial</i>	0.048 ^{bc}	0.004 ^{bc}	0.005 ^{ab}	0.0009 ^{ab}	0.933 ^a	1.887 ^{ab}
Fertilizer	0.044 ^{bc}	0.015 ^{abc}	0.003 ^{bc}	0.000 ^b	0.878 ^a	2.421 ^a
Control	0.125 ^a	0.012 ^{abc}	0.008 ^a	0.001 ^{ab}	0.864 ^a	2.200 ^{ab}

Medias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

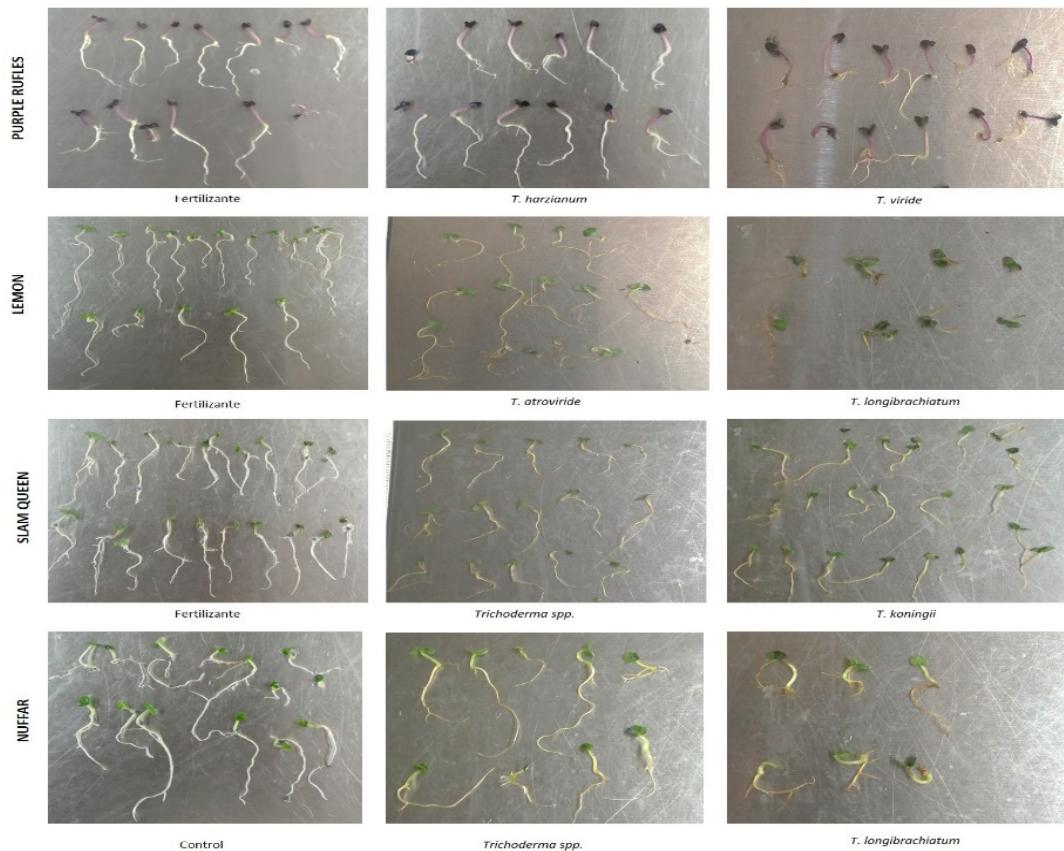


Figura 2. Principales tratamientos de *Trichoderma* con mayor respuesta positiva (1ra. y 2da. foto de la izquierda) o negativa (3er. foto a la derecha) en el crecimiento de cuatro cultivares de albahaca.

mostraron diferencias significativas entre ambos. Así mismo, las cepas de *T. asperellum*, *atroviride*, *viride* y *Trichoderma* sp. fueron similares al tratamiento control. Mientras que el resto redujo la acción en ambas variables. En la longitud de tallo y raíz, *T. atroviride* fue la cepa que presentó mayor acción bioestimulante junto al tratamiento de fertilizante y el resto de los tratamientos mostraron una respuesta variable tanto en raíz como en tallo, al presentar una tendencia de efecto inhibitorio en el crecimiento. Los resultados mostraron que esta variedad comercial, no mostró un patrón de respuesta sobre la eficacia de una cepa de *Trichoderma* en específico, ya que se registró en cada variable la acción de diferentes especies de *Trichoderma* dentro de las que destacaron *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. atroviride*.

Cuadro 2. Parámetros morfométricos de plántulas de albahaca Var. Lemon ante el efecto de diferentes aislados de *Trichoderma*.

Tratamiento	Biomasa (g)				Longitud (cm)	
	Fresca		Seca		Tallo	Raíz
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz		
T. asperellum	0.103 ^{ab}	0.048 ^b	0.005 ^{abc}	0.001 ^{abc}	0.600 ^b	3.101 ^d
T. atroviride	0.061 ^{bcde}	0.037 ^{bc}	0.002 ^{cd}	0.001 ^{abc}	0.8650 ^a	4.9102 ^{ab}
T. viride	0.082 ^{abcd}	0.039 ^{bc}	0.005 ^{abcd}	0.002 ^{abc}	0.579 ^b	3.412 ^{cd}
T. longibrachiatum	0.024 ^c	0.006 ^c	0.001 ^d	0.000 ^c	0.497 ^b	1.237 ^c
T. harzianum	0.091 ^{abc}	0.027 ^{bc}	0.007 ^a	0.002 ^a	0.593 ^b	3.511 ^{cd}
T. koningii	0.045 ^{cde}	0.018 ^{bc}	0.003 ^{bed}	0.001 ^{bc}	0.654 ^b	3.036 ^d
Trichoderma sp.	0.087 ^{abc}	0.033 ^{bc}	0.006 ^{ab}	0.002 ^{ab}	0.645 ^b	3.955 ^{bed}
T. commercial	0.035 ^{de}	0.017 ^{bc}	0.002 ^{cd}	0.001 ^{bc}	0.550 ^b	3.300 ^{cd}
Fertilizer	0.123 ^a	0.092 ^a	0.007 ^a	0.003 ^a	0.554 ^b	5.026 ^a
Control	0.088 ^{abc}	0.021 ^{abc}	0.005 ^{abc}	0.001 ^{abc}	0.512 ^b	4.352 ^{abc}

Medias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

En la variedad Siam Queen *T. asperellum*, *Trichoderma* sp. fueron iguales estadísticamente al tratamiento fertilizante al mostrar el mayor valor en la biomasa fresca de tallo y raíz, seguido de *T. koningii*, *T. longibrachiatum* y *Trichoderma* sp., mientras que en el caso de *T. harzianum* y *T. commercial* presentaron una respuesta similar al control, al provocar un crecimiento similar en las plántulas (Cuadro 3, Figura 2). El resto de los tratamientos tales como *T. atroviride*, *T. viride* y el con-

Cuadro 3. Parámetros morfométricos de plántulas de albahaca Var. Siam Queen ante el efecto de diferentes aislados de *Trichoderma*.

Tratamiento	Biomasa (g)				Longitud (cm)	
	Fresca		Seca		Tallo	Raíz
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz		
T. asperellum	0.121 ^a	0.045 ^a	0.007 ^a	0.002 ^a	0.752 ^{ab}	2.286 ^{cd}
T. atroviride	0.047 ^c	0.015 ^{bc}	0.003 ^a	0.0007 ^a	0.836 ^{ab}	2.458 ^{bc}
T. viride	0.065 ^{bc}	0.008 ^c	0.021 ^a	0.002 ^a	0.683 ^b	2.577 ^{bc}
T. longibrachiatum	0.104 ^{ab}	0.034 ^{abc}	0.007 ^a	0.001 ^a	0.880 ^a	2.258 ^{cd}
T. harzianum	0.092 ^{abc}	0.014 ^c	0.007 ^a	0.001 ^a	0.757 ^{ab}	2.642 ^{abc}
T. koningii	0.107 ^{ab}	0.032 ^{abc}	0.007 ^a	0.001 ^a	0.779 ^{ab}	1.995 ^d
Trichoderma sp.	0.121 ^a	0.042 ^{ab}	0.008 ^a	0.002 ^a	0.679 ^b	2.707 ^{ab}
T. commercial	0.075 ^{abc}	0.015 ^c	0.005 ^a	0.002 ^a	0.692 ^b	2.494 ^{bc}
Fertilizer	0.124 ^a	0.047 ^a	0.007 ^a	0.002 ^a	0.681 ^b	3.000 ^a
Control	0.089 ^{abc}	0.032 ^{abc}	0.007 ^a	0.002 ^a	0.511 ^c	2.626 ^{abc}

Medias con misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

trol provocaron una reducción en esta variable. En la biomasa seca de tallo y raíz, los tratamientos presentaron un comportamiento similar, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. No así, en la variable de longitud de tallo y raíz, donde la respuesta en ambos casos fue muy variable respecto a las cepas nativas de *Trichoderma*, donde en longitud de tallo, *T. longibrachiatum* mostró una eficacia en la acción bioestimulante; sin embargo, en longitud de raíz, el fertilizante destacó al estimular en mayor medida el crecimiento radicular, seguido del *Trichoderma* sp., mientras que en tallo, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. koningii* le siguieron en orden de importancia. Sin embargo, *T. viride* y T. comercial fueron lo que disminuyeron el efecto bioestimulante en la planta, al comportarse igual o con menor influencia que el control. En la variedad Nufar ante las cepas nativas de *Trichoderma* varió al mostrar diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 4, Figura 2). Respecto a la biomasa fresca de tallo, ningún *Trichoderma* mostró efecto bioestimulante y solo el fertilizante presentó el mayor valor. Mientras que

Cuadro 4. Parámetros morfométricos de plántulas de albahaca Var. Nufar ante el efecto de diferentes aislados de *Trichoderma*.

Tratamiento	Fresca		Biomasa (g)		Longitud (cm)	
	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz
<i>T. asperellum</i>	0.092 ^{ab}	0.040 ^{ab}	0.004 ^b	0.002 ^b	0.986 ^a	2.978 ^{ab}
<i>T. atroviride</i>	0.052 ^b	0.016 ^b	0.002 ^b	0.001 ^b	0.982 ^a	3.358 ^{ab}
<i>T. viride</i>	0.092 ^b	0.072 ^a	0.005 ^{ab}	0.002 ^b	0.744 ^{ab}	2.704 ^{ab}
<i>T. longibrachiatum</i>	0.050 ^b	0.013 ^b	0.002 ^b	0.0002 ^b	0.908 ^{ab}	2.070 ^b
<i>T. harzianum</i>	0.101 ^{ab}	0.025 ^{ab}	0.005 ^{ab}	0.002 ^b	0.815 ^{ab}	3.371 ^a
<i>T. koningii</i>	0.081 ^b	0.029 ^{ab}	0.003 ^b	0.001 ^b	0.846 ^{ab}	2.714 ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp.	0.102 ^{ab}	0.072 ^a	0.004 ^b	0.002 ^b	0.786 ^{ab}	3.508 ^a
<i>T. commercial</i>	0.086 ^b	0.021 ^a	0.002 ^b	0.005 ^a	0.970 ^{ab}	2.662 ^{ab}
Fertilizer	0.150 ^a	0.042 ^{ab}	0.009 ^a	0.002 ^{ab}	0.745 ^{ab}	3.489 ^a
Control	0.106 ^{ab}	0.032 ^{ab}	0.006 ^{ab}	0.002 ^b	0.726 ^b	3.623 ^a

Medias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Trichoderma sp., *T. harzianum* y *T. asperellum* fueron similares al tratamiento control, al no mostrar diferencias significativas entre estos. Sin embargo, *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *T. commercial* inhibieron el incremento en la biomasa de tallo. Caso contrario en la biomasa fresca de raíz, donde *T. viride* y *Trichoderma* sp. estimularon el crecimiento radicular junto al tratamiento de *T. commercial*, donde no se presentaron diferencias significativas, pero si respecto a las cepas de *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, el fertilizante y tratamiento

control, los cuales no influenciaron positiva ni negativamente en esta variable. No así, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum*, los cuales provocaron una reducción en la biomasa de raíz (Cuadro 4, Figura 2). En el peso seco de tallo y raíz, el T. comercial y el fertilizante incrementaron esta variable y mostraron diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos, donde *T. viride* y *T. harzianum* fueron similares al control al presentar una misma respuesta. Mientras que el resto de los tratamientos presentaron una reducción de la misma. Respecto a la longitud de tallo *T. asperellum* y *T. atroviride* incrementaron el crecimiento del mismo, mientras que en raíz ninguna cepa destacó respecto a su acción estimulante, solo *T. harzianum* y *Trichoderma* sp. que, aunque no estimularon el crecimiento, tampoco provocaron un efecto negativo en el mismo.

Trichoderma poseen gran versatilidad en su modo de acción y cada especie reacciona diferente a los nichos donde se desarrolló. Durante la germinación de los cultivares, *T. atroviride* y *T. koningii* generaron el mayor efecto bioestimulante, especialmente en el cv. Nufar. Esto sugiere que su eficacia puede estar relacionada con su potencial de crecimiento micelial y/o de esporas e incremento de sustancias químicas asociadas a fitohormonas. Esto es consistente con lo reportado por Contreras-Cornejo *et al.* (2018), al señalar que la germinación de las esporas produce mayor liberación de fitohormonas y/o metabolitos estimuladores de crecimiento que cuando el hongo se aplica en la fase de micelio. En el cv. Purple Ruffles, la acción de las diferentes especies de *Trichoderma* fue lenta en los primeros nueve días, lo que pone a prueba su capacidad para asimilar posibles compuestos. Al respecto, Prinsi *et al.* (2020), reportan que las variedades de albahaca muestran una alta variabilidad en los contenidos y propiedades de fenoles y que variedades de albahaca morada, como el caso de la variedad Purple Ruffles, produce una mayor cantidad de antocianinas que poseen efectos diversos, tales como la pigmentación de flores, semillas y la protección de órganos vegetativos del estrés (a) biótico (Hatier y Gould, 2008). Al final de los días de evaluación en el porcentaje de germinación, las diferentes especies de *Trichoderma* presentaron efecto biostimulante en follaje y raíz de albahaca. Esto puede deberse a los mecanismos que este tipo de microrganismo posee. Al respecto, Delgado-Sánchez (2013), señala que *Trichoderma* sp. en semilla reduce la resistencia mecánica de la testa y facilita el rompimiento de la latencia. Además, se ha señalado que *Trichoderma* también actúa en la solubilización de nutrientes como fosfatos, Fe, Mn y Mg (Acuario y España, 2016), lo cual puede mejorar la nutrición de los embriones e incrementar su rápido crecimiento (Bader, 2020). Los resultados de porcentaje de germinación coinciden con lo antes señalado. Además, se hizo evidente que la mayoría de las cepas de *Trichoderma* nativas mostraron una mayor eficacia que el *Trichoderma* comercial. Este resultado coincide con Cubillos *et al.* (2009), quienes evaluaron la respuesta diferencial de una cepa nativa de *T. harzianum* aislada de *Elaeis guineensis* y una

cepa de *Trichoderma* comercial, donde encontraron que ambos tratamientos estimularon la germinación de semillas de maracuyá, con porcentajes de 64.4 y 93.3% comparado al testigo (53.3%), donde la cepa nativa mejoró el crecimiento e índice de germinación. Así mismo, Castillo *et al.* (2022) confirmaron el efecto positivo de *Trichoderma* en la germinación de semillas de agave, obteniendo porcentajes de 85 %, lo que sugiere el uso de este microorganismo en pregerminación

En el estudio, se hizo evidente que en algunas variedades como Purple Rufles, las cepas de *T.* comercial y *T. atroviride* tuvieron el mayor efecto de reducción en la biomasa de la raíz. Esta respuesta negativa de *Trichoderma*, se ha observado en algunos estudios, como lo reportado por Bazghaleh *et al.* (2020), quienes señalan que especies de *Trichoderma*, pueden presentar efectos variables en la planta que van desde promover o inhibir el crecimiento, hasta inducir resistencia o aumentar la susceptibilidad de la planta. Esto, debido a las complejas interacciones moleculares *Trichoderma*-planta, que desencadenan cambios transcriptómicos en ambas partes, por lo tanto, la cepa fúngica y el genotipo de la planta son los principales determinantes del resultado final (Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2021). En general el efecto bioestimulante de *Trichoderma*, fue evidente en biomasa y longitud de la raíz, donde su acción favoreció tanto el incremento de la masa celular como la longitud de las raíces. Al respecto, Khan *et al.* (2020), señalan que algunas especies de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios (6-pentil-a-pirona, ácido heptilídico y peptaibols) que ayudan en el transporte de metales, simbiosis, competencia y diferenciación celular, involucrada con el crecimiento y desarrollo de células. En las variables evaluadas, más de una cepa nativa de *Trichoderma* mostró una eficacia mayor al fertilizante o al *Trichoderma* comercial. Esta acción es de gran importancia en el uso de nuevas cepas dentro de los sistemas de producción agrícola, donde se pretende disminuir la aplicación de agroquímicos sintéticos o cepas no nativas de la región. En este contexto, Sani *et al.* (2020), señalan que el uso de *Trichoderma* podría bajar la demanda de fertilizantes, tal como lo demuestran sus estudios con *Trichoderma* y biocarbón, donde redujeron la mitad del uso de fertilizante NPK sin afectar el rendimiento del cultivo. En la variedad Lemon, aunque se registró en cada variable la acción diferente de las especies de *Trichoderma*, las que comúnmente destacaron fueron *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. atroviride*. Esto es consistente con lo reportado por Zin *et al.* (2020) y Asis *et al.* (2021), al señalar que *T. harzianum*, *asperellum* y *atroviride* son las que mayormente se aplican como bioestimulantes comerciales en diversos cultivos agrícolas, debido a su rápido crecimiento y adaptabilidad a la rizósfera de la planta huésped. También es importante mencionar que la respuesta de las diferentes cepas evaluadas puede estar relacionado con el tipo de cultivar al que fueron inoculadas, debido a los compuestos o sustancias que esta variedad produce, ya que no todas las cepas presentaron una asociación positiva en ella, de ahí la importancia de la evaluación de distintas cepas

con distintos cultivares. Al respecto Harman (2011), menciona que la selección de cepas de *Trichoderma* para su aplicación a un cultivo específico requiere de evaluaciones de múltiples combinaciones de cepa × cultivar, y elegir la mejor configuración experimental para este propósito sigue siendo una tarea complicada.

En Siam Queen, *T. asperellum* también destaca del resto de los tratamientos al presentar eficacia bioestimulante en las plántulas, mientras que la acción de *T. harzianum* fue distinta en cada variable. Contrario a lo que señala Abdullah *et al.* (2021), quienes reportan que *T. harzianum* se considera uno de los principales productos que poseen efectividad en el aumento de la absorción de Fósforo y otros micronutrientes, mejora la germinación, los atributos de crecimiento de brotes y raíces, así como el contenido de clorofila. Sin embargo, esta variabilidad de acción en el presente estudio, pudo deberse a que el tipo de cultivar no tiene una interacción positiva con este microorganismo y/los metabolitos que produce. En este contexto, Alfiky *et al.* (2021), señalan que *Trichoderma* secreta un conjunto de efectores para modular el crecimiento y la inmunidad de las plantas, donde se ha documentado que las proteínas, los ARN pequeños y diferentes clases de metabolitos secundarios (SM), incluidos los COV (compuestos orgánicos volátiles), desempeñan diferentes funciones críticas en las interacciones *Trichoderma*-planta. Así mismo, la capacidad para promover el crecimiento por parte de las cepas de *Trichoderma* se le atribuye a la capacidad de colonizar aceleradamente las raíces de la planta resultando en la protección de la planta ante fitopatógenos, lo cual aumenta la capacidad del crecimiento y por la exudación de fitohormonas o la solubilización de algunos nutrientes (Acurio y España 2016). En las plántulas de la variedad Nufar, la mayoría de las cepas nativas estimuló el crecimiento de raíz a excepción de *T. atroviride* y *T. longibrachiatum*, los cuales provocaron un decremento en la biomasa radicular. Es posible que las cepas de *Trichoderma* hayan mostrado un mayor efecto biostimulante en raíz, a diferencia de tallo, debido que el sistema radicular secreta compuestos útiles para el óptimo establecimiento de *Trichoderma*. Guzman-Guzman *et al.* (2019), reportan que las raíces de las plantas liberan sustancias que afectan la composición de la microbiota presente en la rizósfera, y conduce al establecimiento de simbiosis que involucran la promoción de crecimiento vegetal. Esto coincide con Contreras-Cornejo *et al.* (2014), quienes mencionan que este efecto es debido a la producción de auxinas, que incrementan el desarrollo de raíces específicamente con las especies *atroviride* y *virens*. En la variedad Nufar, se ha confirmado que es uno de los cultivares comunes dentro de la comercialización debido a sus aceites esenciales que poseen un aroma suave y dulce (Kellie y Currey, 2019). Debido a esta característica, se ha reportado que los microorganismos antagonistas se asocian con mayor eficacia en las raíces, debido aquellos compuestos químicos que estas secretan y pueden interactuar mediante una simbiosis (Guzman-Guzmán *et al.*, 2019). Es posible que las cepas nativas de *Trichoderma* evaluadas hayan provocado

una mayor estimulación en este cultivar debido a su adaptación a las sustancias que secretan sus raíces.

En este experimento se observó que la cepa *T. atroviride* causó mayor efecto bioestimulante en la germinación de los cultivares Nufar y Purple Rufles. Mientras en biomasa y longitud de raíz y tallo, *T. asperellum* y *T. harzianum* presentaron una eficacia mayor, con una respuesta variable entre ellos, según el cultivar evaluado. El efecto de *T. comercial* siempre fue menor sobre todas las variables, independientemente del cultivar. La eficacia de las cepas nativas de *Trichoderma*, estuvo asociado al tipo de cepa nativa y el cultivar de albahaca. Lo anterior demuestra la variabilidad de respuesta que poseen las diferentes cepas de *Trichoderma* y la necesidad constante del estudio de las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), especialmente a la Dra. Alejandra Nieto Garibay. También Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la Beca para estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Abdullah N, Doni F, Mispan M, Saiman M, Yusuf Y, Oke M and Suhaimi N. 2021. Harnessing *Trichoderma* in agriculture for productivity and sustainability. *Agronomy* 11:2559. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122559>.
- Absolute Reports 2020. Global basil leaves market research report <https://www.absolutereports.com/global-basil-leaves-market-15756862>.
- Acurio V y España I. 2016. Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *La granja. Revista de Ciencias de la Vida* 25:53-61. <http://dx.doi.org/10.17163/lgr.n25.2017.05>.
- Alfiky A and Weisskopf L. 2021. Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi* 7:61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>.
- Asis A, Shahriar S, Naher L, Saallah S, Nur FH, Kumar V and Siddiquee S. 2021. Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports* 48:3285-3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>.
- Baczek K, Kosakowska O, Gniewosz M, Gientka I and Weglarz Z. 2019. Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) productivity and raw material quality from organic cultivation, *Agronomy* 9 (279): 1-15. doi:10.3390/agronomy9060279.
- Bader A, Salerno G, Covacevich F and Consolo V. 2020. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Journal of King Saud University Science* 32:867-873. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>.
- Bazghaleh N, Prashar P, Woo S and Vandenberg A. 2020. Effects of lentil genotype on the colonization of beneficial *Trichoderma* species and biocontrol of *Aphanomyces* root rot. *Microorganisms* 8:1290. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091290>.
- Bécquer C, Nápoles J, Cancio T, Ávila U, Puentes A, Medinilla F and Muir I. 2017. Productivity of *Zea mays* L., in drought stress, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*. *Cuban Journal of Agricultural Science* 51:489-500. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=653768172006>.

- Castillo R, Castillo Q, Sáenz C, Rueda S. y Séanz R. 2022. Efecto del pretratamiento con *Trichoderma* y *Bacillus* en la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore. Revista Mexicana de ciencias Forestales 13:56-72. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.844>.
- Contreras-Cornejo H, Macías-Rodríguez L, Alfaro-Cuevas R and López-Burcio J. 2014. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. Molecular Plant-Microbe Interactions 27:503-514. <http://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0265-R>.
- Contreras-Cornejo H, Macias-Rodriguez L, Del-Val E and Larsen J. 2018. The root endophytic fungus *Trichoderma atroviride* induces foliar herbivory resistance in maize plants. Applied Soil Ecology 124:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.004>.
- Cubillos H, Valero N y Mejía L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). Agronomía Colombiana 27:81-86 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180314730011>.
- Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont J, Guerrero-González M and Flores J. 2013. Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. Journal of Plant Research 126:643-649. <https://doi.org/10.1007/s10265-013-0558-2>.
- Fiorentino N, Ventorino V, Woo S, Pepe O, De Rosa A, Gioia L, Romano I, Lombardi N, Napolitano M, Colla G and Rouphael Y. 2018. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. Frontiers Plant Science, 9:743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00743>.
- Gutiérrez-Moreno K, Ruocco M, Monti M, De la Vega O y Heil M. 2021. Context-dependent effects of *Trichoderma* seed inoculation on anthracnose disease and seed yield of bean (*Phaseolus vulgaris*): Ambient conditions override cultivar-specific differences. Plants 10:1739. <https://doi.org/10.3390/plants10081739>.
- Guzman-Guzman P, Porras-Troncoso M, Olmedo-Monfil V y Herrera-Estrella A. 2019. *Trichoderma* species: Versatile plant symbionts. Phytopathology 109:6-16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>.
- Harman G. 2011. *Trichoderma* - not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica 39:103-108. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0151-y>.
- Hatier J and Gould K. 2008. Anthocyanin function in vegetative organs. Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications. 19p. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_1.
- Hernández M, Novo S, Mesa P, Ibarra M y Hernández R. 2017. Capacidad de *Trichoderma* spp. como estimulante de la germinación en maíz (*Zea mays* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Revista de Gestión del Conocimiento y el Desarrollo Local 4:19-23. <https://recta.unah.edu.cu/index.php/RGCDL/article/view/898/1210>.
- Hernández-Melchor D, Ferrera-Cerrato R y Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean journal of agricultural and animal sciences 35:98-112. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/993>.
- Hussain T, Koyro H, Zhang W, Liu X, Gul B and Liu X. 2020. Low salinity improves photosynthetic performance in *Panicum antidotale* under drought stress. Frontiers Plant Science, 11:1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00481>.
- Illescas M, Pedrero-Méndez A, Pitorini-Bovolini M, Hermosa R, Monte E. 2021. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. Pathogens, 10, 991. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080991>.
- Kellie J and Currey C. 2019. Growth and development of basil species in response to temperature. Hortscience 54:1915-1920. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12976-18>.
- Khan R, Najeeb S, Hussain S, Xie B y Li Y. 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. Microorganisms, 8:817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>.
- Losada B y Moreno G. 2021. Caracterización de los solubilizadores de fósforo sobre el desarrollo y la producción del cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*) con tres sistemas de fertilización. Universidad de Ciencias aplicadas y ambientales (UDCA). Tesis. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/3834>.
- Martínez B, Infante D y Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Protección Vegetal 28:1-11 <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>.
- Mukherjee P, Latha J, Hadar R, Horwitz B and Horwitz B. 2003. TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. Eukaryot Cell 2:446-455. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145303/>.

- nih.gov/pmc/articles/PMC161448/pdf/0175.pdf.
- Mukhtar I. 2008. Influence of *Trichoderma* species on seed germination in okra. Mycopath 6:47-50. <https://www.researchgate.net/publication/242591669>.
- Nieto-Garibay AE, Troyo-Dieguez J, García-Hernandez L, Murillo-Amador B, Ruiz EFH and Pimienta BE. 2009. Soil water stress effect during emergence and seedling stage in *Capsicum frutescens* L. and *Capsicum annuum* L. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 405-413.
- Prinsi B, Morgutti S, Negrini N, Faoro F and Espe L. 2020. Insight into Composition of Bioactive Phenolic Compounds in Leaves and Flowers of Green and Purple Basil. Plants, 9:22. <https://doi.org/10.3390/plants9010022>.
- Sani M, N, H, Hasan M, Uddain J, Subramaniam S. 2020 Impact of application of *Trichoderma* and biochar on growth, productivity and nutritional quality of tomato under reduced N-P-K fertilization, Annals of Agricultural Sciences 65:107-115. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.06.003>.
- Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, Ávila-Quezada GD, Palacios-Espinosa A, Ruiz-Espinoza FH and Romeo-Bastidas M. 2021. Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. Mexican Journal of Phytopathology 39(3): 435-451. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-7>.
- SIAP 2019. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON-NG).
- Singh V, Sanmukh R, Birinchi KS, Bahadur HS. 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. Microbiological Research 193: 74–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016>.
- Sipos LO, Balazs LO, Szekely GC, Jung AD, Sarosi SE, Radacsie P, Csambalik LF. 2021. Optimization of basil (*Ocimum basilicum* L.) production in LED light environments – a review. Scientia Horticulturae, Volume 289: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110486>.
- Trettel J, Nascimento A, Barbosa L and Magalhães H. 2018. *In vitro* growth of genovese basil in response to different concentrations of salts and interaction of sucrose and activated carbon. Journal of Agricultural Science 10:142-152. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n9p142>.
- Ty'skiewicz R, Nowak A, Ozimek E y Jaroszuk-Sciseł J. 2022. *Trichoderma*: The current status of Its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. International Journal of Molecular Sciences 23:2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering journal 37: 1-20.
- Vieira P, Morais S, Bezerra F, Ferreira P, Oliveira Í, and Silva, M. G. V. 2014. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from *Ocimum* species. Industrial Crops and Products, 55:267-271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.032>.
- Wang M, Zhang M, Li L, Dong Y, Jiang Y, Liu K, Zhang R, Jiang B, Niu B and Fang X. 2017. Role of *Trichoderma reesei* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cellulase formation. Biotechnology for biofuels 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0789-x>
- Zin N and Badaluddin N. 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. Annals of Agricultural Sciences 65:168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>.