

La fusión de alta resolución (Bar-HRM) es una técnica rápida y eficiente para la caracterización molecular de morillas (*Morchella* spp) del sur de Chile.

*High resolution melting (Bar-HRM) as fast and efficient technique for molecular characterizations of morels (*Morchella* spp) in southern Chile*

David Alors , Leonardo Anabalon , Gabriel Vivallo

Universidad Católica de Temuco, Chile.

RESUMEN La recolección de morillas (*Morchella* spp.) es relevante en Chile como Producto Forestal No Maderable, pero la identificación de especies es compleja por la taxonomía del género y la disponibilidad limitada de estudios moleculares locales. En este trabajo evaluamos la utilidad de la técnica Bar-HRM (high-resolution melting) aplicada al marcador ITS como herramienta rápida de discriminación molecular, calibrada mediante secuenciación ITS y análisis filogenético. Se obtuvieron seis cepas a partir de esporadas de muestras ambientales recolectadas en la cordillera de la Costa (Región del Biobío) y la precordillera andina (Región de La Araucanía) y Aysén. Los perfiles HRM del ITS revelaron cuatro patrones de fusión diferenciables y fueron, en general, consistentes con tres entidades taxonómicas reconocidas mediante el análisis filogenético basado en ITS: *M. importuna*, *M. tridentina* y *M. andinensis*. En *M. importuna* se observó un desplazamiento cercano a 1 °C entre dos cepas, lo que sugiere variación intraespecífica o efectos técnicos y refuerza la necesidad de ampliar el muestreo para definir rangos de variación. En conjunto, nuestros resultados apoyan el uso de Bar-HRM como método complementario de tamizaje rápido para discriminar entidades de *Morchella* previamente caracterizadas, con potencial aplicación en trazabilidad y control de calidad.

Palabras clave: *Morchella*, PFSM (Productos Forestales No Maderables), DNA, Barcode, HRM.

Article history

Received: 21/01/2026

Accepted: 07/04/2026

Published: 30/04/2026

Corresponding author

David Alors
dalors@uct.cl

ABSTRACT Morel harvesting (*Morchella* spp.) is relevant in Chile as a non-timber forest product, yet species-level identification is challenging due to the genus' taxonomic complexity and the limited availability of local molecular studies. Here we evaluate Bar-HRM (high-resolution melting) of the ITS barcode as a rapid molecular discrimination tool, calibrated using ITS sequencing and phylogenetic analysis. Six strains were obtained from spore prints of environmental collections from the Coastal Range (Biobío Region) and the Andean foothills (La Araucanía Region) and Aysén. ITS HRM profiles yielded four distinguishable melting patterns and were broadly consistent with three taxonomic entities recognized by ITS-based phylogenetic placement: *M. importuna*, *M. tridentina* and *M. andinensis*. For *M. importuna*, two strains showed a ~1 °C shift in melting temperature, suggesting intraspecific variation or technical effects and highlighting the need for expanded sampling to define within-species ranges. Overall, our results support Bar-HRM as a complementary rapid screening approach to discriminate previously characterized *Morchella* entities, with potential applications in traceability and quality control.

Keywords: *Morchella*, NTFP, DNA, Barcode, HRM.

1. Introducción

Las especies de *Morchella* Dill. Ex. Pers., son hongos de la División Ascomycota y en Chile se consideran como Productos Forestales No Maderables (PFSM), definidos por la FAO (2020) como bienes de origen biológico distintos de la madera, que proceden de bosques, de terrenos arbolados, o desde fuera de los bosques. A los hongos del género *Morchella*, se les conoce popularmente como morillas, y debido a su impacto social y económico para las poblaciones rurales asociadas al bosque nativo motiva especialmente la necesidad de investigar y valorar estos productos (Valdebenito, 2013; Molares *et al.*, 2020; Lobos & Icarte, 2021). Las especies de *Morchella* son muy apreciadas en Europa y Norteamérica como recurso culinario por su sabor y en Asia (China, India y Pakistán) por la medicina popular y tradicional. (Tietel & Masaphy, 2018). Este interés internacional convierte a las morillas en el segundo PFSM chileno más valioso por detrás de las trufas (Correa y Martínez, 2013). El mercado de las morillas en Estados Unidos, Europa y Asia del Este se calcula en cientos de millones de dólares (Pilz *et al.*, 2007), y motivó

que se desarrollara y patentara el cultivo de especies del género *Morchella* en la década de los 80 (Ower, 1982; Ower, Mills & Malachowski, 1989) y más recientemente se cultive en invernaderos (Guo *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018), sin embargo, no se ha logrado todavía la producción a gran escala (He *et al.*, 2019). Sin embargo, se están logrando avances en cuanto al cultivo y también la caracterización de sustancias bioactivas de especies de *Morchella*, lo que posibilita nuevos modelos de aprovechamiento y posibilidad de generar valor agregado (Cuevas Verdugo, 2023; Du *et al.*, 2026; Pino *et al.*, 2026)

Morchella (Morchellaceae, Ascomycota) es un género de hongos, monofilético bien definido dentro de las Morchellaceae. Posee un complejo ciclo de vida y se caracteriza por las pequeñas variaciones fenotípicas y plasticidad morfológica entre sus especies, incluyendo variaciones en el pie y color del sombrero, formas y texturas, en relación con sus diferencias en las condiciones ecológicas para su fructificación (Pildain *et al.*, 2014). En Chile las especies del género se distribuyen en forma silvestre en bosques nativos,

en especial de *Nothofagus antártica* (G. Forst) Oerst (ñirre) y *Nothofagus pumilio* (Poepp & Endl) Krasser (lenga) pero también en plantaciones forestales de pino y eucalipto. En total se han reportado 7 especies de *Morchella* en Chile: *M. conica* Pers., *M. esculenta* (L.) Pers., *M. elata* Fr. y *M. intermedia* Boud (Pilz *et al.*, 2007; Aguilar, 2012; Du *et al.*, 2015), *M. tridentina* Bres., *M. andinensis* A. Machuca, M. Gerding & D. Chávez y *M. aysenina* A. Machuca, M. Gerding & D. Chávez. Estas últimas dos especies identificadas en base a materiales del Sur del país (Machuca *et al.*, 2021).

Las especies de *Morchella*, requieren una humedad relativa de 85-95%, escasa luz y temperatura del aire de 10 a 15 °C con alta ventilación (Correa y Martínez, 2013). Y se distribuyen principalmente en la zona cordillerana y precordillerana de los Andes entre las Regiones de Valparaíso y Aysén, pero también en localidades de la cordillera de la costa (Lobos & Icarte, 2021). Se ha reportado que crecen en suelos ácidos, de bosques nativos degradados nutricionalmente por alteraciones físicas o químicas, en los cuales facilitan la reforestación (Aguilar, 2012; Correa y Martínez, 2013). Su periodo de fructificación y cosecha es variable, pero comúnmente se encuentran de octubre a noviembre, aunque puede prolongarse o desplazarse de septiembre hasta mediados de diciembre según las variaciones de las condiciones climatológicas de la temporada (Correa y Martínez, 2013; Lobos & Icarte, 2021).

El género *Morchella* se compone de dos clados principales el clado *Esculenta* conocido como el de las morillas amarillas (de distribución predominantemente holártica) y el clado *Elata* conocido como el de las morillas negras (O'Donnell *et al.*, 2011). La complejidad taxonómica del género ha propiciado el uso de un código que consiste en la primera letra del género, y las dos primeras letras del clado seguido por un número Mes1, Mes2 ... Mes_i (para el clado *esculenta*) y Mel1, Mel2 ... Mel_i (para el clado *elata*) como hicieron por primera vez Tasskin *et al.* (2010). La gran demanda de los países

importadores genera un mercado de gran valor que podría incrementarse en analogía con otros PFNM donde se aplican herramientas moleculares para trazabilidad y certificación (Cordero *et al.*, 2011) en el caso de que se identificaran las especies de *Morchella*, sin embargo, es difícil y se estima que el 66% de las secuencias de *Morchella* en GenBank están mal identificadas (Du *et al.*, 2012; Loizides *et al.*, 2022). Además, actualmente se exportan las morillas como NTFP en grandes cantidades y como mezcla de especies (Lobos & Icarte, 2021). En este contexto, Bar-HRM podría ser útil para certificar material en escenarios de cultivo y trazabilidad. En los últimos años se están realizando trabajos moleculares que combinan varios marcadores para resolver las dificultades taxonómicas del género y lograr la correcta identificación de las especies (Taskin *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 2011; Du *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2015; Machuca *et al.*, 2021). El marcador molecular más ampliamente utilizado es la región ITS, considerada como el DNA barcode (código de barras de ADN) universal (Schoch *et al.*, 2012). La identificación molecular de las especies es una buena alternativa a la identificación morfológica dado que la segunda requiere de expertos con alto grado de especialización.

Sin embargo, en el contexto de las exportaciones de productos perecederos se requiere de métodos más rápidos como por ejemplo el Bar-HRM (barcode de fusión de alta precisión por sus siglas en inglés). El método Bar-HRM utiliza las mismas secuencias que el DNA barcode, pero en lugar de secuenciarlas y analizarlas, directamente analiza en tiempo real la curva de fusión y la Tm de productos de PCR permitiendo la discriminación de pequeñas variaciones en las secuencias del ADN identificando especies y subespecies de forma más rápida (Rugman-Jones y Stouthamer, 2016; Fernandes *et al.*, 2017). Por su simplicidad, rapidez y alta resolución el Bar-HRM ha sido utilizada para la discriminación de especies vegetales de interés económico (Madesis *et al.*, 2012; Druml & Cihna-Markl, 2014; Simko, 2016).

Tabla I

Especímenes de *Morchella* colectados en este estudio en la Precordillera andina y de la Costa (Chile Centro sur), caracterizados según localización geográfica y cobertura arbórea dominante asociada a los especímenes de *Morchella* en estudio/*Morchella* simples collected in the Andean Range and Coastal Range (Centre South of Chile), characterized by, geographical location and dominant tree cover.

CEPAS	LUGAR DE MUESTREO	COORDENADAS	PRINCIPAL ASOCIACIÓN FORESTAL	ACCESIÓN GeneBank (ITS1 5,8S ribosomal RNA gene)	Especie
Ori-101	Melipeuco; Sector Molulco	38.90 S° 71.72 W°	<i>N. nalpina</i> <i>N. obliqua</i>	ON942218	<i>Morchella andinensis</i> .
Ori-103	Melipeuco; Molulco	38.90 S° 71.72 W°	<i>N. obliqua</i> <i>Chusquea sp.</i>	ON942220	<i>Morchella andinensis</i> .
Ori-104	Melipeuco	38.90 S° 71.72 W°	<i>N. alpina</i>	ON942221	<i>M. tridentina</i>
Ori-102	Nacimiento	37.53 S° 72.70 W°	(s.i.)	ON942219	<i>M. importuna</i>
Ori-105	Los Ángeles	37.46 S° 72.39 W°	<i>Populus deltoides W.</i> Bartam ex Marshall	ON942222	<i>M. importuna</i>
Ori-106	Coyhaique	45.46 S° 71.62 W°	<i>N. antarctica</i>	ON942223	<i>Morchella andinensis</i>

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la utilidad de Bar-HRM (basada en ITS) como herramienta de discriminación molecular rápida, calibrada mediante secuenciación ITS y análisis filogenético. Como objetivo secundario, se aporta evidencia preliminar sobre la presencia de entidades taxonómicas de *Morchella* en las localidades muestreadas, sin pretensión de revisión taxonómica exhaustiva.

2. Materiales y métodos

2.1 Sitio de estudio

Se recolectaron ejemplares de *Morchella* en sectores rurales de las comunas de Coyhaique (región de Aysén) Lonquimay y Melipeuco (región de la Araucanía) y en las comunas de Nacimiento y Los Ángeles (región de Biobío) (Tabla I), en los meses de octubre de 2013 y 2014. Los ascomas de *Morchella* fueron colectados en sectores de bosque nativo secundario de *Nothofagus*, entre ellos *N. obliqua* (Mirb.) Oerst., *N. alpina* (Phil.) Dimitri et Milano, y *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. No se registró sistemáticamente la cobertura arbustiva/herbácea ni se documentaron rasgos morfológicos detallados de los ascomas, lo que limita el análisis ecológico y taxonómico. Los ascomas fueron recogidos en bolsas de papel estéril, y hasta el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Veterinarias y Salud Pública de la Universidad Católica de Temuco donde se conservan por O. Betancourt.

2.2 Aislamiento y extracción de ADN de las cepas de *Morchella*

Las ascosporas fueron desprendidas con movimientos vibratorios para ser incubadas a 25 °C en Agar Papa Dextrosa (PDA Oxoid) en presencia de cloranfenicol y fueron repicadas después de 3-5 días (Winder, 2006). A partir de cultivos monospóricos de 6 cepas exitosamente cultivadas de *Morchella* (B, G, J, L, M, y P, Tabla I) se extrajo el ADN con QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron con un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

2.3 Condiciones de PCR y Bar-HRM

La amplificación por PCR, la fusión del ADN y la adquisición del nivel de fluorescencia se realizaron en un volumen total de 15 µL en un termociclador de PCR en tiempo real (Rotor Gene Q; Qiagen). Se usó SYBR Green I (BioLine) para controlar la acumulación del producto amplificado durante la PCR y la posterior fusión del producto. La mezcla de reacción contenía 20 ng de ADN genómico, cebadores ITS 300 nM ITS1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'; ITS2 5'TCCTCCGCTTAT'TGATATGC3' (White *et al.*, 1990), y Fast PCR Master MIX SYBR GREEN I2 × (BioLine).

El protocolo de PCR de la región ITS se realizó usando una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 10 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y un paso de extensión final a 72 °C durante 2 minutos. Los datos de fluorescencia se adquirieron al final de cada paso de extensión durante los ciclos de PCR. Antes del HRM, los productos se desnaturalizaron a 95 °C durante

5 s, y luego se anillaron a 50 °C durante 30 s para formar dúplex de ADN al azar. La HRM se realizó de la siguiente manera: fundición previa a la primera temperatura apropiada durante 90 s, y fusión en una rampa de 10 °C en un rango de temperatura apropiado con incrementos de 0,1 °C cada 2 s. Finalmente, la curva de fusión de 2 resoluciones (HRM) de los marcadores ITS se obtuvo utilizando 95 °C durante 15 s, 50 °C durante 15 s y 95 °C durante 15 s. El patrón de fusión de las secuencias correspondientes de los amplicones ITS de las muestras, se analizó utilizando el programa informático Eco™ Software v4.1.2.0.

Los productos de PCR se secuenciaron en las dos direcciones usando BigDye Terminator V3.1 en un analizador 3500 xl (Thermo Scientific), con el software Data Collection v3. Las secuencias se alinearon y se corrigieron usando el software DNASTAR (Lasergene).

2.4 Análisis filogenéticos

Se construyó una matriz de ADN utilizando las 6 secuencias (B, G, J, L, M, y P) y secuencias de referencia, incluyendo secuencias tipo de las especies del género *Morchella* del clado elata (Tabla Suplementaria). Las secuencias de ADN se alinearon utilizando MFFT (Kato & Standley, 2013) y se descartaron las posiciones ambiguamente alineadas usando GBLOCKS (Castresana, 2000) por último se construyó un árbol filogenético utilizando RaxML (Stamatakis, 2014). Tres secuencias de *Morchella esculenta* fueron utilizadas como outgroup.

3. Resultados

A partir de las seis muestras analizadas se obtuvieron exitosamente perfiles de fusión de alta resolución (HRM) de la región ITS, así como secuencias ITS utilizables para su asignación taxonómica mediante análisis filogenético.

Nuestros resultados muestran que las seis cepas analizadas corresponden a tres entidades taxonómicas correspondientes a *M. tridentina*, *M. importuna* y *M. andinensis*. El análisis de las curvas de fusión de la región ITS reveló cuatro patrones de HRM diferenciables, con variaciones en la temperatura de fusión (T_m) que oscilaron entre 0,5 y 3,0 °C entre cepas. Las cepas B, J y P compartieron un patrón de fusión altamente consistente, mientras que la cepa L presentó un perfil de fusión distintivo. Las cepas G y M mostraron curvas de fusión similares en forma, pero desplazadas aproximadamente 1 °C en T_m.

El análisis filogenético basado en la región ITS situó a todas las secuencias analizadas dentro del clado Elata, con valores de soporte bootstrap del 100%, y podemos identificar la cepa L con *M. tridentina* y las cepas G y M con *M. importuna* ya que forman grupos monofiléticos con las secuencias de estas especies con soportes de 100 y 94 de Bootstrap respectivamente (Figura 2).

Figura 1

Curvas de fusión de los productos de PCR de las seis cepas analizadas mediante Bar-HRM correspondiente a región ITS/Melting curves of the PCR products of the six strains analyzed by Bar-HRM of the ITS región.

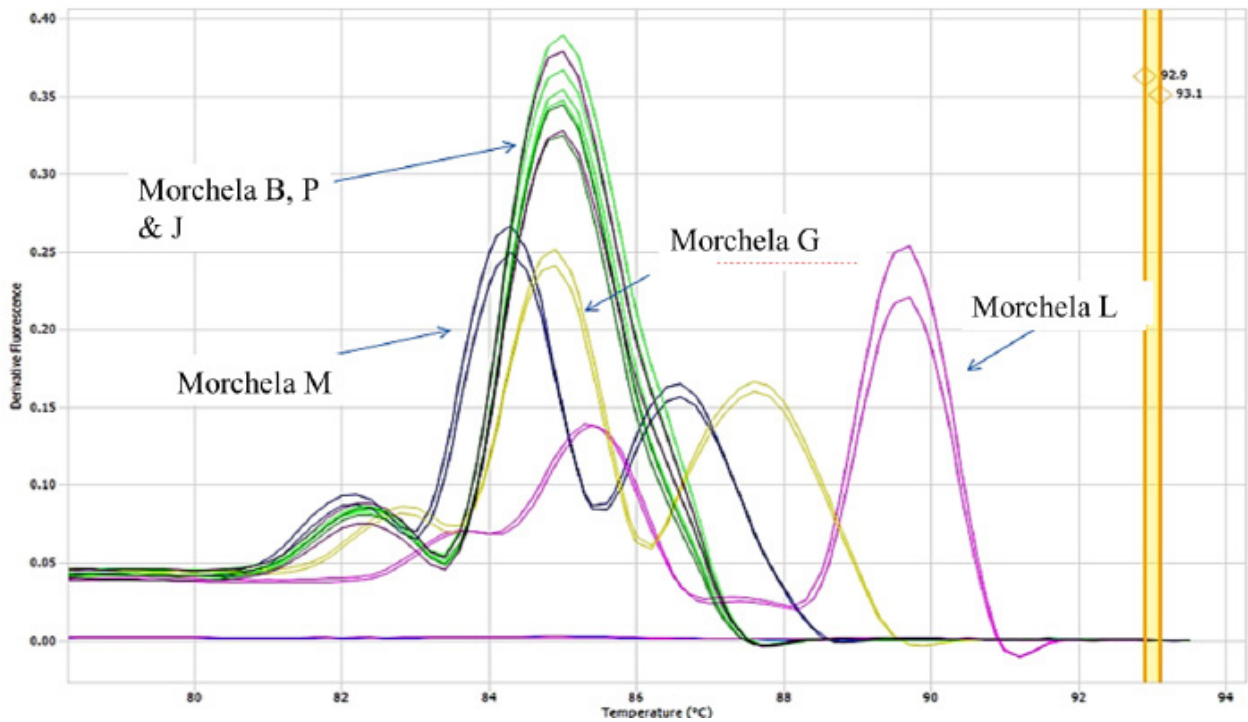


Figura 2

Árbol filogenético de máxima verosimilitud (RaxML) del clado *Morchella elata* basado en la secuencia de la región ITS. En negrita están resaltadas las secuencias propias de este trabajo. Los valores en las ramas del árbol representan el soporte estadístico bootstrap/Maximum likelihood (RaxML) phylogenetic tree of the *Morchella elata* clade based on ITS región. The sequences of our six strains are bolded. Values on branches are bootstrap support.

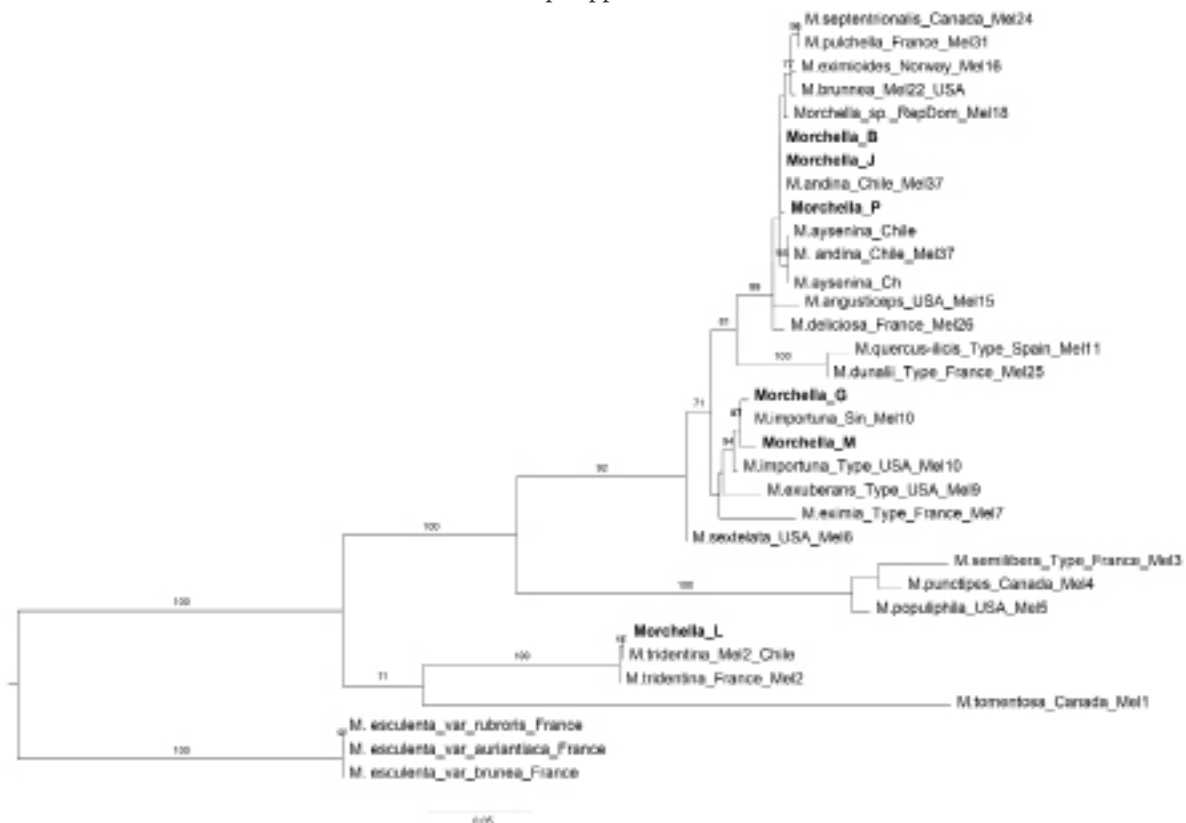
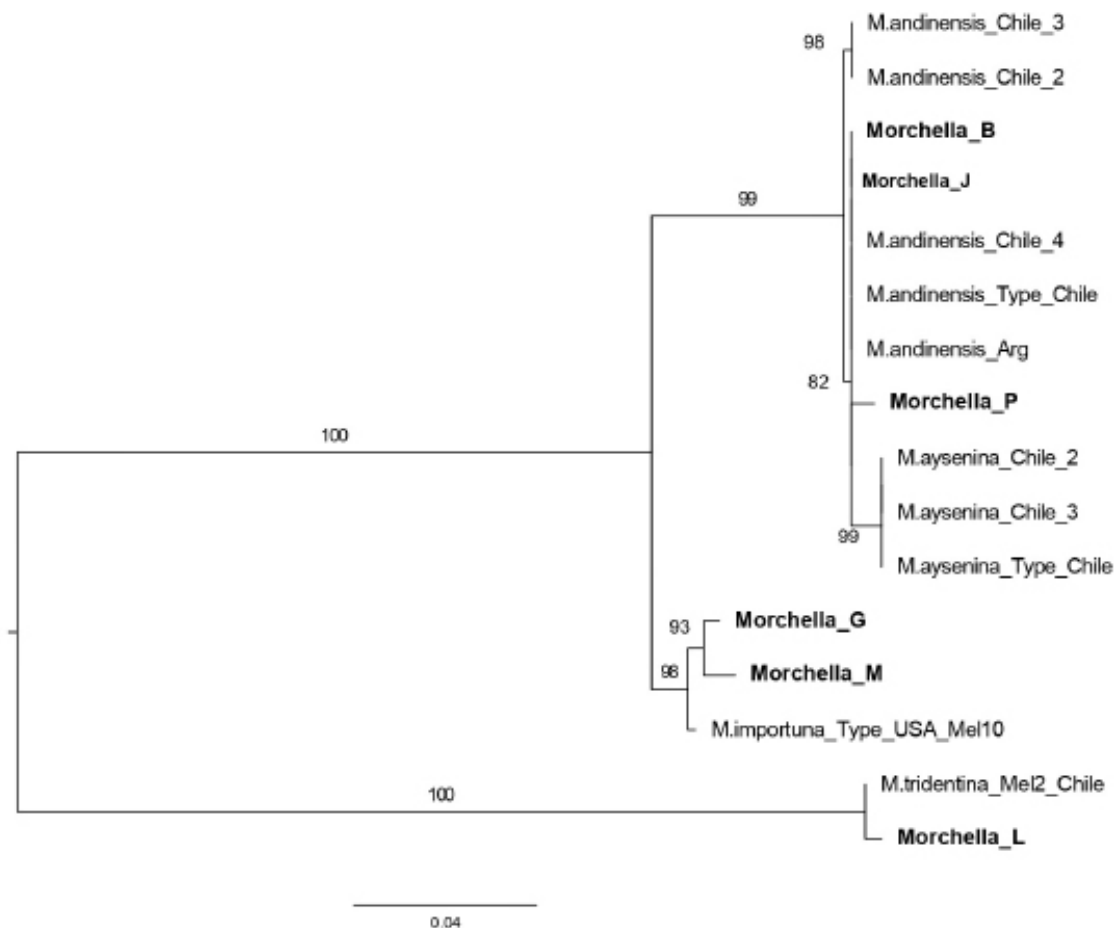


Figura 3

Árbol filogenético de máxima verosimilitud (RaxML) de las especies *M. aysenina*, *M. andinensis*, *M. importuna* y *M. tridentina* basado en la secuencia de la región ITS. En negrita están resaltadas las secuencias propias de este trabajo. Los valores en las ramas del árbol representan el soporte estadístico bootstrap/Maximum likelihood (RaxML) phylogenetic tree of the species *M. aysenina*, *M. andinensis*, *M. importuna* y *M. tridentina* based on ITS región. The sequences of our six strains are bolded. Values on branches are bootstrap support.



Las cepas B, J y P no formaron un clado monofilético bien soportado en el análisis filogenético amplio del clado Elata (Figura 2). Sin embargo, al restringir el análisis a especies cercanas, estas cepas se agruparon con secuencias de referencia de *M. andinensis*, incluyendo la secuencia tipo. (Figura 3). Por este motivo las cepas B, J y P se pueden considerar como pertenecientes a *M. andinensis*.

4. Discusión

Según nuestros resultados basados en la región ITS, las seis muestras analizadas de *Morchella* pueden asociarse a tres especies diferentes. Las cepas B, J, P y L procedentes de la precordillera andina se asociaron filogenéticamente a *M. andinensis* (B, J y P) y *M. tridentina* (L), mientras que las cepas B, J y P, a pesar de mostrar relación con *M. andinensis*, no se agrupan en un clado monofilético. El análisis filogenético con las muestras del clado elata basado en ITS (Figura 2) identifica satisfactoriamente 3 de las 6 cepas, mientras que las cepas B, J y P a pesar de mostrar relación con *M. andinensis* y *M. tridentina* no se agrupan en un clado monofilético. Esto se debe a que, aunque la región ITS es el barcode universal

propuesto en hongos (Schoch *et al.*, 2012), casi siempre se utiliza junto a otros marcadores. En el trabajo de Machuca *et al.* (2021) donde se describen por primera vez las especies *M. aysenina* y *M. andinensis* además de la región ITS utilizan otras tres regiones de ADN.

La técnica Bar-HRM se muestra como una herramienta útil para la discriminación molecular de especies de *Morchella* de Chile, ya que los cuatro grupos de curvas observados en la figura 1 son consistentes con las tres entidades taxonómicas reconocidas mediante el análisis filogenético. Muestra una curva de fusión única (Figura 1) para la cepa L, reconociendo la especie *M. tridentina* de igual forma que el análisis filogenético (Figura 2). Las cepas G y M que pertenecen a la misma especie (*M. importuna*) aunque muestran dos curvas diferentes (Figura 1), lo cierto es que se trata de curvas de fusión de morfología similar, desplazadas aproximadamente un grado de temperatura, lo que merece mayor atención y podría deberse a variabilidad intraespecífica o a efectos técnicos. Por otro lado, la técnica Bar-HRM mostró un patrón de fusión homogéneo en las muestras asociadas a *M. andinensis* (Figura 1), a pesar de la falta de monofilia observada

en la filogenia basada únicamente en ITS (Figura 2).

De este modo, la técnica Bar-HRM muestra un poder de discriminación comparable al análisis filogenético cuando ambos se basan en un único marcador molecular, ya que Bar-HRM detecta mejor la especie *M. andinensis* (no monofilética en la filogenia de ITS), mientras que la filogenia detecta correctamente la especie *M. importuna* (para la cual Bar-HRM muestra dos curvas diferentes).

Consideramos que las cepas B, J y P pertenecen a *M. andinensis* porque, aunque en la filogenia completa (Figura 2) no forman un grupo monofilético, en la filogenia con menos muestras (Figura 3) sí forman un grupo monofilético con algunas muestras de *M. andinensis*. De la misma forma en el trabajo de Machuca *et al.* (2021) de donde hemos obtenido las secuencias utilizadas, la filogenia realizada con la región ITS únicamente no muestra *M. andinensis* como un grupo monofilético y es en su análisis con 4 marcadores moleculares donde las muestras de *M. andinensis* muestran monofilia. Por este motivo consideramos que las cepas B, J y P son consistentes con la delimitación molecular propuesta para *M. andinensis* y que además muestran la misma curva de fusión (Figura 1) con la técnica Bar-HRM que ha sido validada en otros grupos de organismos.

Estudios ecológicos han mostrado la importancia de los distintos ecotipos de *Morchella* asociados a distintas especies de bosque nativo (y algunos árboles introducidos) y las condiciones climáticas para determinar la presencia de ascomas de *Morchella* en el centro sur de Chile (Pildain *et al.*, 2014; Oyanedel, 2016). Nuestros resultados no son concluyentes para relacionar la variabilidad genética con las asociaciones vegetales o el clima, ya que al sustituir el bosque nativo por plantaciones u otros árboles introducidos las especies de *Morchella* logran adaptarse y coexistir con estas especies exóticas. Pero nuestros datos y observaciones sí parecen mostrar una tendencia biogeográfica ya que una especie procede de la cordillera de la costa y la región del Biobío y las otras dos especies de la precordillera andina y la región de la Araucanía. Cabe destacar que las mismas especies (*M. andinensis* y *M. tridentina*) que hemos encontrado en la precordillera andina araucana han sido citadas en la precordillera de la Patagonia (Machuca *et al.*, 2021) pero no *M. importuna*, que hemos aislado e identificado a partir de muestras de la cordillera de la costa lo que sugiere que las distintas especies tienen distintas preferencias de hábitat. También en la Patagonia Argentina se encontraron estas dos especies en un trabajo pionero en el uso de marcadores moleculares en la región (Pildain *et al.*, 2014). Aunque en el texto de Pildain *et al.* (2014) no aparecen los nombres de *M. tridentina* y *M. andinensis*, en su análisis mostraron la presencia de Mel-2 y Mel-37 que según trabajos posteriores corresponden a estas especies (Richard *et al.*, 2015; Machuca *et al.*, 2021). Además, Pildain *et al.* (2014) también reportan Mel-7 (*M. eximia*) de la misma forma que Machuca *et al.* (2021). Nuestros datos del centro-sur de Chile en conjunto con los datos del sur (Patagonia chilena y Patagonia argentina) indican un importante componente biogeográfico en la distribución de las especies de *Morchella* en Chile.

Se requieren más estudios moleculares de especies del género *Morchella* en Chile por dos motivos principalmente: 1) la taxonomía del grupo es muy complicada y se sigue trabajando en ella para reducir las inconsistencias y las malas identificaciones de los trabajos que no han aplicado un concepto filogenético de especies (Du *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2015; Loizides *et al.*, 2022) y 2) se han realizado pocos trabajos con foco en las especies chilenas de *Morchella* en Chile (Oyanedel, 2016; Machuca *et al.*, 2021) especialmente trabajos moleculares (Machuca *et al.*, 2021).

Como conclusión, podemos considerar la técnica Bar-HRM como una herramienta útil para la discriminación molecular de especies del género *Morchella*, con un desempeño comparable al empleo de un único marcador molecular. Recomendamos el método para aplicaciones que requieran rapidez y eficiencia, pero lo más recomendable cuando sea posible es combinar varios marcadores moleculares. Además, este trabajo aporta información fiable de la presencia de 3 especies de *Morchella* en el centro-sur de Chile que aporta información valiosa de la distribución y biogeografía del género.

Agradecimientos

El material en estudio proviene de colectas realizadas con el financiamiento del Proyecto INNOVA-Corfo 12IDL2-16041. Los autores agradecen los comentarios anónimos del revisor 2, que contribuyeron a la mejora del manuscrito original.

Referencias

- Aguilar, A. 2012. Inoculación de *Morchella esculenta* y *Pisolithus tinctorius* en *Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelsh (1907). Tesis de experiencia recepcional, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Castresana, J. 2000 Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Cordero C, P Cáceres, G Gonzáles, K Quiroz, C Bravo, R Ramírez, P Caligari, B Carrasco, R García-González. 2011. Molecular tools for rapid and accurate detection of black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.) in inoculated nursery plants and comercial plantations in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71: 488-494.
- Correa, C., Martínez, A. 2013. Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile. Antecedentes Silvícolas y Tecnológicos de *Morchella* sp. St. Amans (*M. cónica*, *M. esculenta*, *Morchella* spp). (Proyecto Conaf-Infort). Plataforma de sistematización y difusión de información tecnológica de productos forestales no madereros PFM del bosque nativo. Chile.
- Cuevas Verdugo, F. J. (2023). Caracterización del crecimiento y actividad biológica de especies de *Morchella* del centro-sur de Chile cultivadas por fermentación en estado líquido.

- Du, X. H., Tang, J., Tan, H., Ling, J., Wang, Y., & Peng, W. H. (2026). Biology and cultivation of true morels (*Morchella* spp.): current progress and future trends. *Mushroomology*, 608-634.
- Druml, B., Cichna-Markl, M. 2014 High resolution melting (HRM) analysis of DNA – its role and potential in food analysis *Food Chemistry*, 158: 245-254
- Du X.H, Zhao, Q., Yang, Z.L., Hansen, K., Taşkin H., Büyükalaca, S., Dewsbury, D., Moncalvo, J.M., Greg, W., Douhan, G., Robert, V., Crous, P., Rehner, S., Rooney, A., Sink, S., O'Donnell, K. 2012. How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)? *Mycologia* 104: 1351–1368.
- Du, X.H., Q. Zhao, and Z. L. Yang. 2015. A review on research advances, issues, and perspectives of morels. *Mycology* 6: 78–85.
- Fernandes T., Costa, J., Oliveira, M., Mafr, I. 2017 DNA Barcoding coupled to HRM analysis as a new and simple tool for the authentication of *Gadidae* fish species. *Food Chemistry* 230: 49-57.
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013 MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology Evolution* 30: 772–780.
- Kuo M, Dewsbury, D., O'Donnell, K., Carter, M., Rehner, S., Moore, J., Moncalvo, J.M., Canfield, S., Stephenson, S., Methven A., Volk. T. 2012. Taxonomic revision of true morels (*Morchella*) in Canada and the United States, *Mycologia* 104: 1159-1177.
- Machuca, A., Gerding, M., Chávez, D., Palfner, G., Oyarzúa, P., Guillén, Y., and Córdova, C. 2021. Two new species of *Morchella* from *Nothofagus* forest in Northwestern Patagonia. *Mycological Progress*. 20(6): 781-795
- Madesis, P., Ganopoulos, I., Anagnostis, A., Tsaftaris A. 2012 The application of Bar-HRM (barcode DNA-high resolution melting) analysis for authenticity testing and quantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification *Food Control*, 25 (2): 576-582
- Molares, S., Toledo, C.V., Stecher, G., Barroetaveña, C. 2020 Traditional mycological knowledge and processes of change in Mapuche communities from Patagonia, Argentina: A study on wildedible fungi in Nothofagaceae forests. *Mycologia*, 112: 9–23. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1680219>
- O'Donnell, K., Rooney, A.P., Mills, G.L., Kuo, M., Weber, N.S., Rehner, S.A. 2011. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genet Biol.* 48:252–265.
- Oyanedel, R. 2016. Caracterización de sitios naturales productores de *Morchella* ssp: Estructura espacial y análisis edafoclimático en la región de La Araucanía, Chile. Tesis de Ingeniero Forestal, Facultad de Recursos Naturales. Universidad Católica de Temuco. Temuco, Chile.
- Pildain M., Visnovsky, B., Barroetaveña, C. 2014. Phylogenetic diversity of true morels (*Morchella*), the edible non-timber product from native Patagonian forests of Argentina. *Fungal Biology* 118: 755-763.
- Pilz, D., Mc Lain, R., Alexander, S., Villarreal-Ruiz, L., Berch, S., Wurtz, T.L., Parks, C.G., Mc Farlane, E., Baker, B., Molina, R., Smith, J.E. 2007. Ecology and Management of Morels Harvested from the Forests of Western North America. General Technical Report PNW-GTR-710. US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland.
- Pino, Y. T., Muñoz-Fariña, O., Bastías-Montes, J. M., Quevedo-León, R. A., García-Figueroa, O., Fraguera-Meissimilly, H., ... & Vidal-San Martín, C. (2026). Effects of Thermal and Non-Thermal Pretreatments on the Drying Kinetics and Bioactive Compounds of the Chilean Mushroom *Morchella conica*.
- Rugman-Jones, P., Stouthamer, R. 2017. High-resolution melt analysis without DNA extraction affords rapid genotype resolution and species identification. *Molecular Ecology Resources* 17: 598-607.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241-6246.
- Simko, I. 2016 High-resolution dna melting analysis in plant research. *Trends Plant Sciences* 21: 528–537.
- Stamatakis, A. 2014 RAXML Version 8: A Tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313, doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
- Taskin, H., Büyükalaca, H.H., Dogan, S.A., Rehner, K., O'Donnell, A. 2010 multigene molecular phylogenetic assessment of true morels (*Morchella*) in Turkey *Fungal Genetics and Biology* 47: 672-682
- Tietel, Z. Masaphy S. 2018 True morels (*Morchella*)-nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: a review *Crit. Rev. Food Sci.*, 58 (11): 1888-1901,
- Valdebenito, G. 2013. Existencia, uso y valor de los productos forestales no madereros (PFNM) del bosque nativo en Chile. Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile. III Congreso Latinoamericano de IUFRO, Costa Rica.
- White, T.J., Bruns, T. Lee, S., Taylor. J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322 Academic Press, Inc., New York.
- Winder, R. 2006. Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycological Research*. 110: 612-623.