

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL



PERFIL ENZIMÁTICO EXTRACELULAR DE *Morchella* spp.
DEL CENTRO-SUR DE CHILE CULTIVADAS BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

MEMORIA DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

PAULA LORETO ALISTER RIVAS

LOS ÁNGELES-CHILE

2023

PERFIL ENZIMÁTICO EXTRACELULAR DE *Morchella* spp.
DEL CENTRO-SUR DE CHILE CULTIVADAS BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

Alumna

Paula Alister Rivas
Ingeniera en Biotecnología
Vegetal

Profesora Guía

Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímica

Jefe de Carrera Ing.

Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de Ejecución Forestal

Directora de Departamento

Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que me han apoyado en este proceso. En primer lugar, a mis padres y hermanos, por apoyarme durante este tiempo.

A la tía Lina y Diego, quienes han estado ahí para mí en cada paso que he dado a lo largo de estos años. Su amor y apoyo incondicional han sido mi fuerza y motivación.

A Christian, Mauricio, Camila, Francisca, María José, Paulina y Sergio por ser los mejores amigos y compañeros, gracias por hacerme reír y haberme acompañado durante estos años y por celebrar mis logros junto a mí.

A la profesora Ángela Machuca por su infinita paciencia y orientación a lo largo de estos años.

A la profesora Yudith Guillen por su ayuda y apoyo, por esas tardes de conversación y su motivación.

Y por último agradecer al proyecto VRID-2021000363 MUL de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción por el apoyo financiero de la tesis.

INDICE DE CONTENIDO

Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
2. Marco teórico	12
Antecedentes de la especie	12
Actividad enzimática de <i>morchella</i> spp.	14
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	17
4.1 Objetivos específicos	17
5. Materiales y Métodos	18
5.1 Material fúngico	18
5.2 Screening para producción de enzimas en medio sólido	18
5.3 Actividad de Celulasas y Xilanasas	19
5.4 Actividad de Lacasas	19
5.5 Actividad de Amilasas	20
5.6 Actividad de Pectinasas	20
5.7 Actividad de Lipasas	20
5.8 Actividad de Proteasas	20
5.9 Determinación de actividad enzimática de las especies de <i>Morchella</i> en medio líquido	21
5.10 Preparación del medio líquido	21
5.11 Obtención de extractos enzimáticos	21
5.12 Endoglucanasas	22
5.13 Xilanasas	22
5.14 Amilasas	22

5.15	Fosfatasas ácidas y alcalinas.....	23
5.16	Lacasas y peroxidasas.....	23
5.17	Contenido de proteínas totales.....	23
5.18	Determinación de actividad enzimática de las especies de <i>Morchella</i> en medio semisólido con sustratos lignocelulósicos	24
5.19	Preparación de los medios.....	24
5.20	Obtención de los extractos enzimáticos a partir de los medios semisólidos	24
6.	Análisis de datos	25
7.	Resultados	26
7.1	Screening para producción de enzimas por <i>Morchella</i> spp. en medio sólido	26
7.2	Crecimiento y producción de enzimas extracelulares por especies de <i>Morchella</i> en medio de cultivo líquido.	42
7.3	Actividades enzimáticas en medio de cultivo líquido.....	48
7.4	Producción de enzimas extracelulares por especies de <i>Morchella</i> en medio semisólido con sustratos lignocelulósicos.....	55
8.	Discusión	66
9.	Conclusiones	74
10.	Bibliografía	76
11.	Anexo	87

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1:** Detección de actividad de endoglucanasa en cepas de *Morchella* spp., creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,5% de carboximetilcelulosa (CMC). Crecimiento fúngico a los 10 días de incubación (izquierda), y aparición de la reacción de endoglucanasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha)..... 28
- Fig. 2:** Detección de actividad de xilanasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,5% de xilano. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de xilanasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha)..... 30
- Fig. 3:** Detección de actividad de amilasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de almidón soluble. Crecimiento fúngico a los 4 días de incubación (izquierda), y aparición de la reacción de amilasas luego de aplicar solución de yodo al 1 % (derecha)..... 32
- Fig.4:** Detección de actividad de pectinasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,2 % de pectina ácida. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de pectinasas luego de aplicar solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1 % (derecha)..... 34
- Fig. 5:** Detección de actividad proteolítica en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de leche descremada. Crecimiento fúngico y reacción enzimática a los 2 días (izquierda) y a los 7 días de incubación (derecha)..... 36
- Fig. 6:** Detección de actividad de lipasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de Tween20. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de lipasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha)..... 38
- Fig. 7:** Detección de actividad de lacasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con sal de diamonio 2,2'-Azino-bis(ácido 3-

etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) al 0,02%. Actividad de lacasas observada a los 2 días de crecimiento (izquierda) y a los 7 días de crecimiento (derecha). .. 40

Fig. 8: Variación de pH en los caldos de cultivo de las especies de *Morchella* al crecer en medio líquido extracto de malta (A) y caldo papa-dextrosa (B) durante 20 días, con pH inicial ajustado a 6. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a través del test de Tukey..... 43

Fig. 9: Crecimiento de *Morchella* spp. en medio líquido extracto de malta (izquierda) y en caldo de papa-dextrosa (derecha) una vez transcurridos 20 días de incubación a 24°C, en condición estática..... 45

Fig. 10: Biomasa micelial producida por especies de *Morchella* al ser incubadas en medio líquido extracto de malta (A) y caldo de papa-dextrosa (B). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher. 46

Fig. 11: Contenido de proteínas solubles totales en los caldos de las especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher. 47

Fig. 12: Actividad de endoglucanasas producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher..... 49

Fig. 13: Actividad de xilanasas producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher. 50

Fig. 14: Actividad de amilasa producida por especies de <i>Morchella</i> creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.	52
Fig. 15: Actividad de fosfatasas ácidas producidas por especies de <i>Morchella</i> creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B) y fosfatasas alcalinas en medio EM (C) y PD (D), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.....	54
Fig. 16: Crecimiento de <i>Morchella</i> spp. en medio semi-sólido con distintos sustratos lignocelulósicos a los 20 días de incubación a 24 °C.	56
Fig. 16.a: Observación de micelio desarrollado por especies de <i>Morchella</i> creciendo en distintos sustratos lignocelulósicos luego de 15 días de incubación estática a 24°C.....	88
Fig. 17: Determinación de pH en los extractos enzimáticos de las especies de <i>Morchella</i> cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.	58
Fig. 18: Contenido de proteínas solubles totales en los extractos enzimáticos de las especies de <i>Morchella</i> cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.	59
Fig. 19: Actividad de endoglucanasas en los extractos enzimáticos de las especies de <i>Morchella</i> cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.	60
Fig. 20: Actividad de xilanasas en los extractos enzimáticos de las especies de <i>Morchella</i> cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos	

lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher. 62

Fig. 21: Actividad de amilasa en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher. 63

Fig. 22: Actividad de fosfatasa ácida (A) y fosfatasa alcalina (B) en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher. 64

Fig. 23: Actividad de lacasas y peroxidasas en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de granos de trigo. Valores de actividad son el promedio de dos réplicas $\pm$ desvío. 65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas o ecotipos de *Morchella* spp. utilizadas en este estudio..... 18

Tabla 1.A: intensidad de reacción de especies/ecotipos de *Morchella* spp cultivado en medio sólido de extracto de malta suplementado con distintos sustratos en donde: •••: intensidad alta; ••: media; •: baja; - : nula..... 87

Tabla 2: Tabla comparativa de la velocidad de crecimiento radial (mm/día) de las cepas/especies de *Morchella* cultivadas en medio base EMA suplementado con distintos sustratos enzimáticos..... 41

Resumen

Morchella spp. es un hongo comestible ampliamente utilizado por sus propiedades culinarias y medicinales, capaz de presentar diferencias morfológicas en distintas fuentes de carbono y nitrógeno, asociando este comportamiento a una producción enzimática característica. Sin embargo, la información acerca de estudios de producción de enzimas por *Morchella* spp. bajo diferentes condiciones de cultivo es aún muy limitada debido a la gran plasticidad de las especies. En este estudio 8 cepas de *Morchella* pertenecientes a 4 especies diferentes (*M. eximia* 153 y 236, *M. importuna* 237 y 239, *M. andinensis* 118 y 223, *M. tridentina* 226 y 251), han sido analizadas cualitativa y cuantitativamente para evaluar la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas al ser cultivadas en condiciones de fermentación sólida, líquida y semi-sólida en presencia de sustratos lignocelulósicos. Inicialmente, se llevó a cabo un análisis cualitativo (*screening*) en medio sólido, donde se confirmó la existencia de diferencias intra- e interespecíficas en la producción de endoglucanasas, xilanasas, amilasas y pectinasas, demostrando que *Morchella* spp. es capaz de utilizar y degradar distintos tipos de polisacáridos, además de proteínas y lípidos. La oxidación del sustrato ABTS sugirió la capacidad de degradación/modificación de lignina de todas las cepas. A partir de estos resultados se escogieron tres especies (*M. eximia* 153, *M. importuna* 239 y *M. andinensis* 223) para evaluar cuantitativamente la producción de enzimas en medio líquido extracto de malta (EM) y papa-dextrosa (PD). Una variedad de enzimas fue detectada en estas condiciones, y la actividad fue mucho mayor en medio PD que EM, siendo *M. eximia*, *M. andinensis* y *M. importuna* las que presentaron la mayor actividad de endoglucanasas, amilasas y fosfatasas, respectivamente. Bajo fermentación semisólida, *M. importuna* (239) produjo la mayor actividad de endoglucanasas en aserrín de roble, mientras que el resto de las enzimas evaluadas fue similar entre las especies, pero significativamente ($p < 0,05$) distintas entre los sustratos evaluados. Además, se detectó actividad oxidativa en las especies en presencia de granos de trigo, con *M. andinensis* produciendo la mayor actividad. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la capacidad enzimática degradativa en especies de *Morchella* del centro-sur de Chile.

Abstract

Morchella spp. is an edible fungus widely used for its culinary and medicinal properties, capable of presenting morphological differences in different carbon and nitrogen sources, associating this behavior to a characteristic enzyme production. However, information about enzyme production studies by *Morchella* spp. under different culture conditions is still very limited due to the great plasticity of the species. In this study 8 strains of *Morchella* belonging to 4 different species (*M. eximia* 153 and 236, *M. importuna* 237 and 239, *M. andinensis* 118 and 223, *M. tridentina* 226 and 251), have been qualitatively and quantitatively analyzed to evaluate the production of hydrolytic and oxidative enzymes when cultured under solid, liquid and semi-solid fermentation conditions in the presence of lignocellulosic substrates. Initially, a qualitative analysis (screening) was carried out in solid medium, which confirmed the existence of intra- and interspecific differences in the production of endoglucanases, xylanases, amylases and pectinases, demonstrating that *Morchella* spp. are capable of utilizing and degrading different types of polysaccharides, in addition to proteins and lipids. The oxidation of the ABTS substrate suggested the lignin degradation/modification capacity of all strains. From these results, three species (*M. eximia* 153, *M. importuna* 239 and *M. andinensis* 239) were chosen to quantitatively evaluate enzyme production in malt extract (ME) and potato-dextrose (PD) liquid medium. A variety of enzymes were detected under these conditions, and the activity was much higher in PD medium than EM, with *M. eximia*, *M. andinensis* and *M. importuna* showing the highest activity of endoglucanases, amylases and phosphatases, respectively. Under semi-solid fermentation, *M. importuna* (239) produced the highest endoglucanase activity on oak sawdust, while the rest of the enzymes evaluated were similar among species, but significantly ($p < 0.05$) different among the substrates evaluated. In addition, oxidative activity was detected in the presence of wheat grains, with *M. andinensis* producing the highest activity. These results contribute to the knowledge of the enzymatic degradative capacity of *Morchella* species from central-southern Chile.

1. Introducción

Morchella, más comúnmente conocida como colmenillas, han adquirido gran interés debido a su sabor y diversas propiedades medicinales (Reddy y Kanwal 2022). Sin embargo, a pesar del interés que ha generado *Morchella* spp. por sus propiedades medicinales y su sabor, aún existe incertidumbre en muchos otros aspectos de la especie. Más aún, las estrategias tróficas o nutricionales utilizadas por las especies de *Morchella* son hasta el día de hoy controversiales, debido a que se han descrito distintos tipos de comportamiento en cuanto a su forma de crecimiento, nutrición y cultivo (Machuca et al. 2021), presentando por ejemplo, características de crecimiento saprobio al ser cultivadas en medios sintéticos o semisintéticos (Liu et al. 2018). Pero también se han descrito comportamientos micorrícicos y endófitos de algunas especies (Liu et al. 2023). Además de su gran importancia económica como hongo comestible, en la actualidad, su potencial para producir enzimas ha llamado la atención de la comunidad científica, lo que ha llevado a numerosos estudios para evaluar su capacidad enzimática. Algunos autores han postulado que los componentes enzimáticos extracelulares de *Morchella* spp. desempeñarían un rol importante en el procesamiento hidrolítico de sustratos lignocelulósicos, mientras que otros afirman que poseen actividad oxidativa de polifenol oxidasas, lacasas, tirosinasas y peroxidasas, entre otros (Kanwal y Reddy 2014; Cai et al. 2021; Reddy y Kanwal 2022). Estas peculiares características estarían asociadas con las enzimas degradadoras hidrolíticas y/u oxidativas producidas por las especies de *Morchella* al ser sometidas a cultivo suplementado con distintos tipos de sustratos. Sin embargo, la literatura al respecto es aún limitada. En este estudio se propone evaluar el perfil enzimático extracelular de especies de *Morchella* al ser cultivadas en medios sólido, líquido y semi-sólido, con sustratos sintéticos o lignocelulósicos.

2. Marco teórico

Antecedentes de la especie

Morchella (Morchellaceae, Pezizales, Ascomycota), es un género de hongos monofiléticos, que comprende especies conocidas como colmenillas o morillas (Guzmán y Tapia 1998; Vignale et al. 2022). Estos hongos se caracterizan por formar ascomas macroscópicos, con pileos sulcados, estípites huecos, subcilíndricos a bulbosos, de colores claros, con una gran plasticidad morfológica entre especies (O'Donnell et al. 2011). A grandes rasgos, *morchela* es un hongo caracterizado principalmente por su apariencia de panal de abejas y su fructificación primaveral en zonas templadas, con excepción de un par de especies otoñales (Taşkın et al. 2015). En los últimos años, mediante filogenética molecular, se han identificado más de 80 especies de *Morchella* (Du et al. 2015; Ali et al. 2021; Sambyal y Singh 2021; Loizides et al. 2022), presentando una mayor diversidad en Europa, Norte América, Asia occidental y Asia oriental (Richard et al. 2015). *Morchela* crece en todos los bosques de clima templado y boreal del hemisferio norte, también se dan en algunas regiones mediterráneas y subtropicales. Sin embargo, rara vez se encuentran en climas cálidos (Eliuz y Goksen 2017). En Chile, esta especie fúngica ha sido reportada entre las regiones de Valparaíso y Aysén, en donde fructifican en distintos tipos de hábitats conformados por bosques nativos o plantaciones forestales, jardines y en zonas alteradas por factores externos como incendios forestales, tala de bosques, entre otros factores antrópicos (Loizides 2017; Machuca et al. 2021). Se cree que las *morchelas* se han adaptado a una amplia gama de hábitats y condiciones ambientales inusuales debido al tipo de micelio que poseen, ya que este es distinto a muchos otros hongos, debido a que presentan células hifales multicariotas o multinucleadas. Es decir, tienen múltiples copias de un mismo núcleo haploide (Volk y Leonard 1990; Du y Yang 2021). Esta característica permitiría a estos hongos adaptarse a diversas condiciones ambientales, los que incluyen asociaciones con árboles vivos o muertos (Clowez et al. 2014), cercanía de ríos, aserraderos, vertederos, dunas, huertos, entre otros (Pilz et al. 2007; Eliuz y Goksen 2017), y puede ser, además, una protección frente a mutaciones deletéreas. Los micelios de *morchela*, son capaces de formar una gran variedad de estructuras,

incluyendo esclerocios y ascocarpos (Kanwal y William 2016). Aunque autores plantean que el cambio de pH, temperatura, humedad, química del suelo, diversidad microbiana y otras perturbaciones también serían factores de gran importancia para la fructificación del hongo (Masaphy 2010; Liu et al. 2018). Los cuerpos fructíferos del hongo *morchela* son muy polimórficos en cuanto a su forma, color (maduro e inmaduro) y sabor (Masaphy 2010), así como también su composición química y bioactividad (Tietel y Masaphy 2018a). Por lo que, a pesar de que esta especie es de fácil reconocimiento en campo, es necesario no solo del estudio de sus características macroscópicas y microscópicas, sino también de su ecología y biogeografía e incluso de análisis moleculares para poder diferenciar entre especies (Hussain y Sher 2021). A partir de análisis moleculares se han diferenciado tres clados, o grupos filogenéticos: *Rufobrunnea*, *Esculenta* y *Elata* (O'Donnell et al. 2011).

La importancia del hongo *morchela* no radica sólo en su gran valor gastronómico y nutricional, sino también por su valor económico y científico (Liu et al. 2018). El hongo es codiciado en todo el mundo debido a que es rico en proteínas, aminoácidos, péptidos, vitaminas y otros componentes nutritivos con actividades anticancerígenas, antifatiga e inmunorreguladoras, entre otras (Ajmal et al. 2015; Wu et al. 2021). Además, posee un valor equivalente o incluso mejor que la proteína de la carne (Tietel y Masaphy 2018b), presentando propiedades organolépticas en el micelio, el cual es ampliamente utilizado como potenciador del sabor (Strapáč et al. 2019). El estado trófico de la especie ha sido tema de gran interés y debate científico, ya que según su forma de nutrición, este hongo ha sido descrito como saprobionte debido al rápido y abundante desarrollo del micelio en presencia de medios sintéticos, y como simbiontes mutualistas debido a las interacciones observadas en su medio natural (Guler y Ozkaya 2009; Tan et al. 2021).

A pesar de la gran importancia de este hongo a nivel mundial, existe un escaso conocimiento acerca de su ciclo de vida y de los factores que desencadenan la diferenciación e iniciación de sus cuerpos de fructificación, lo cual ha limitado la producción de cultivos bajo condiciones controladas. Ya que, si bien el cultivo de

morchela para la producción de cuerpos de fructificación comenzó hace ya décadas con los trabajos de Ower et al. (1986), convertidos en patentes, aún no se ha logrado establecer un protocolo de producción favorable. Al contrario, cada estudio genera desconfianza respecto a la efectividad de sus resultados. A partir de esto, algunos autores plantean que el fracaso del cultivo de morchela, se debe al conocimiento insuficiente respecto al desarrollo de los cuerpos de fructificación y los factores que controlan su desarrollo (Ower 1982; Tietel y Masaphy 2018b), además de la selección adecuada de las especies de *Morchella* para la realización de los cultivos comerciales *indoor* o *outdoor* (Liu et al. 2018). Sin embargo, existe consenso en cuanto a que es necesario favorecer la producción de esclerocios en el medio de cultivo como etapa previa a la obtención de ascocarpos, debido a que los esclerocios representarían un estado intermedio entre el crecimiento del micelio y la fructificación (Masaphy 2010; He et al. 2018). Los escasos estudios acerca del cultivo in vitro de *Morchella* spp. han estado dirigidos en su mayoría al cultivo vegetativo micelial para la producción de esclerocios con el objetivo de producir cuerpos de fructificación bajo condiciones controladas (Guler y Ozkaya 2009; Alvarado-Castillo et al. 2011). Otros estudios se han centrado en determinar las condiciones óptimas para el crecimiento micelial del hongo en fermentación líquida, para la producción de metabolitos secundarios, actividad antioxidante y antimicrobiana, entre otros (Vanti et al. 2021). Volk y Leonard (1989), por ejemplo, reportaron una mayor producción de esclerocios en *M. crassipes* mediante la utilización de centeno suplementado con peptona, extracto de malta, calcio y manganeso. Mientras que en estudios realizados por Winder (2006), se plantea que se obtiene un mayor crecimiento micelial de *M. elata* en medios compuestos por sacarosa: manosa (1:1) suplementado con extracto de levadura y carbonato de calcio (pH 7,7).

Actividad enzimática de *Morchella* spp.

Los hongos filamentosos son fábricas celulares muy eficientes para producir proteínas y péptidos gracias a sus eficaces sistemas de secreción (Lübeck y Lübeck 2022), de gran interés tanto económico y científico. Sin embargo, la investigación sobre la degradación de sustratos y producción de enzimas se ha centrado en

hongos saprobios basidiomicetos, como los hongos de podredumbre blanca, marrón y blanda y algunos patógenos de plantas como *Penicillium* sp, *Botrytis*, entre otros (Cai et al. 2017), que poseen distintas capacidades de degradación de materia orgánica y los cuales cumplen un papel de gran importancia en el ciclo ecológico y la industria química, médica y alimentaria (Jun et al. 2011). En los últimos años, el interés por el cultivo de morchela ha aumentado como resultado de recientes estudios bioquímicos y genéticos, debido a que, de entre una gran variedad de microorganismos no patógenos capaces de producir enzimas útiles, estos hongos podrían producir una amplia gama de enzimas capaces de escindir diversos tipos de materia orgánica entre las que se encuentran madera y productos secundarios elaborados a partir de la actividad humana (Bennett 1998; Kanwal y Reddy 2014). Las distintas especies/ecotipos de morchela han presentado comportamiento endofítico con distintas especies vegetales (Baynes et al. 2012; Phanpadith et al. 2020), mientras que otras se han comportado como saprofitas en medio de cultivo artificial (Ower et al. 1986; Liu et al. 2018; Reddy y Kanwal 2022). A partir de esto, autores han informado sobre las considerables variaciones morfológicas en la fisiología de *Morchella* spp. en distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Güler 2000; Winder 2006), asociando este comportamiento a la producción de enzimas en el medio de cultivo. Sin embargo, aún es escasa la información que existe sobre estudios de crecimiento y producción de enzimas lignocelulolíticas por *Morchella* spp. con diferentes parámetros nutricionales y en fermentación líquida o semi sólida.

En cuanto a la actividad enzimática observada en *Morchella* spp. algunos autores como Papinutti y Lechner (2008) informaron sobre la actividad enzimática lignocelulolítica de *M. esculenta* en sustratos lignocelulósicos, concluyendo que la secreción de enzimas ligninolíticas está regulada en gran medida por el carbono, las fuentes de nitrógeno y varios inductores químicos y naturales. Un resultado similar se observó en estudios realizados por Thakur (2015), en donde se apreció que las especies del clado Esculenta producían mayor actividad de celulasas, amilasas, pectinasas y ureasas a diferencia de las especies del clado Elata. Más recientemente, en estudios realizados por Cai et al. (2021) se evaluó la producción

de enzimas producidas por *M. importuna* al ser expuesta a medios de cultivo suplementados con distintos tipos de sustratos, concluyendo que el hongo fue capaz de producir 268 tipos de enzimas activas de carbohidratos (CAZYme) predominantes en el secretoma del hongo, seguida de proteasas, peptidasas y otras proteínas. La producción de todos estos tipos de enzimas sugiere que las especies de *Morchella* serían capaces de degradar y utilizar distintos tipos de sustratos como celulosa, proteínas, almidón, entre otros.

En ensayos realizados por Reddy y Kanwal (2022), se estudió la influencia de las fuentes de carbono, nitrógeno, inductores y distintos residuos agrícolas sobre el crecimiento y la actividad enzimática ligninocelulolítica de *M. spongiosa*. Aquí se concluyó que las fuentes de carbono como ramnosa y galactosa e inductores fueron capaces de influir en el crecimiento y la actividad enzimática de lacasa en *M. spongiosa*. Por otro lado, también determinaron que el ABTS y el alcohol veratrílico actúan como inductores capaces de mejorar la actividad de lacasa en el medio, sugiriendo además que la lacasa sería capaz de actuar como la única enzima responsable de la degradación de lignina (Reddy y Kanwal 2022). En cuanto a los residuos orgánicos, los autores determinaron que la actividad de lacasa fue mayor en presencia de granos y salvado de trigo, mientras que las actividades de peroxidasa versátil (VP) y manganeso peroxidasa (MnP) fueron mayores en los medios suplementados con paja de arroz y paja de trigo. En este estudio, *M. spongiosa* presentó una actividad de celulasas bajas en comparación con otras actividades enzimáticas, variando según el sustrato utilizado (Reddy y Kanwal 2022). Estos resultados además se complementan con los resultados obtenidos por Zhang et al. (2010), quienes observaron que *Morchella* spp. era un eficiente degradador de almidón.

Los estudios sobre producción enzimática en especies de *Morchella* en general son muy escasos. Por lo que evaluar el perfil enzimático extracelular de especies de *Morchella* provenientes de diferentes hábitats del centro-sur de Chile, podría entregar información de gran utilidad respecto a la fisiología del hongo en presencia de diferentes sustratos lignocelulósicos en su entorno natural.

3. Hipótesis

Las distintas especies de *Morchella* son capaces de producir un perfil diferenciado de enzimas degradativas hidrolíticas y oxidativas extracelulares al ser cultivadas en medios de cultivo sólidos y líquidos, suplementados con sustratos sintéticos o lignocelulósicos complejos.

4. Objetivo general

Evaluar la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares por diferentes especies de *Morchella* del centro-sur de Chile, cultivadas bajo diferentes condiciones de fermentación sólida y líquida.

4.1 Objetivos específicos

- Evaluar en forma cualitativa el crecimiento y producción de enzimas extracelulares en medio de cultivo sólido de las diferentes especies y cepas de *Morchella*, seleccionando aquellas con el mejor desempeño para los próximos ensayos.
- Determinar la cinética de crecimiento y producción de enzimas extracelulares de las especies de *Morchella* bajo diferentes condiciones de fermentación líquida.
- Caracterizar el perfil enzimático extracelular producido por las especies de *Morchella*, durante la fermentación semi-sólida de sustratos lignocelulósicos.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material fúngico

Para la realización de los ensayos se trabajó con aislados pertenecientes a *M. eximia* (153, 236), *M. importuna* (237, 239), *M. andinensis* (118, 223) y *M. tridentina* (226, 251); pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos del Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción, los cuales fueron previamente identificados mediante análisis molecular (Machuca et al. 2021; Sanz-Rocha et al. 2023). Las especies fueron constantemente repicadas y mantenidas en medio extracto de malta-agar (EMA) como cultivos stock.

Tabla 1: Cepas o ecotipos de *Morchella* spp. utilizadas en este estudio

Especie	Cepa	Origen
<i>M. eximia</i>	153	Bosque de pino quemado, Hualqui, Región del Biobío
<i>M. eximia</i>	236	Bosque de pino cosechado, Santa Fe, Región del Biobío
<i>M. andinensis</i>	118	Bosque nativo, Región de Aysén
<i>M. andinensis</i>	223	Bosque nativo, Región de Aysén
<i>M. importuna</i>	237	Jardín de zona urbana, Los Ángeles, Región del Biobío
<i>M. importuna</i>	239	Bosque de pino cosechado, Santa Fe, Región del Biobío
<i>M. tridentina</i>	226	Bosque nativo, Palena, Región de Los Lagos
<i>M. tridentina</i>	251	Bosque nativo, Región de Aysén

5.2 Screening para producción de enzimas en medio sólido

Un primer ensayo cualitativo fue realizado para detectar la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas cuando los aislados de *Morchella* fueron cultivados en medio sólido conteniendo diferentes sustratos enzimáticos (Sunitha et al. 2013). Se preparó un medio base compuesto por extracto de malta al 0,5% y agar al 1,5%, sin ajuste de pH, y suplementado con diferentes sustratos para detectar la producción

de las diferentes enzimas. Luego, los medios fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 1 atm de presión y 121°C. Se trabajó con las cepas anteriormente descritas (Tabla 1) en duplicado, más las placas control sin inocular. Se utilizaron placas Petri (9 cm), las cuales fueron preparadas con 20 mL de medio de cultivo y se inocularon en el centro con discos de micelio-agar de 5 mm tomados de cultivos stock. Posteriormente, las placas inoculadas fueron incubadas durante 7 días en oscuridad a 24 ± 1 °C, con registro diario del crecimiento y cambios morfológicos del micelio. La tasa de crecimiento micelial fue cuantificada y expresada en mm/día, y las reacciones enzimáticas fueron evaluadas cualitativamente, y cuando fue posible de forma semicuantitativa a través de la medición de los halos de reacción positiva.

5.3 Actividad de Celulasas y Xilanasas

Para la determinación de actividad de celulasas y xilanasas, el medio EMA fue suplementado con 0,5% (m/v) de carboximetilcelulosa (CMC) de media viscosidad y de xilano de *birchwood* respectivamente. las placas fueron inoculadas e incubadas de acuerdo con lo señalado anteriormente y al finalizar el periodo de incubación (7 días), las placas fueron reveladas con una solución rojo Congo al 1%, con incubación de 30 min. Luego, las placas fueron lavadas con solución de NaCl 1M. Aproximadamente 20 min después, fueron realizados con registros de detección de las enzimas celulasas y xilanasas a partir de la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias, posterior a la tinción, producto de la hidrólisis de los respectivos sustratos (Khoirunnisa et al. 2020).

5.4 Actividad de Lacasas

Para la detección de lacasas se preparó medio EMA suplementado con sal de diamonio 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) al 0,02%. El ABTS se adicionó al medio luego de la esterilización. Una vez terminado el periodo de incubación se evaluó el nivel de respuesta positiva/negativa de los ecotipos mediante la aparición de coloración azul-verdosa en el medio de cultivo, como resultado de la oxidación del ABTS por las enzimas lacasas (More et al. 2011).

5.5 Actividad de Amilasas

Para este ensayo se preparó medio EMA suplementado con almidón soluble al 0,2%. Finalizada la incubación las placas fueron inundadas con 5 mL de una solución de yodo al 1%, la cual luego de cubrir la superficie fue retirada de la placa. La reacción positiva fue evaluada por la aparición de zonas claras transparentes alrededor de las colonias (Sakthi et al. 2012).

5.6 Actividad de Pectinasas

Se preparó medio EMA suplementado con pectina al 0,2%. Tras el periodo de incubación, las placas fueron rociadas con una solución acuosa de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1% y se evaluó la reacción positiva en base a la aparición de zonas claras alrededor de la colonia del hongo que indicaba la producción de pectinasas (Ortiz et al. 2017).

5.7 Actividad de Lipasas

Para la evaluación de lipasas se preparó medio EMA suplementado con cloruro de calcio (CaCl_2) al 0,01%, NaCl al 0,5% y Tween20 al 1% (el cual fue añadido luego de la esterilización del medio). Una vez terminado el periodo de incubación, se evaluó la respuesta enzimática según la aparición de precipitado visible alrededor de la colonia producto de la formación de sales de calcio del ácido láurico liberado por la enzima, indicando una actividad de lipasas positiva (Sopalun y lamtham 2020).

5.8 Actividad de Proteasas

La actividad de proteasas fue determinada usando EMA suplementado con leche descremada al 1%. Una vez finalizado el periodo de incubación se evaluó la reacción enzimática según la aparición de zonas claras alrededor de las colonias producidas por la degradación del medio por acción de las proteasas (Agrawal et al. 2016).

5.9 Determinación de actividad enzimática de las especies de *Morchella* en medio líquido

5.10 Preparación del medio líquido

Para la realización de los ensayos en medio líquido se trabajó con las cepas 153 de *M. eximia*, 223 de *M. andinensis* y 239 de *M. importuna*, seleccionadas de acuerdo con los resultados obtenidos de los ensayos en medio sólido (screening inicial). Para evaluar la actividad enzimática de las especies de *Morchella* se prepararon dos ensayos utilizando matraces Erlenmeyer (100 mL) con 40 mL de medio líquido extracto de malta (EM) al 0,5%, con pH ajustado a 6,5; y caldo de papa dextrosa Difco™ (PD) con pH ajustado a 6,5. Los matraces fueron autoclavados durante 15 min a una presión de 1 atm y 121°C. Posteriormente, cuando los matraces alcanzaron una temperatura de aprox. 40°C, bajo cámara de flujo laminar, y con ayuda de un sacabocados estéril se obtuvieron discos de micelio-agar (7 mm), a partir de placas stock de cada una de las especies fúngicas, los cuales fueron añadidos a cada matraz para luego ser incubados estáticamente en cámara de crecimiento en oscuridad a 24±1 °C, durante 5, 10, 15 y 20 días. Se trabajó en triplicado y además se prepararon matraces con EM y PD, respectivamente, sin inocular utilizados como control para cada ensayo.

5.11 Obtención de extractos enzimáticos

Una vez terminado el periodo de incubación correspondiente, el contenido de los matraces se filtró al vacío utilizando papel filtro previamente secado en estufa a 60°C y pesado. Luego de la filtración, se separó el caldo enzimático del micelio. Los caldos ya filtrados fueron almacenados a -18°C hasta su utilización y la biomasa fue secada durante 48 h, y luego pesada para determinar diferencias de biomasa entre especies y periodos de incubación.

En los caldos filtrados se midió el contenido de proteínas solubles, pH y las actividades enzimáticas hidrolíticas relacionadas a la degradación de los polisacáridos celulosa, hemicelulosa y almidón; y enzimas oxidativas relacionadas a la degradación de lignina. Las enzimas hidrolíticas fueron determinadas utilizando sustratos enzimáticos específicos y midiendo la liberación de azúcares reductores

por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). Los análisis enzimáticos fueron realizados por espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro TU-1810 Split Beam UV-VIS. Las actividades enzimáticas se expresaron en U/ml.

5.12 Endoglucanasas

Las enzimas del complejo celulolítico fueron determinadas en la forma de endoglucanasas o endocelulasas. Utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato enzimático (Tanaka et al. 1986). Para ello, 900 µL de CMC al 1% (en tampón acetato de sodio 0,1M, pH 5) se mezclaron con 50 µL de agua desionizada y 50 µL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 50°C por 30 min, y luego se agregó 1500 µL de DNS, para incubar nuevamente a 100°C por 5 min. una vez enfriados los tubos se midió absorbancia a 540 nm (Tanaka et al. 1986; Cai et al. 2021). Los valores de absorbancia se transformaron en concentración de glucosa (mg/mL) utilizando una curva de calibración.

5.13 Xilanasas

Las enzimas del complejo hemicelulolítico fueron determinadas en la forma de endoxilanasas o xilanasas, utilizando xilano de *birchwood* como sustrato enzimático (Tanaka et al. 1986). Para ello, 900 µL de xilano al 1% (en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5), se mezclaron con 80 µL de agua desionizada y 20 µL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 50°C por 30 min, y luego se agregaron 1500 µL de DNS y se incubó a 100°C por 5 min. Una vez fríos los tubos, se midió la absorbancia a 540 nm (Tanaka et al. 1986). Los valores de absorbancia se transformaron en concentración de xilosa (mg/mL) utilizando una curva de calibración.

5.14 Amilasas

La actividad de amilasas se determinó usando almidón soluble como sustrato enzimático (Sunitha et al. 2013). Para ello, 900 µL de almidón al 1% (en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5), se mezclaron con 50 µL de agua desionizada y 50 µL de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 40°C por 10 min, y luego se agregaron 1500 µL de DNS, y se incubó a 100°C por 5 min. Una vez fríos

los tubos, se midió absorbancia a 540 nm (Cai et al. 2021), y los valores se transformaron en concentración de glucosa de la misma forma descrita en 3.1.

5.15 Fosfatasas ácidas y alcalinas

La actividad de fosfatasas alcalinas se determinó utilizando 1 mL de tampón de hidróxido de sodio-glicina (pH 9, 0,1 M), 0,4 mL del extracto enzimático, 0,5 mL de sustrato de p-nitrofenil-fosfato y 0,1 mL de $MgCl_2$. Para fosfatasas ácidas se realizó el mismo procedimiento, cambiando el tampón anteriormente mencionado por tampón citrato (pH 5, 0,1M). La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 30 min, tras lo cual se les añadió 100 μ L de NaOH 5 M. La liberación de p-nitrofenol se midió a 400 nm (Adhikari y Pandey 2019). Se construyó una curva de calibración con p-nitrofenol lo cual permitió transformar los valores de absorbancia en actividad enzimática.

5.16 Lacasas y Peroxidasas

La determinación de las enzimas ligninolíticas lacasas y peroxidasas se realizó usando 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) como sustrato enzimático, y en el caso de las peroxidasas se usó además peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como co-sustrato (Bourbonnais y Paice 1990). La mezcla de reacción de lacasas contenía 100 μ L de ABTS 0,5 mM, 400 μ L de tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5 y 1000 μ L de extracto enzimático. Inmediatamente la mezcla se introdujo en el espectrofotómetro y se siguió el aumento de absorbancia durante 10 min a 420 nm, debido a la oxidación del ABTS. La mezcla de reacción de las peroxidasas también contenía 100 μ L de ABTS 0,5 mM y 1000 μ L de extracto enzimático, pero además contenía 15 μ L de H_2O_2 2 mM y 285 μ L de tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 5 (Bourbonnais y Paice 1990). Los valores de absorbancia se transformaron en actividad de fenoloxidasas (UI/mL), en donde UI equivale a los μ moles de sustrato oxidado (ABTS) por min de reacción.

5.17 Contenido de proteínas totales

La medición del contenido de proteínas totales extracelulares se realizó a través del método Bradford (1976), utilizando 100 μ L del extracto enzimático y 1000 μ L del reactivo de Bradford. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 5 min y luego se midió la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia fueron

transformados en concentración de proteínas (mg/mL) usando una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino (BSA).

5.18 Determinación de actividad enzimática de las especies de *Morchella* en medio semisólido con sustratos lignocelulósicos

5.19 Preparación de los medios

Se evaluó la actividad de especies de *Morchella*, creciendo en medio semisólido suplementado con diferentes sustratos lignocelulósicos, utilizados sin remojo previo: aserrín de roble Pellín (*Nothofagus obliqua*), granos de trigo, y una mezcla de paja de trigo y afrecho en proporción 1:1, de acuerdo a lo descrito por Ower et al. (1986), con modificaciones. Se utilizaron matraces Erlenmeyer (250 mL), los que fueron llenados 1/3 de su capacidad con cada tipo de sustrato seco para cubrir completamente su base, lo que correspondió a una cantidad aprox. de 13 g. Luego, los sustratos se humedecieron con 25 mL de medio extracto de malta al 0,5% sin ajuste de pH. Una vez llenados, los matraces fueron tapados con tapones de algodón y aluminio para luego ser llevados a autoclavar a 121°C por 15 min a una presión de 1 atm. Una vez fríos los matraces (40°C aproximadamente), bajo cámara de flujo laminar y con ayuda de un sacabocados estéril, se inocularon con discos de micelio-agar (7 mm) tomados a partir de placas stock. Una vez inoculados, fueron incubados estáticamente en cámara de crecimiento en oscuridad a 24±1 °C, durante 20 días para evaluar la producción enzimática. Además, el pH del medio fue medido al inicio (pH 6) y al final del ensayo para evaluar sus cambios. El crecimiento y desarrollo de micelios y esclerocios fue evaluado en cada matraz de forma cualitativa, a través de observaciones visuales periódicas. Se trabajó en duplicado, y se prepararon matraces control compuestos por sustrato y medio de cultivo sin inocular, por cada sustrato a evaluar.

5.20 Obtención de los extractos enzimáticos a partir de los medios semisólidos

Para la obtención de los caldos enzimáticos se realizó una extracción con agua desionizada, agregada directamente sobre los sustratos colonizados (Cai et al. 2017). Se añadieron 20 mL de agua desionizada a cada matraz y se incubó en

agitador durante 1 h a 120 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos enzimáticos se recuperaron por filtración en papel filtro y al vacío. El procedimiento de filtración se repitió dos veces. Los extractos fueron guardados en frascos a -18°C hasta su utilización en la determinación de las actividades enzimáticas hidrolíticas y oxidativas, de la misma forma descrita anteriormente.

6. Análisis de datos

En el estudio, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statistica V10 para comparar la producción enzimática de diferentes especies de *Morchella*. Se recopilaron datos de varios ensayos enzimáticos que se incubaron durante distintos periodos de tiempo, y se utilizó el software para determinar las diferencias significativas entre las especies en los diferentes periodos de incubación. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas si los valores de p fueron iguales o inferiores a 0,05. Este análisis permitió evaluar la variabilidad de los datos y determinar si había diferencias significativas en la producción enzimática entre las especies de *Morchella*.

7. Resultados

7.1 Screening para producción de enzimas por *Morchella* spp. en medio sólido

Se llevó a cabo un ensayo cualitativo para detectar la producción de enzimas hidrolíticas y/u oxidativas cuando las cepas de *Morchella* fueron cultivadas en medio sólido suplementado con distintos sustratos enzimáticos. En general, los ensayos enzimáticos tardaron entre 4 a 7 días aproximadamente en poder apreciarse, debido al rápido crecimiento del hongo y a la acción en el medio. Con la mayoría de los aislados fue posible apreciar crecimiento micelial y reacción enzimática positiva, dependiendo del sustrato adicionado al medio de cultivo. En algunos casos, fue necesario adicionar un reactivo cromóforo para facilitar la visualización de la acción enzimática en el medio. Las cepas estudiadas variaron entre sí en cuanto a velocidad de crecimiento, morfología micelial desarrollada en cada medio, e intensidad de reacción producida a lo largo del periodo de incubación (ver tabla 1.a en anexo). La evaluación de celulasas del tipo endoglucanasa tardó alrededor de 10 días debido al lento crecimiento de las especies en este medio sólido suplementado con carboximetilcelulosa (CMC), principalmente en las especies *M. eximia* (236), *M. andinensis* (223), *M. importuna* (237), y *M. tridentina* (226) (Fig. 1). Una pigmentación marrón característica del hongo morchela fue observada en este medio, sobre todo en las especies *M. andinensis* (118) y *M. tridentina* (251), y no se detectó presencia de esclerocios en ninguna de las cepas estudiadas. En cuanto a la actividad celulolítica, esta fue detectada en todas las cepas, las cuales mostraron halos de mayor o menor tamaño alrededor de los inóculos (Fig. 1), resultado de la reacción positiva, y que se apreció con más facilidad posterior a la tinción con rojo Congo al 1%. En general, el crecimiento del hongo se vio inhibido producto de la composición del medio de cultivo (Tabla 2). Sin embargo, esto no impidió apreciar ciertas diferencias entre las cepas en relación con el crecimiento y reacción enzimática. En este ensayo, la cepa que presentó el mayor crecimiento fue *M. importuna* (239) (0,73 mm/día), seguida de *M. andinensis* (118) y *M. tridentina* (251) (Tabla 2). Si bien, todas las especies/cepas presentaron halos de hidrólisis, esta varió en cuanto a tamaño e intensidad (Fig. 1), siendo ambas cepas de *M.*

andinensis (118 y 223) quienes presentaron un halo de hidrólisis mucho más prominente en comparación a las demás cepas estudiadas. *M. eximia* (153 y 236), a pesar del crecimiento observado en el medio también presentó halos marcados posterior a la tinción, producto de la producción de enzimas extracelulares que hidrolizan carboximetilcelulosa en el medio. Una reacción similar fue observada en las cepas de *M. tridentina* (226 y 251) en donde al igual que en las especies antes descritas, también se aprecian halos de hidrólisis de gran tamaño alrededor del inóculo. En el caso de *M. tridentina* 251, su crecimiento cubrió la reacción dejando ver sólo una parte de la reacción en el medio.

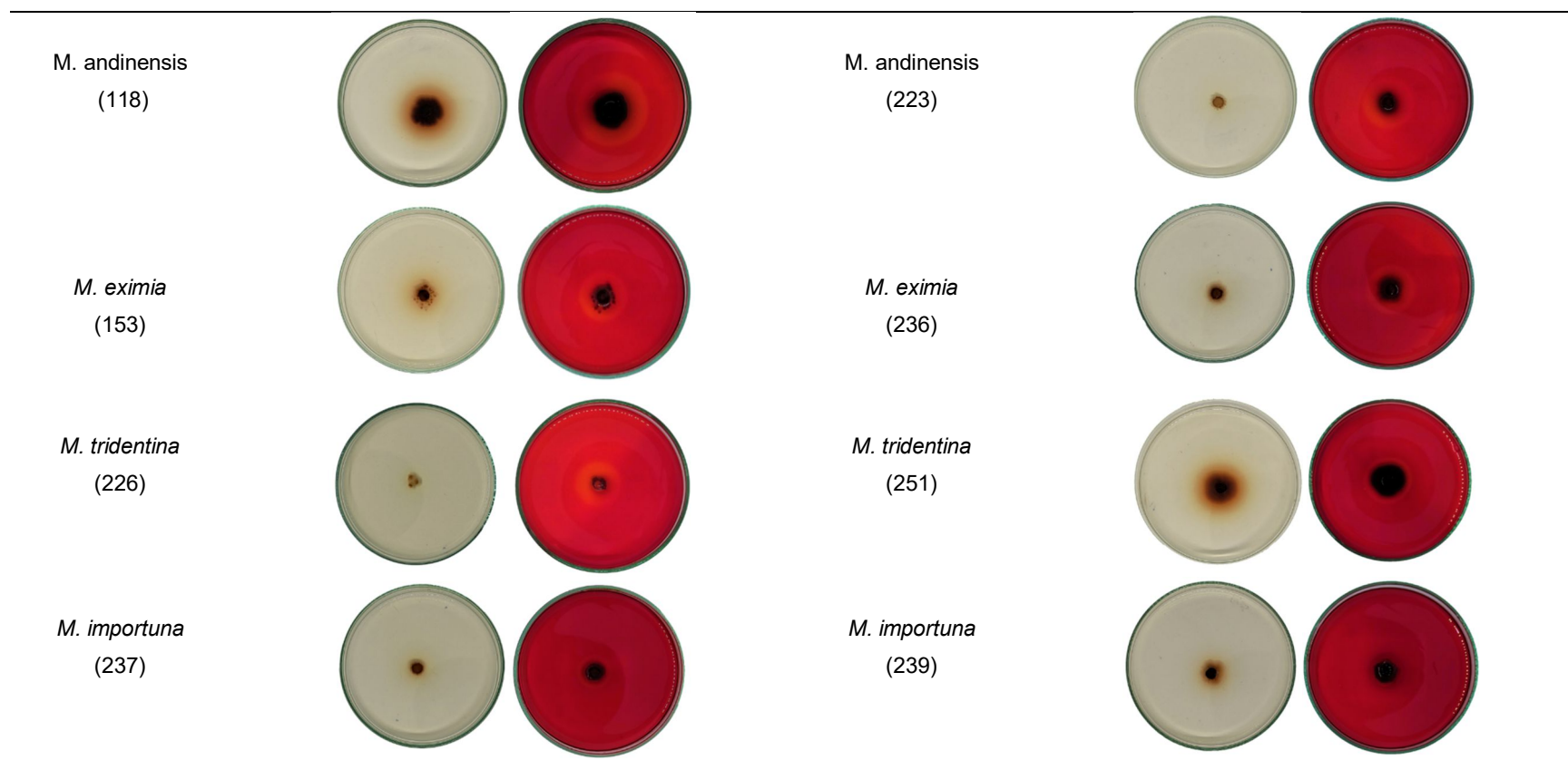


Fig. 1: Detección de actividad de endoglucanasa en cepas de *Morchella* spp., creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,5% de carboximetilcelulosa (CMC). Crecimiento fúngico a los 10 días de incubación (izquierda), y aparición de la reacción de endoglucanasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha).

A diferencia del ensayo anterior, en el medio de cultivo suplementado con xilano para detección de xilanasas se pudo observar un mayor crecimiento de todas las cepas, con tasas de hasta 9 mm/día, siendo las cepas de *M. importuna* (237 y 239), quienes presentaron un mayor crecimiento en comparación con las otras cepas (Tabla 2). A lo largo del ensayo las cepas fueron desarrollando un micelio delgado y abundante que ocupó por completo las placas al cabo de 4 días. Con el paso del tiempo, las cepas comenzaron a producir pigmentación marrón característica de *Morchella*, en especial en *M. andinensis* (118), *M. importuna* (239) y *M. tridentina* (251) (Fig. 2).

Al finalizar el ensayo, se pudo visualizar aparición de esclerocios de distintos tamaños y apariencia blanquecina en la superficie del medio en las cepas *M. eximia* (153 y 236), *M. andinensis* (223), *M. importuna* (237) y *M. tridentina* (226). Sin embargo, a pesar del rápido crecimiento en este medio suplementado con xilano, no fue posible apreciar una reacción enzimática xilanolítica evidente (Fig. 2). Esto quizás debido al rápido crecimiento del hongo, el cual cubrió por completo la placa con micelio, impidiendo la visualización de cualquier formación de halo de hidrólisis alrededor de la zona de crecimiento.

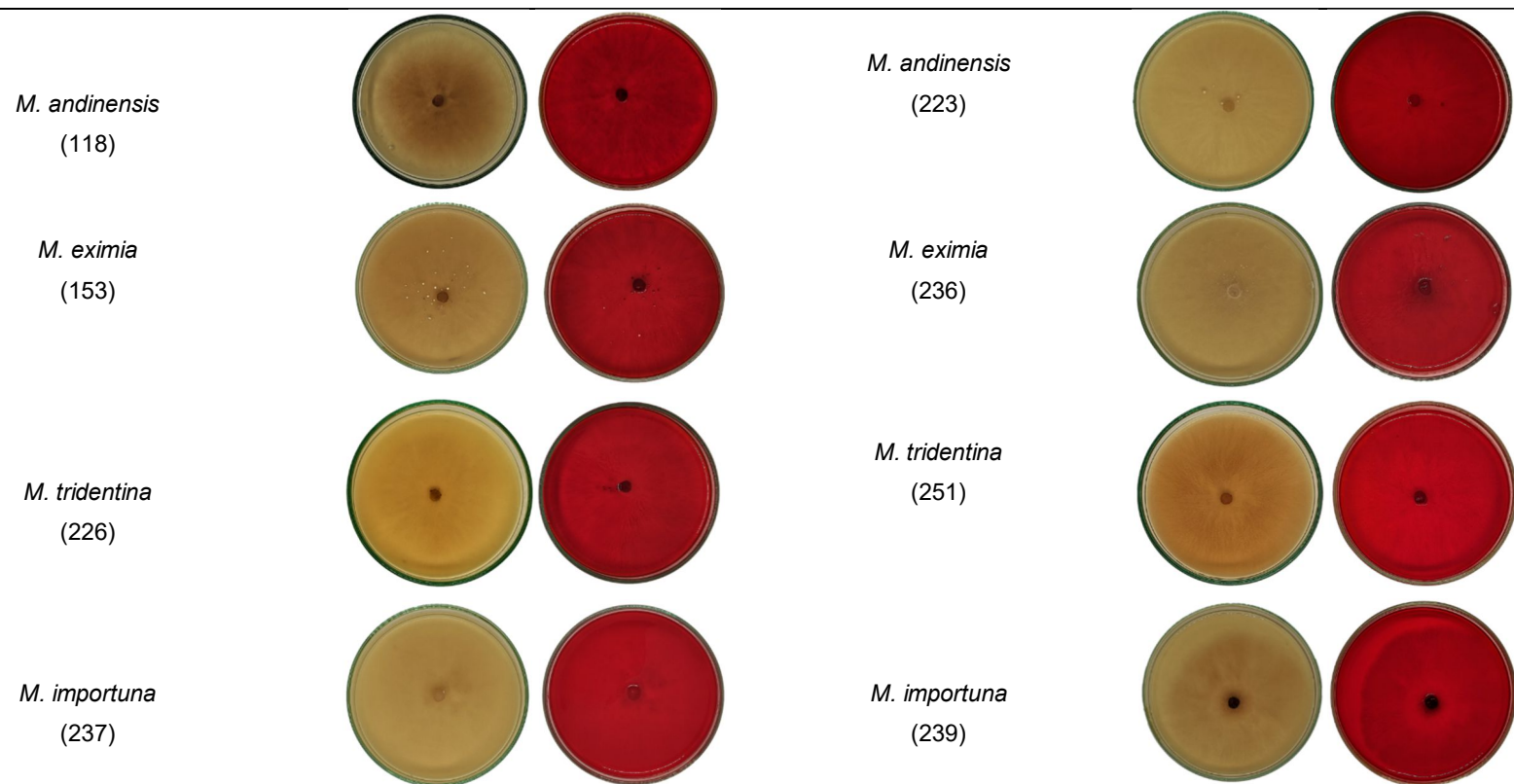


Fig. 2: Detección de actividad de xilanasas en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,5% de xilano. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de xilanasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha).

Cuando se utilizó el medio EMA suplementado con 1% de almidón para detección de amilasa, el ensayo tuvo una duración de 4 días aproximadamente, debido a que la mayoría de las cepas de *Morchella* presentaron elevadas tasas de crecimiento, de hasta 13 mm/día, como en el caso de *M. eximia* (Tabla 2). Se pudo apreciar el desarrollo de micelio de coloración blanquecina, micelio sumergido y algodonoso en todas las cepas, sin presencia de esclerocios hasta la finalización del ensayo. La solución de iodo utilizada como revelador facilitó la observación de halos de hidrólisis en el medio con almidón (Fig. 3). En este ensayo, todas las cepas fueron capaces de producir actividad de amilasa. Sin embargo, el rápido crecimiento de *M. eximia* (153 y 236) dificultó la visualización de la reacción producida en la placa (Fig. 3). En cuanto a las tasas de crecimiento en presencia de almidón, ambas cepas de *M. eximia* (153 y 236) presentaron las mayores tasas de crecimiento (> 13 mm/día), seguidas de *M. andinensis* (223), *M. importuna* (237) y *M. tridentina* (226).

Las cepas *M. andinensis* (118), *M. importuna* (239) y *M. tridentina* (251), presentaron un halo de hidrólisis significativamente menor en comparación con las demás cepas evaluadas. *M. tridentina* (226), por otro lado, produjo un halo de hidrólisis significativamente mayor en comparación con las demás cepas evaluadas (Fig. 3). Para el resto de las cepas estudiadas, el crecimiento excesivo afectó la observación de los halos de hidrólisis producidos en el medio. Sin embargo, aun así, fue posible apreciar halos más tenues por debajo de la tinción con iodo.

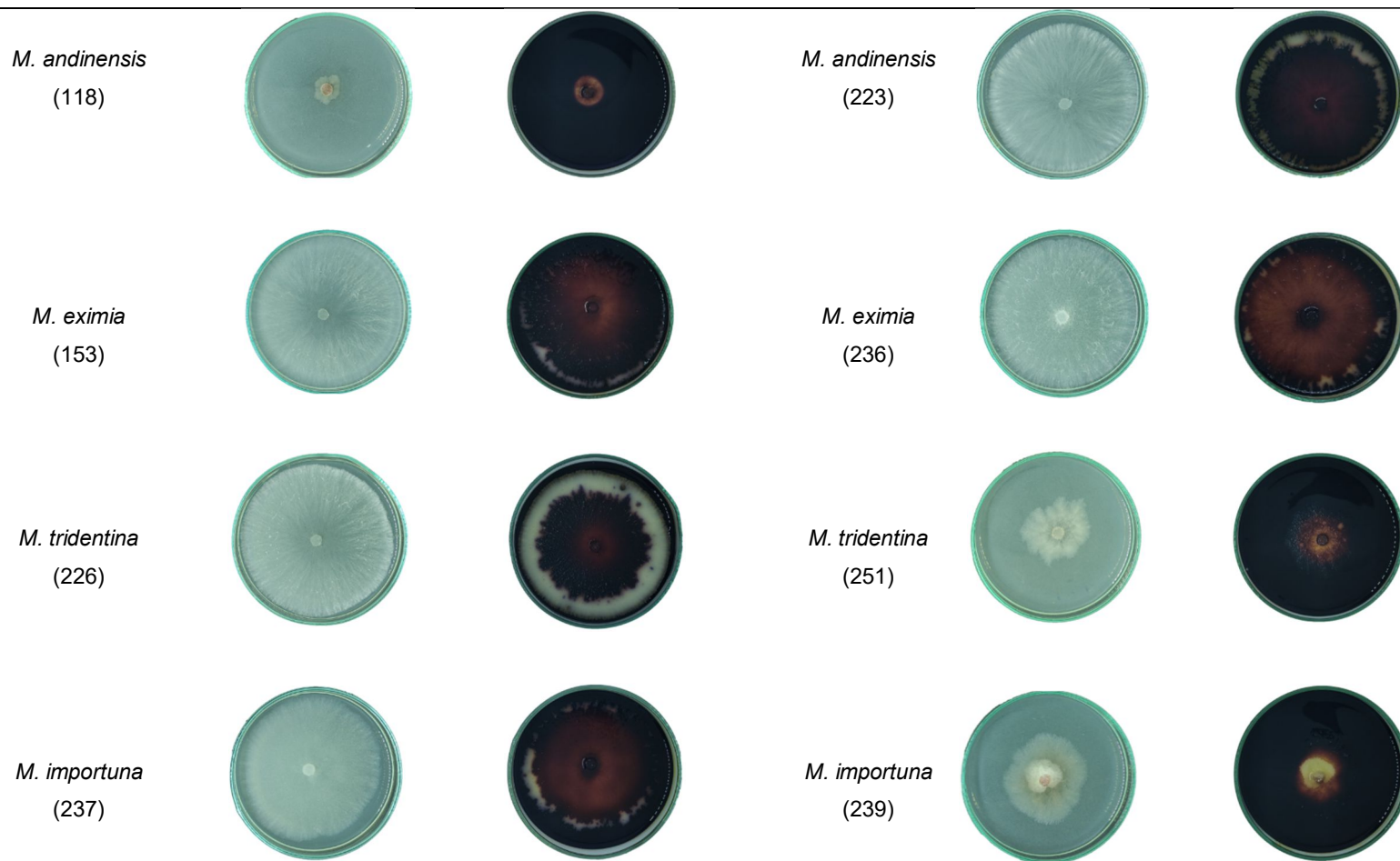


Fig. 3: Detección de actividad de amilasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de almidón soluble. Crecimiento fúngico a los 4 días de incubación (izquierda), y aparición de la reacción de amilasas luego de aplicar solución de yodo al 1 % (derecha).

En el medio suplementado con pectina ácida al 0,2%, para evaluar la producción de pectinasas, se observó un crecimiento distinto en cada cepa, siendo *M. andinensis* (223) y *M. eximia* (153, 236), las que presentaron mayores tasas de crecimiento en este medio, pero la cepa 118 de *M. andinensis* no mostró crecimiento en este medio (Tabla 2, Fig. 4). La mayoría de las cepas mostraron un desarrollo micelial sumergido, produciendo la pigmentación color marrón típica de la especie. *M. eximia* (236), a diferencia del resto mostró un desarrollo micelial muy irregular, presentando además un micelio aéreo y pigmentación más bien blanquecina (Fig. 4).

Una vez finalizado el periodo de incubación, las placas fueron inundadas con CTAB al 1% para revelar la reacción y poder apreciar los halos transparentes en el medio. Todas las cepas manifestaron el halo típico de la reacción producto de la liberación de enzimas pectinasas en el medio, incluso aquellas que no presentaron crecimiento micelial como fue el caso de *M. andinensis* (118) (Fig. 4). Si bien, en general todas las cepas estudiadas presentaron una reacción positiva en el medio evaluado, se observó que *M. eximia* (153) y *M. andinensis* (223) presentaron una reacción enzimática mucho mayor en comparación a las demás cepas estudiadas. *M. andinensis* (223), tuvo un rápido crecimiento en el medio estudiado, lo cual dificultó la visibilidad de la reacción. Sin embargo, una vez inundada la placa con el agente revelador, ésta manifestó la reacción esperada en el medio en los bordes de la colonia de micelio. En contraste, *M. tridentina* (226) produjo un halo de hidrólisis de pectina muy tenue en comparación a las demás cepas.

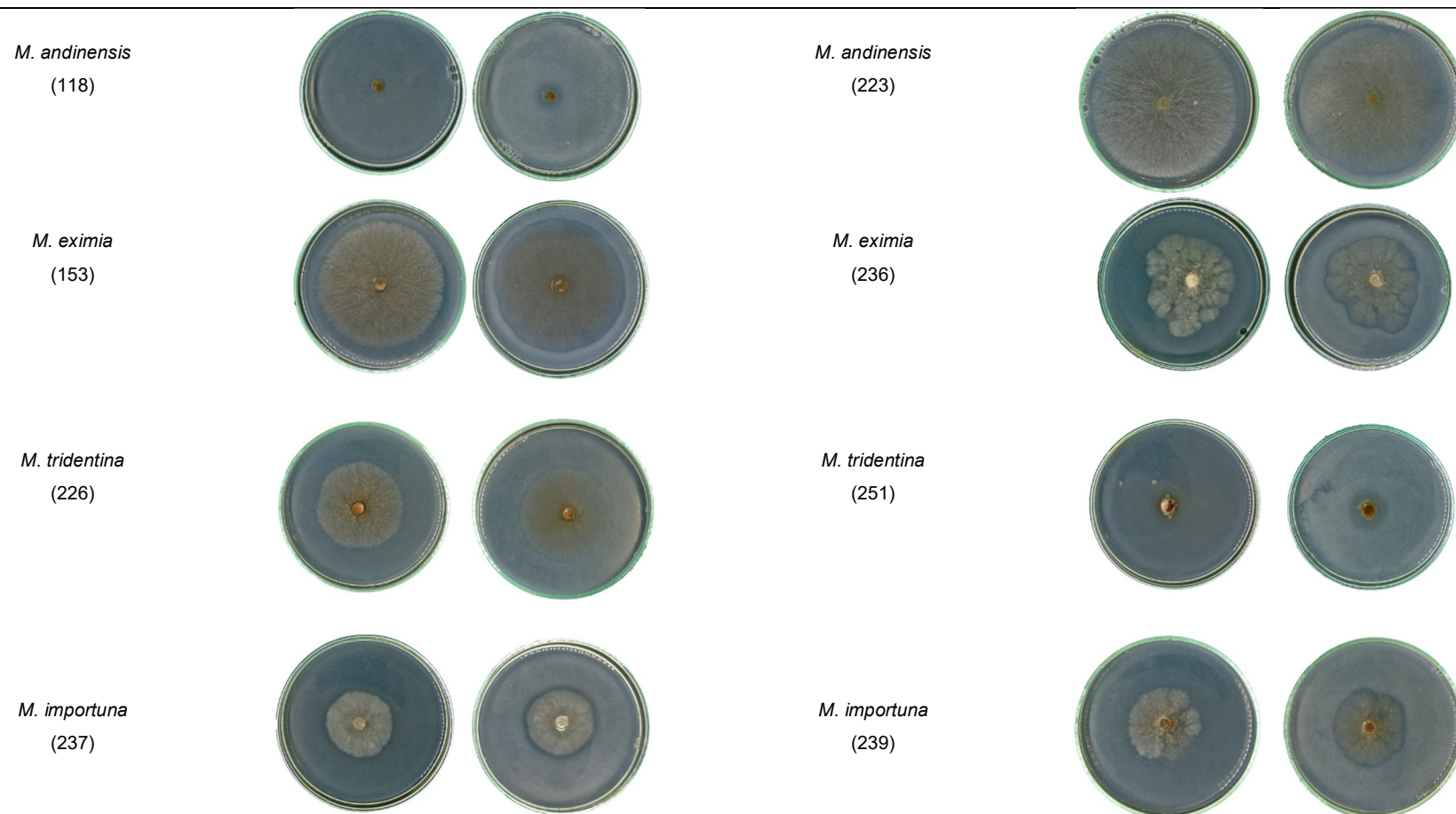


Fig.4: Detección de actividad de pectinasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 0,2 % de pectina ácida. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de pectinasas luego de aplicar solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1 % (derecha).

Para evaluar la producción de enzimas proteasas por las cepas de *Morchella* se utilizó medio EMA suplementado con leche descremada al 1 % como sustrato, lo que produjo un medio muy opaco, por lo que resultó difícil la visualización del desarrollo de micelio al inicio del periodo de incubación (Fig. 5). Sin embargo, a medida que las cepas comenzaron a crecer y degradar el sustrato, fue posible comenzar a ver la formación de halos alrededor de las colonias. En algunas cepas esta reacción fue casi inmediata, como fue el caso de *M. eximia* (236) y *M. importuna* (237), mientras que en otras la reacción se manifestó al alcanzar un mayor crecimiento en la placa como fue el caso de *M. eximia* (153) y *M. andinensis* (223) (Fig. 5). A lo largo del ensayo, se observó un mayor crecimiento en las cepas *M. importuna* (237, 239), seguidas de *M. andinensis* (223) y *M. eximia* (153, 236), mientras que *M. andinensis* (118) no presentó crecimiento ni reacción en este medio (Tabla 2, Fig. 5). Lo mismo ocurrió con *M. tridentina* (251), quien, a pesar del crecimiento obtenido a lo largo del periodo de incubación, no fue capaz de producir hidrólisis del sustrato (Fig. 5).

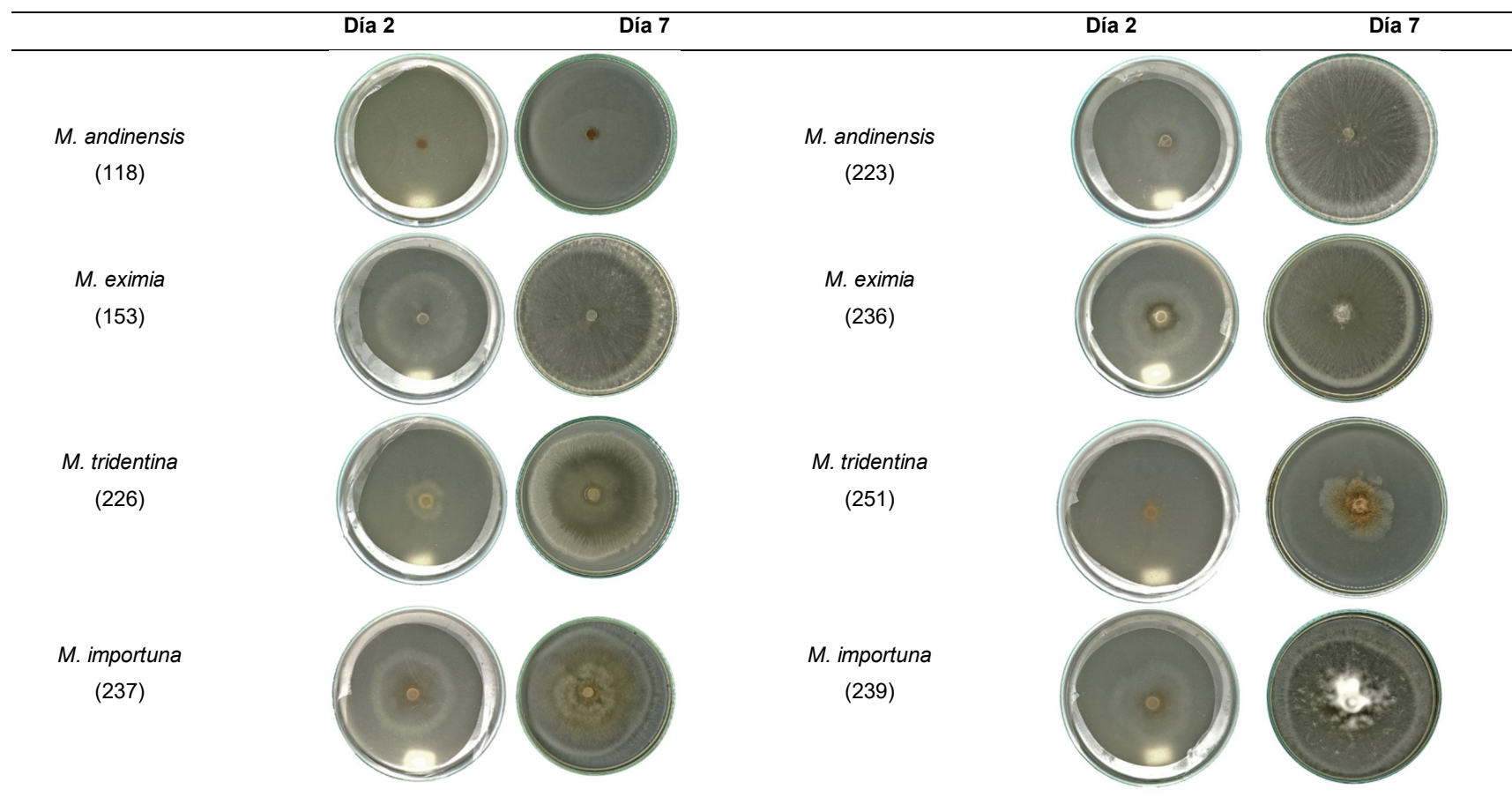


Fig. 5: Detección de actividad proteolítica en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de leche descremada. Crecimiento fúngico y reacción enzimática a los 2 días (izquierda) y a los 7 días de incubación (derecha).

En el medio EMA suplementado con 1 % de Tween 20 para detectar la producción de lipasas, se pudo constatar que el crecimiento de la mayoría de las cepas de *Morchella* se vio fuertemente inhibido (Tabla 2), siendo *M. importuna* (237, 239) y *M. eximia* (236) las cepas que presentaron mayor desarrollo micelial (Tabla 2, Fig. 6). A pesar de estos resultados, se pudo apreciar halos de hidrólisis en algunas cepas que no presentaron crecimiento apreciable en el medio (Fig. 6), como es el caso de las cepas *M. andinensis* (118 y 223), *M. eximia* (153) y *M. tridentina* (226) en donde se produjo una inhibición del desarrollo micelial, pero no de la reacción de hidrólisis (Fig. 6). La visualización de la reacción producida por las especies/cepas que presentaron un mayor crecimiento se vio dificultada debido al rápido crecimiento. De igual manera, se pudo observar que en las especies que presentaron mayor crecimiento (*M. eximia* 236, *M. importuna* 237 y 239) si se produjo un tenue halo de hidrólisis que acompañó el crecimiento micelial del hongo. Esto fue más evidente luego de realizar la tinción con rojo Congo al 1% (Fig. 6).

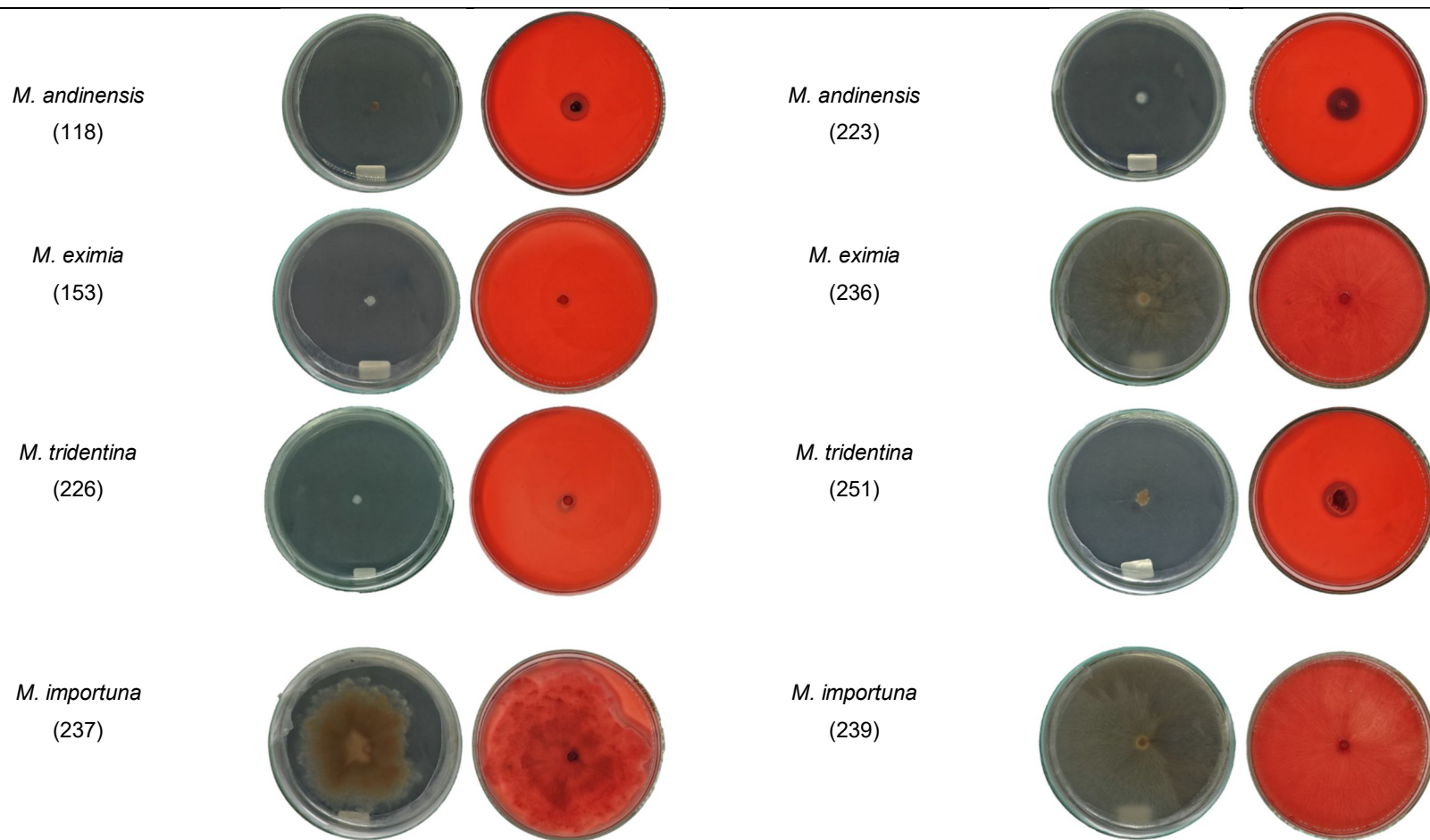


Fig. 6: Detección de actividad de lipasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con 1 % de Tween20. Crecimiento fúngico a los 7 días de incubación (izquierda), y revelación de la reacción de lipasas luego de aplicar solución rojo Congo al 1 % (derecha).

La actividad oxidativa de lacasa fue evaluada en las cepas de *Morchella* spp. usando medio de cultivo EMA suplementado con el sustrato ABTS. La reacción positiva de oxidación del sustrato fue observada en todas las cepas evaluadas (Fig. 7), siendo *M. andinensis* (118), *M. eximia* (153), *M. importuna* (239) y *M. tridentina* (226, 251) las que mostraron reacción de oxidación de ABTS en los primeros días de evaluación, y de ellas *M. eximia* (153), *M. importuna* (239), *M. tridentina* (251) y también *M. andinensis* (223), fueron las que manifestaron una reacción mucho más intensa luego de tres días de incubación (Fig. 7). El crecimiento micelial en este medio fue rápido, similar al observado anteriormente en el medio suplementado con almidón soluble, con la diferencia que aquí fueron *M. andinensis* (223) y *M. eximia* (153, 236), quienes presentaron una mayor tasa de crecimiento en comparación a las demás cepas (aprox. 10 mm/día) (Tabla 2). Por otro lado, fue *M. andinensis* (118) quien presentó un menor crecimiento en comparación con las otras cepas (Tabla 2). Una vez finalizado el periodo de incubación, se pudo apreciar que en las cepas *M. andinensis* (223), *M. eximia* (153, 236), *M. importuna* (237, 239), y en mucho menor medida en *M. tridentina* (225, 251) y en *M. andinensis* (118), la actividad enzimática fue liberada al medio (Fig. 7).

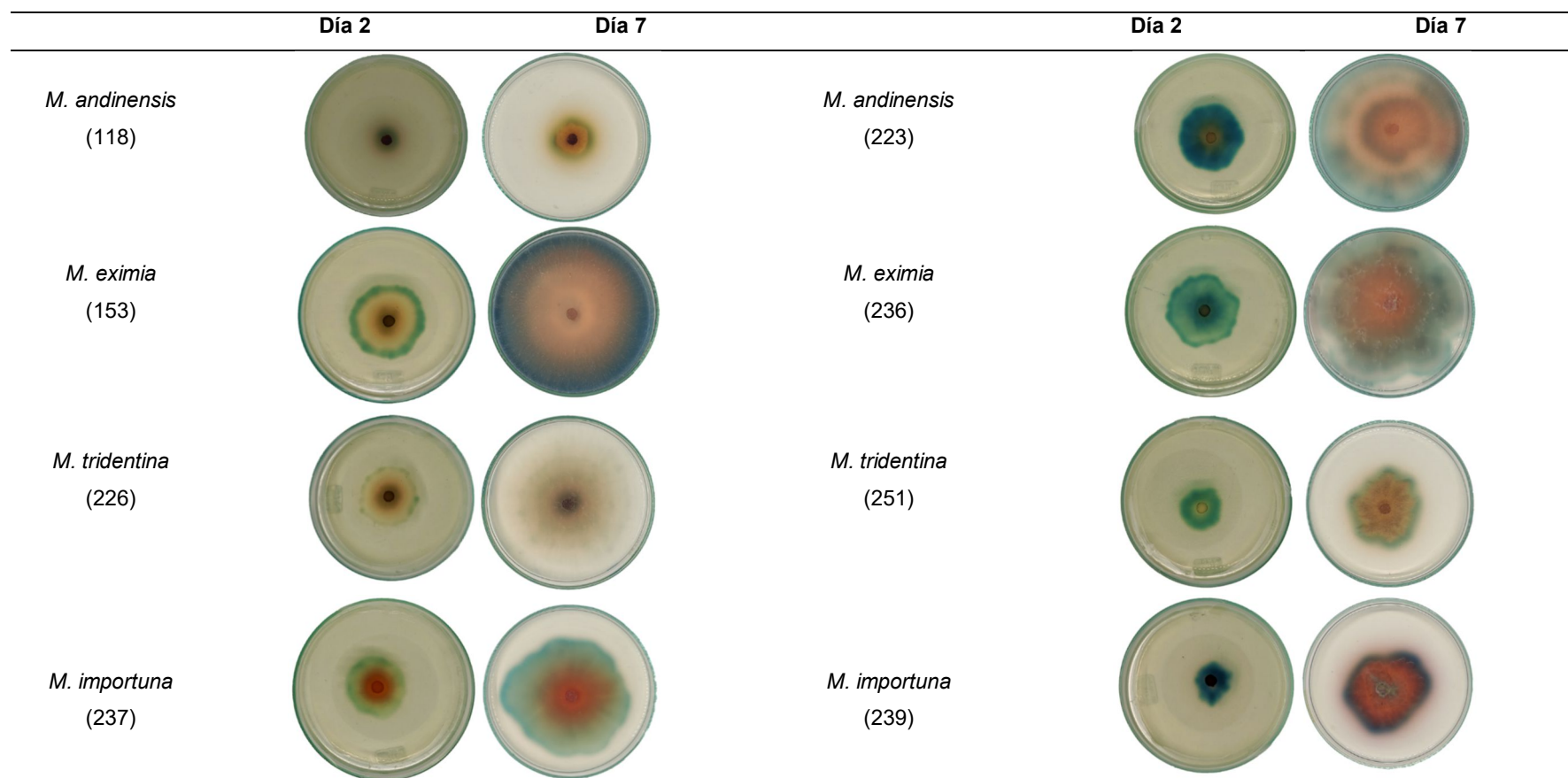


Fig. 7: Detección de actividad de lacasa en cepas de *Morchella* spp. creciendo en medio sólido EMA suplementado con sal de diamonio 2,2'-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) al 0,02%. Actividad de lacasas observada a los 2 días de crecimiento (izquierda) y a los 7 días de crecimiento (derecha).

Tabla 2: Tabla comparativa de la velocidad de crecimiento radial (mm/día) de las cepas/especies de *Morchella* cultivadas en medio base EMA suplementado con distintos sustratos enzimáticos.

	CMC 0,5%	Xilano 0,5%	Almidón 0,2%	Leche 1%	Pectina 0,2%	Tween20 1%	ABTS 0,02%	Especie /Cepa
Velocidad de crecimiento radial (mm/día)	0,24 ± 0,05	3,90 ± 0,07	12,70 ± 1,56	7,53 ± 0,11	8,20 ± 0,28	0,00 ± 0,00	10,15 ± 0,07	<i>M. andinensis</i> (223)
	0,59 ± 0,08	4,43 ± 0,75	1,62 ± 0,11	0,39 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,07	2,32 ± 0,31	<i>M. andinensis</i> (118)
	0,32 ± 0,11	3,59 ± 0,29	13,50 ± 0,14	7,10 ± 0,01	6,73 ± 0,10	0,00 ± 0,00	10,40 ± 0,42	<i>M. eximia</i> (153)
	0,50 ± 0,01	3,32 ± 0,12	13,32 ± 0,48	7,43 ± 1,33	4,50 ± 0,42	4,54 ± 0,06	9,95 ± 0,21	<i>M. eximia</i> (236)
	0,31 ± 0,28	9,46 ± 0,12	12,65 ± 1,06	7,71 ± 0,03	2,99 ± 0,02	3,84 ± 1,19	6,20 ± 0,57	<i>M. importuna</i> (237)
	0,73 ± 0,18	8,98 ± 2,93	6,00 ± 0,71	8,55 ± 0,32	3,34 ± 0,11	4,97 ± 0,07	4,10 ± 0,28	<i>M. importuna</i> (239)
	0,14 ± 0,02	5,26 ± 0,45	11,60 ± 0,57	6,87 ± 0,06	4,40 ± 0,57	0,00 ± 0,00	9,85 ± 0,07	<i>M. tridentina</i> (226)
	0,56 ± 0,03	5,60 ± 0,26	4,40 ± 0,57	3,59 ± 0,72	0,46 ± 0,00	0,22 ± 0,05	3,70 ± 0,85	<i>M. tridentina</i> (251)

7.2 Crecimiento y producción de enzimas extracelulares por especies de *Morchella* en medio de cultivo líquido.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos realizados en medio sólido, se seleccionaron las especies *Morchella eximia* (153), *M. importuna* (239) y *M. andinensis* (223), para determinar el perfil de enzimas extracelulares producidas en medio de cultivo líquido extracto de malta (EM) y caldo papa-dextrosa (PD), con pH ajustado a 6.

Al estudiar los cambios de pH en las especies cultivadas en el medio líquido compuesto por EM, se pudo observar una disminución en el pH inicial de todas las especies luego de 5 días de ensayo, alcanzando valores de 5,1 (*M. importuna*). Los días siguientes ocurrió un aumento del pH en el medio, siendo *M. importuna*, quien alcanzó su mayor valor entre los días 15-20, con un pH de 6,2 (Fig. 8 A). Al igual que en el medio anteriormente descrito, en PD también se vio una disminución del pH inicial en los primeros 5 días de cultivo (Fig. 8 B), presentando posteriormente un aumento, aunque menor que en el medio EM, alcanzando su máximo valor de pH 5,7 (*M. eximia*). A cada grupo muestral se le aplicó test de varianzas para detectar diferencias significativas entre ellas. A partir de esto, fue posible determinar que todas las especies cultivadas tanto en EM como en PD presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas a lo largo del periodo de incubación de las muestras.

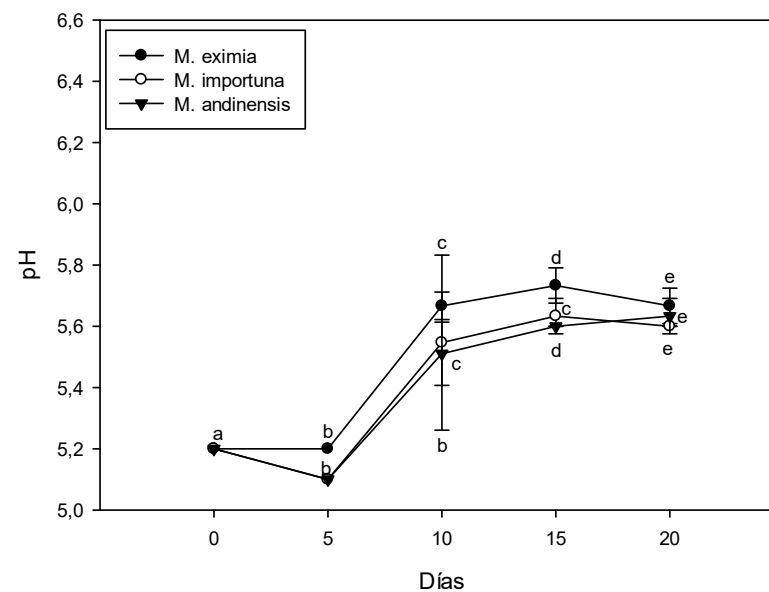
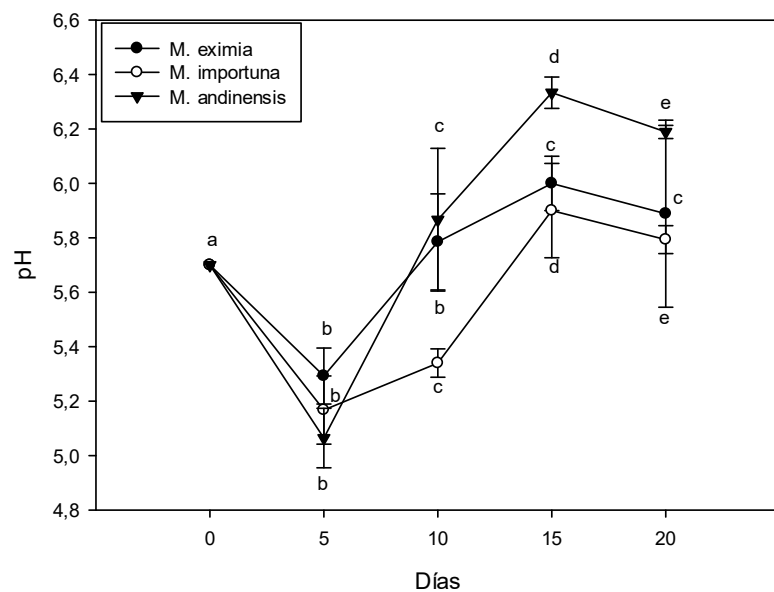


Fig. 8: Variación de pH en los caldos de cultivo de las especies de *Morchella* al crecer en medio líquido extracto de malta (A) y caldo papa-dextrosa (B) durante 20 días, con pH inicial ajustado a 6. Cada punto corresponde al valor promedio de 3 réplicas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a través del test de Tukey.

Una vez finalizado el ensayo se observó un crecimiento micelial muy distinto en las especies cultivadas, tanto en medio EM como en PD (Fig. 9). De manera visual, se pudo apreciar que todas las especies cultivadas en EM desarrollaron micelio aéreo y formaron esclerocios tanto sobre el medio líquido como en las paredes del matraz Erlenmeyer. Mientras que, en PD se observó que el micelio fue de tipo sumergido y no se observó desarrollo de esclerocios (Fig. 9). Se observó un aumento de la biomasa micelial en función del tiempo de incubación en ambos medios para las tres especies, alcanzándose los máximos valores (aprox. 80 mg) entre los 15-20 días en medio EM (Fig. 10 A) y en el día 10 en medio PD (Fig. 10 B). En medio EM se observa una tendencia a un aumento significativo ($p < 0,05$) en la producción de biomasa en función del tiempo de incubación (Fig. 10 A), pero en medio PD el comportamiento fue diferente, observándose una tendencia a una disminución significativa ($p < 0,05$) en la producción de biomasa después de los 10 de incubación, principalmente en *M. eximia* y *M. andinensis* (Fig. 10 B). No se observaron diferencias importantes en la producción de biomasa micelial ni entre las diferentes especies de *Morchella* ni entre los dos medios de cultivo (Fig. 10), alcanzando valores muy similares entre sí a lo largo del periodo de incubación.

En relación con la producción de proteínas solubles extracelulares presentes en los caldos de las especies de *Morchella*, se observó un comportamiento similar en función del tiempo de incubación entre las diferentes especies en medio EM, con una tendencia al aumento en función del tiempo, pero sin diferencias significativas (Fig. 11 A). En medio PD, las tendencias observadas en cuanto a la producción de proteínas extracelulares fueron semejantes, pero se alcanzaron niveles levemente mayores que en EM, principalmente en los caldos de cultivo de *M. andinensis* ($> 0,20 \mu\text{g/mL}$) al día 15 de incubación (Fig. 11).

	Extracto de malta	Caldo de papa dextrosa
<i>M. eximia</i> (153)		
<i>M. importuna</i> (239)		
<i>M. andinensis</i> (223)		

Fig. 9: Crecimiento de *Morchella* spp. en medio líquido extracto de malta (izquierda) y en caldo de papa-dextrosa (derecha) una vez transcurridos 20 días de incubación a 24°C, en condición estática.

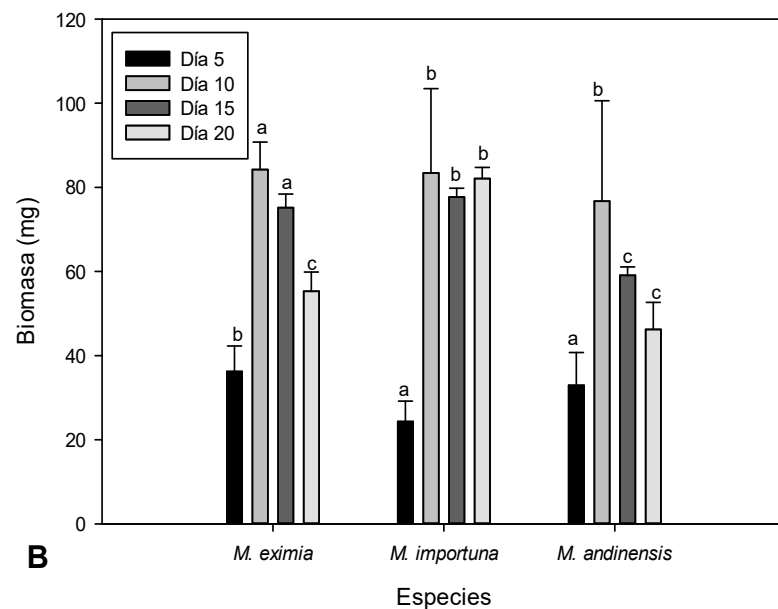
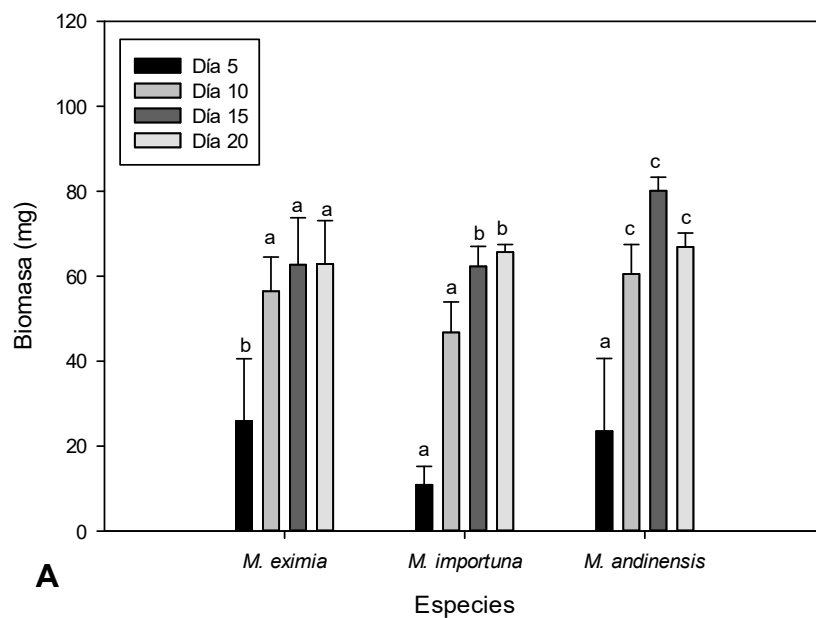


Fig. 10: Biomasa micelial producida por especies de *Morchella* al ser incubadas en medio líquido extracto de malta (A) y caldo de papa-dextrosa (B). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

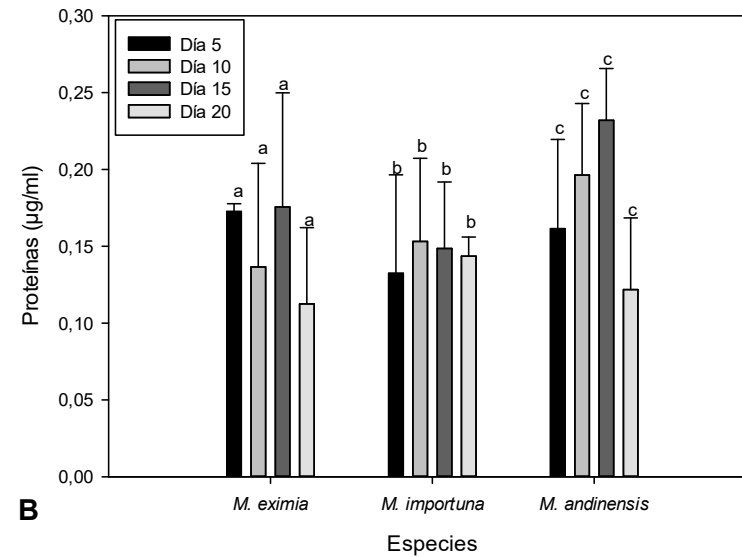
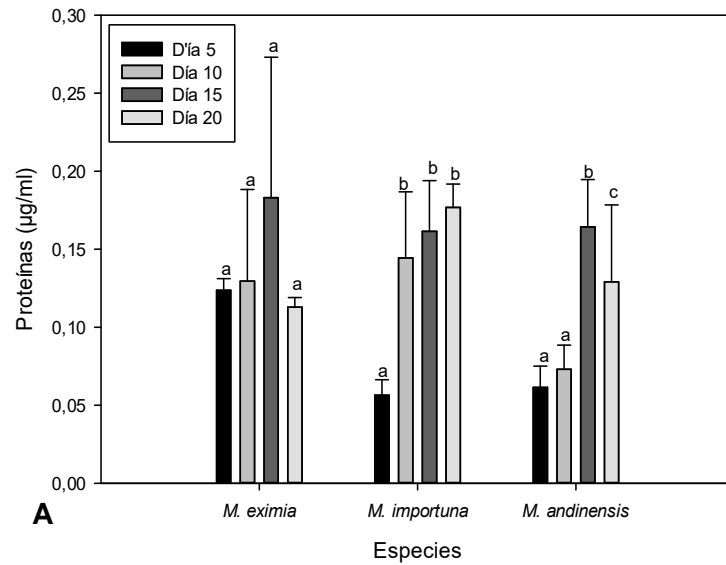


Fig. 11: Contenido de proteínas solubles totales en los caldos de las especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

7.3 Actividades enzimáticas en medio de cultivo líquido

En cuanto a los análisis enzimáticos aplicados a los caldos de las diferentes especies de *Morchella*, fue posible detectar actividades de enzimas hidrolíticas, pero no de enzimas oxidativas del tipo lacasa o peroxidasa.

La enzima endoglucanasa fue detectada en las tres especies de *Morchella*, en ambos medios de cultivo, pero los niveles detectados en medio PD fueron aproximadamente 30 veces mayores que los detectados en medio EM (Fig. 12). En los caldos EM, se pudo observar que ocurrió una disminución significativa ($p < 0,05$) de la actividad enzimática de las tres especies en función del tiempo, presentando sus mayores niveles de actividad entre los días 5-10, principalmente *M. andinensis* que además mostró la mayor actividad de endoglucanasa entre las especies al día 5 (Fig. 12 A). Al mismo tiempo, *M. importuna* fue la única que no presentó actividad enzimática al inicio del tiempo de incubación en EM. Por otro lado, cuando las especies se cultivaron en PD (Fig. 12 B) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) al finalizar el periodo de incubación, principalmente en *M. eximia* y *M. tridentina*, siendo *M. eximia* quien presentó el mayor valor de actividad (30,3 UI) al finalizar el ensayo (20 días) (Fig. 12 B).

Al igual que la actividad de endoglucanasa, los valores de actividad xilanasa en PD de las tres especies de *Morchella* fueron 75 veces mayores que en EM (Fig. 13). Fue posible observar una disminución significativa ($p < 0,05$) de la actividad enzimática a medida que avanzó el tiempo de incubación en todas las especies cultivadas en medio EM, siendo el día 5, el momento en que presentaron la mayor actividad (aprox. 1,9 UI) (Fig. 13 A). Por otro lado, en las especies cultivadas en medio PD se apreció una actividad más o menos constante entre los 5-15 días, con una leve disminución también hacia el final de la incubación (20 días) (Fig. 13 B). Las tres especies no mostraron diferencias entre los niveles máximos de actividad xilanasa, tanto en medio EM como en medio PD.

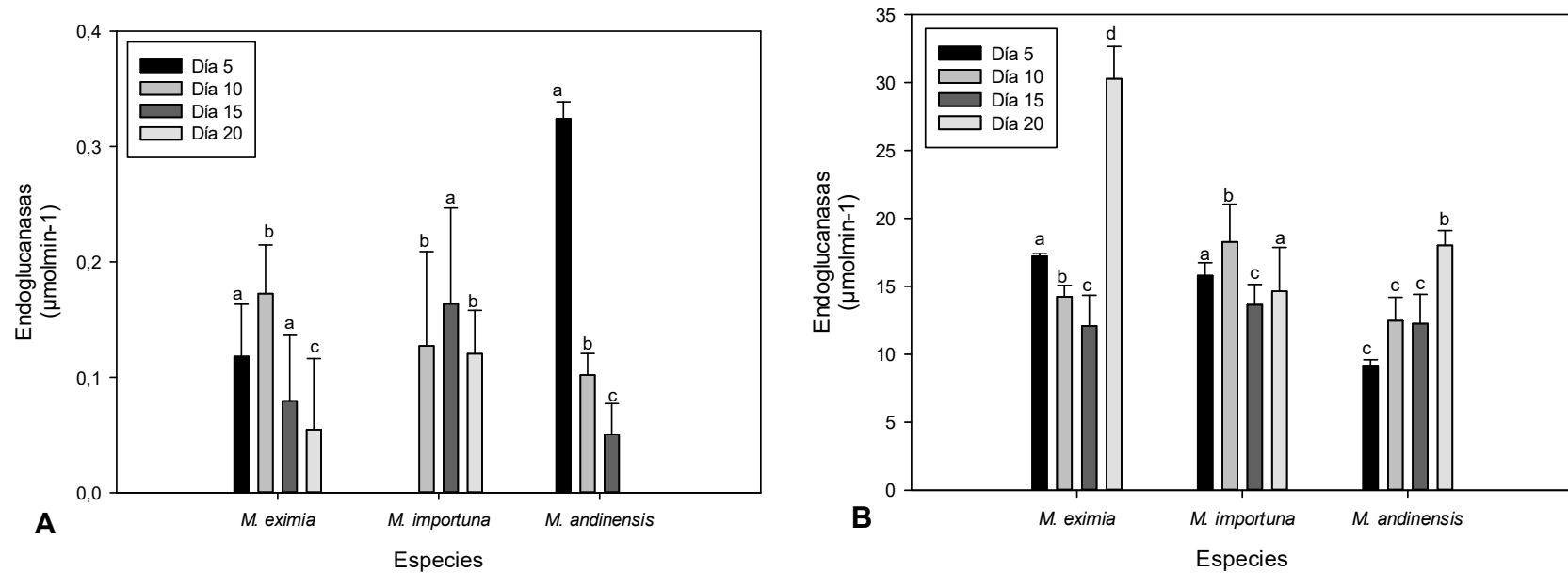


Fig. 12: Actividad de endoglucanasas producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

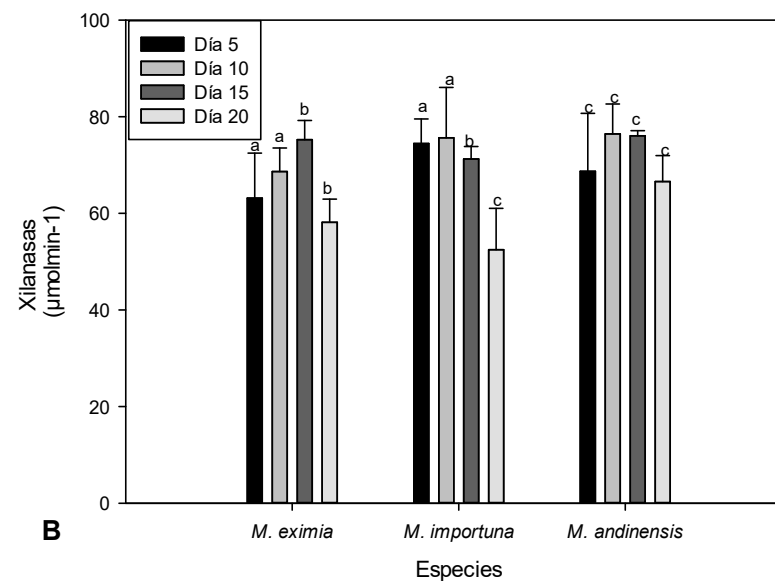
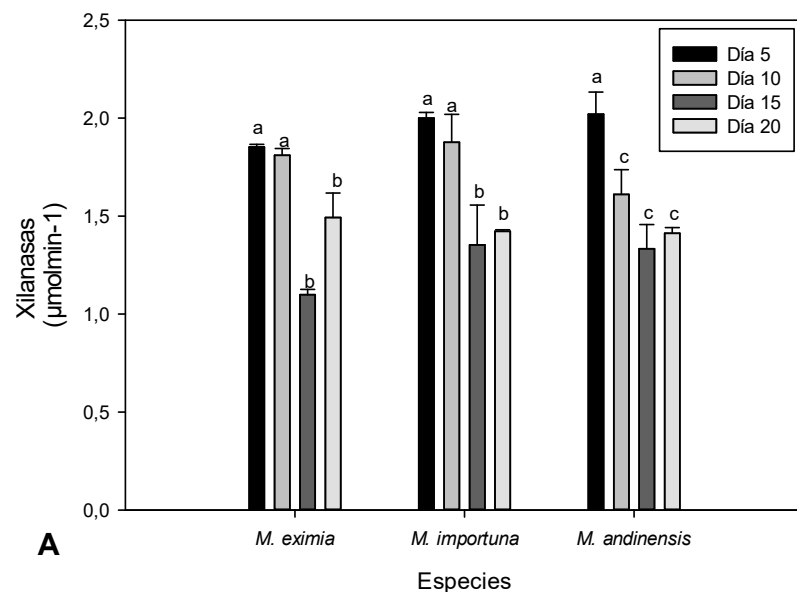


Fig. 13: Actividad de xilanasas producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

Durante la determinación de actividad amilolítica se pudo observar un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad en función del tiempo de incubación en las especies *M. eximia* y *M. importuna* cultivadas en EM, siendo *M. eximia* quien presentó la mayor actividad amilolítica al día 20 de incubación (2,2 UI). Mientras que *M. andinensis* produjo una actividad amilolítica muy reducida en medio EM comparada a las otras especies (Fig. 14 A). Por otro lado, en medio PD todas las especies presentaron una actividad amilolítica aproximadamente 140 veces mayor que en medio EM (Fig. 14 B). En PD los perfiles de actividad amilolítica en función del tiempo fueron diferentes para cada especie, observándose una disminución significativa de actividad en el caso de *M. eximia* y un aumento significativo en el caso de *M. importuna* (Fig. 14 B). En este medio *M. eximia* presentó la máxima actividad (145,3 UI) entre las especies a los 5 días de incubación. En el caso de *M. andinensis*, presentó los menores valores de actividad amilolítica en medio PD y éstos fueron más bien constantes durante el cultivo (Fig. 14 B).

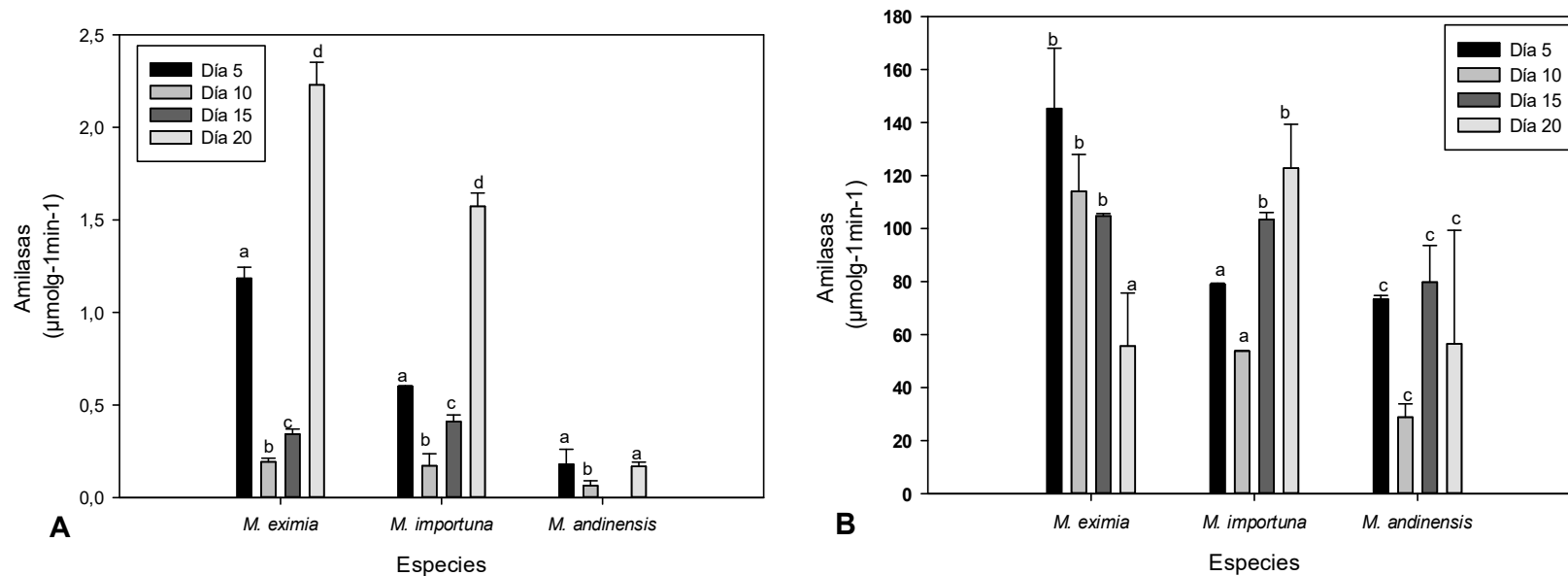


Fig. 14: Actividad de amilasa producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

Durante el análisis de la actividad de fosfatasa ácida en los caldos EM (Fig. 15 A), se pudo observar un perfil de actividad en función del tiempo distinta entre las especies, con aumentos significativos ($p < 0,05$) y una disminución de la actividad hacia el final del cultivo en el caso de *M. eximia* y *M. importuna*, y con valores prácticamente constantes en el tiempo en el caso de *M. andinensis*. Los máximos valores de fosfatasa ácida (aprox. 1,270 UI/L) fueron detectados en los caldos de *M. eximia* y *M. importuna* a los 15 días de incubación (Fig. 15 A). En medio PD se observó también un aumento significativo ($p < 0,05$) en función del tiempo, con una disminución de la actividad en el caso de *M. importuna* y *M. andinensis* hacia el final del cultivo (Fig. 15 B). En medio PD los mayores valores de actividad de fosfatasa ácida fueron detectados en los caldos de *M. andinensis* al día 15 de incubación (Fig. 15 B).

En el caso de las fosfatasas alcalinas, al igual que en el caso de las fosfatasas ácidas, los niveles máximos de actividad alcanzados en medio PD fueron superiores a los detectados en medio EM (Fig. 15). En medio EM función del tiempo de incubación no se observaron diferencias significativas, excepto en los cultivos de *M. importuna* donde se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de actividad hacia el final de la incubación (15-20 días) (Fig. 15 C). Los niveles de actividad fosfatasa alcalina fueron similares a los de fosfatasa ácida, tanto en medio EM como PD (Fig. 15). En medio EM los niveles de fosfatasa alcalina no mostraron diferencias significativas en función del tiempo de incubación, excepto en *M. importuna*, donde se observó un aumento hacia el final del cultivo (Fig. 15 C). En medio PD la actividad de fosfatasa alcalina de *M. eximia* no mostró diferencias significativas en función del tiempo de incubación, a diferencia de *M. importuna* y *M. andinensis* cuya actividad enzimática aumentó significativamente ($p < 0,05$) hacia el final del periodo de incubación (Fig. 15 D).

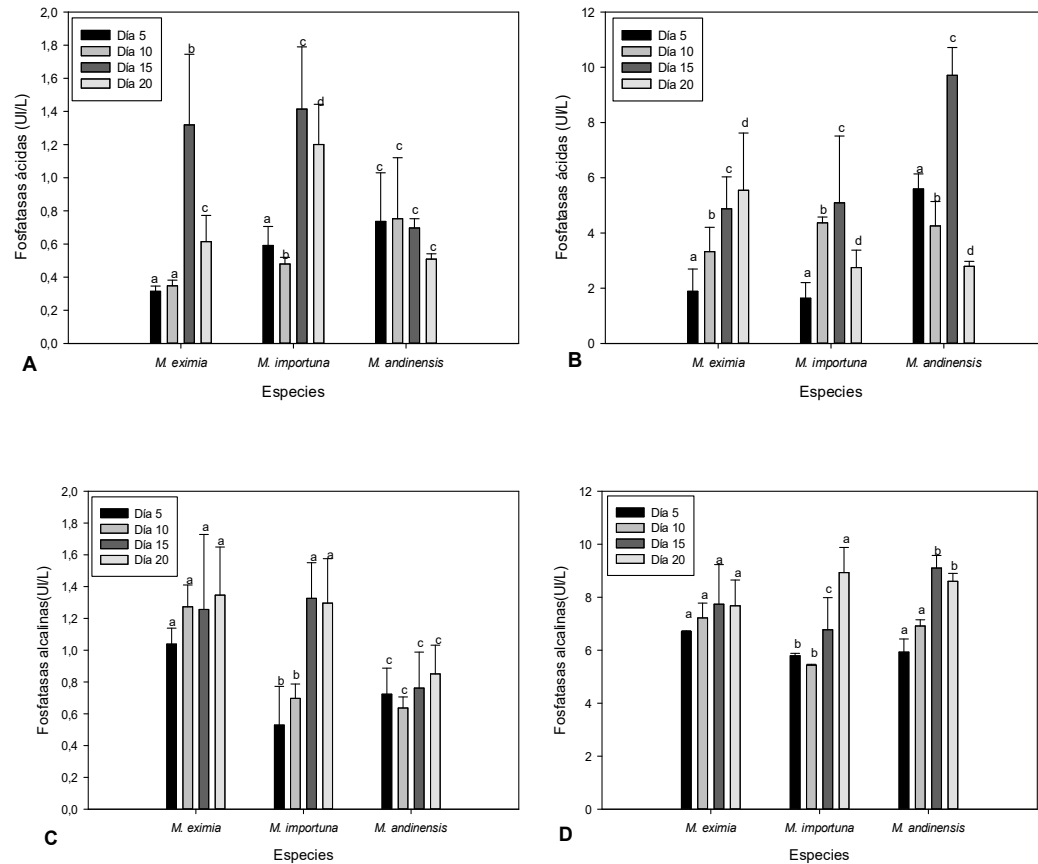


Fig. 15: Actividad de fosfatasa ácida producida por especies de *Morchella* creciendo en medio líquido EM (A) y PD (B) y fosfatasa alcalina en medio EM (C) y PD (D), a 24 °C en condición estática. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes tiempos de incubación para una misma especie a través de Test de Fisher.

7.4 Producción de enzimas extracelulares por especies de *Morchella* en medio semisólido con sustratos lignocelulósicos

Se prepararon tres medios compuestos por sustratos lignocelulósicos (aserrín de roble, granos de trigo, y una mezcla de paja de trigo más afrecho) humedecidos con EM (0,5%), para evaluar la actividad enzimática producida por las especies de *Morchella* y a su vez realizar observaciones del crecimiento micelial y determinar los cambios de pH en el medio.

La colonización y desarrollo del micelio de las especies de *Morchella* en los tres sustratos lignocelulósicos fue evaluado sólo de manera visual, y la mayor cantidad de micelio se pudo estimar en el medio compuesto por granos de trigo, siendo *M. eximia* quien tuvo el mayor crecimiento micelial en este medio, seguido por *M. andinensis* y *M. importuna* (Fig. 16). Cabe destacar, además, que en los medios compuestos de granos de trigo y la mezcla de paja de trigo + afrecho, se observó un micelio aéreo algodonoso (Ver Fig. 16.a, anexo) que cubrió el matraz casi por completo, dejando ver la aparición de esclerocios y pigmentación característica del hongo (Fig. 16).

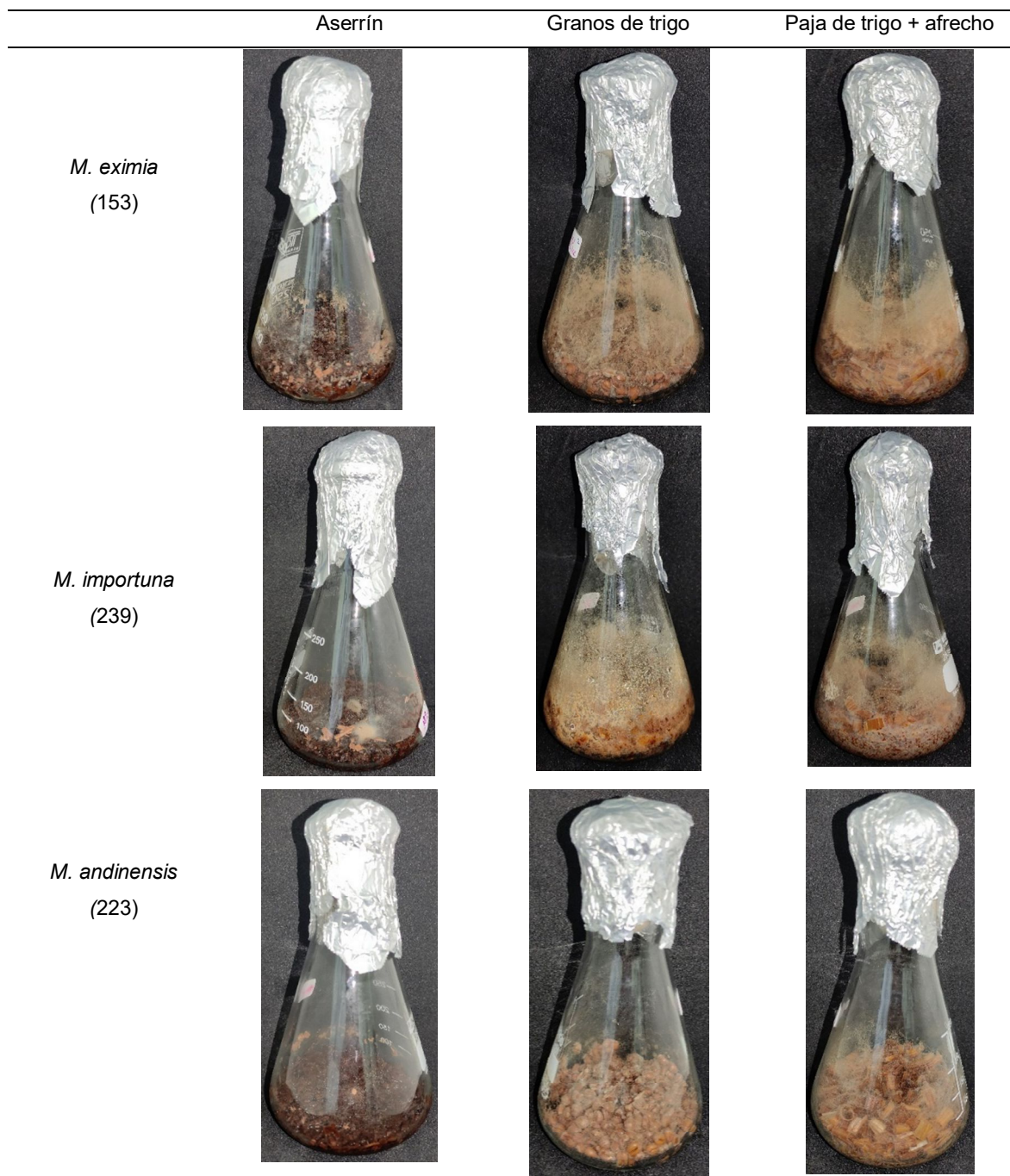


Fig. 16: Crecimiento de *Morchella* spp. en medio semi-sólido con distintos sustratos lignocelulósicos a los 20 días de incubación a 24 °C.

En este estudio, se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo en el desarrollo micelial y pH de varias especies de *Morchella*. Se observó que, en el medio compuesto por aserrín de roble, todas las especies de *Morchella* presentaron un desarrollo micelial empobrecido y ausencia de micelio aéreo o algodonoso. Además, en *M. andinensis* se observó la aparición de estructuras similares a esclerocios sin pigmentación. Una vez medido el pH de los caldos obtenidos a partir de los medios antes mencionados se obtuvo que, en los extractos enzimáticos obtenidos a partir de las especies cultivadas en el medio semisólido compuesto por aserrín de roble, se detectó un valor de pH de 5,1-5,8 en todas las especies, siendo *M. eximia* quien aquí presentó valores mucho mayores (pH 5,8). En los caldos estudiados obtenidos a partir del medio que contenía granos de trigo se observaron valores de pH de 5,9-6,3. En este medio *M. importuna* fue quien presentó los mayores valores (pH 5,9). Por último, en el medio que contenía la mezcla de paja de trigo y afrecho se observaron valores de pH mucho mayores en comparación a los otros medios (pH 7,3-7,7), siendo *M. importuna* quien presentó el valor más alto de pH (pH 7,7) en comparación con *M. importuna* (pH 7,4) y *M. eximia* (pH 7,3). Después de realizar el análisis estadístico, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el medio compuesto por EM y aserrín y el resto de los medios evaluados. En resumen, estos resultados sugieren que el medio de cultivo influye significativamente en el desarrollo micelial y pH de las cepas de *Morchella* lo que puede ser importante para su cultivo y producción en condiciones controladas, debido a que el pH podría influir en la producción de enzimas, lo que puede tener un impacto en la capacidad de las especies de *Morchella* para degradar los componentes del medio y obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento.

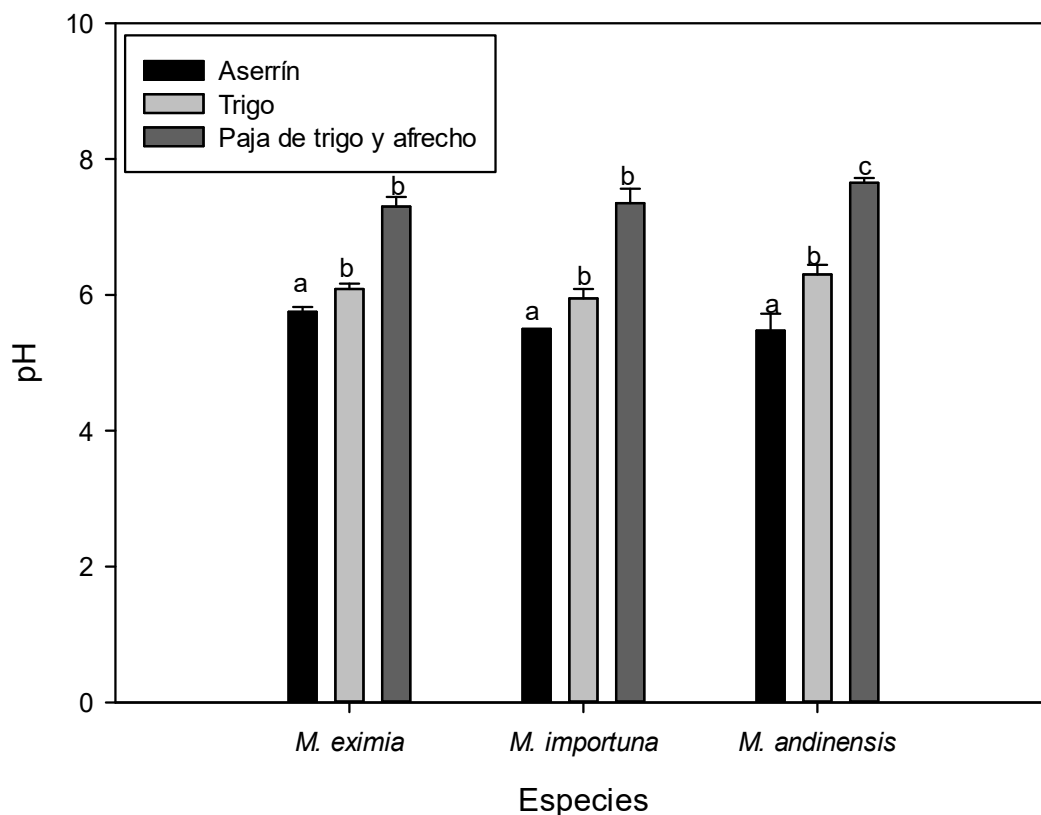


Fig. 17: Determinación de pH en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

En los extractos de los cultivos en grano de trigo y mezcla paja de trigo + afrecho se detectaron altos valores de proteínas soluble (aprox. $0,082 \mu\text{g/mL}$), principalmente en *M. importuna*, valores que fueron significativamente mayores que en aserrín (Fig. 18). En el caso de *M. andinensis* no se observaron diferencias significativas en los valores de proteínas entre los diferentes sustratos, y al mismo tiempo en esta especie se detectaron los mayores niveles de proteínas en aserrín. El contenido de proteínas solubles siguió la tendencia *M. importuna* > *M. andinensis* >> *M. eximia* entre las especies (Fig. 18).

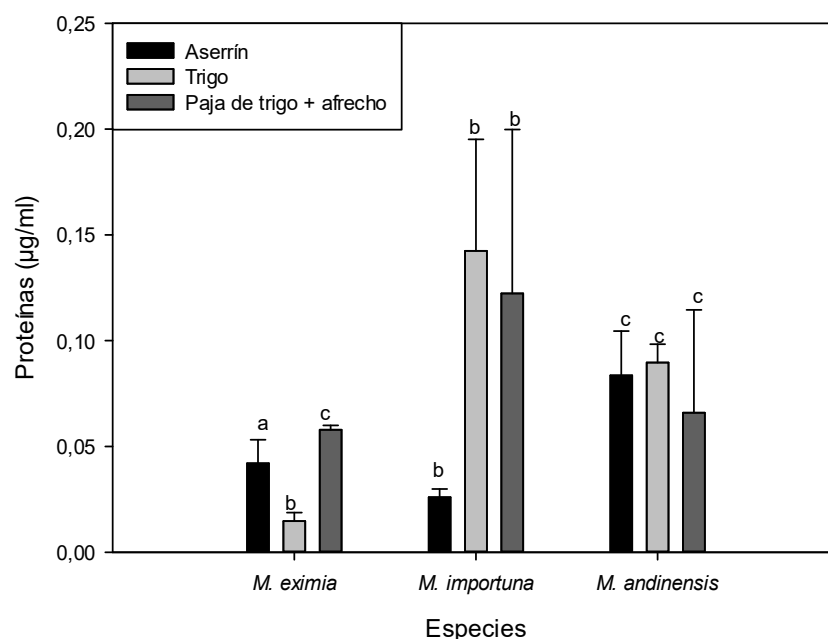


Fig. 18: Contenido de proteínas solubles totales en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

Al analizar la actividad de endoglucanasas en los extractos enzimáticos, altos valores se obtuvieron en los extractos del medio compuesto por aserrín de roble, valores que fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los obtenidos en granos de trigo y mezcla paja de trigo + afrecho, siendo *M. importuna* quien presentó los mayores valores (43,01 UI) (Fig. 19). Mientras que en los otros sustratos se obtuvieron valores similares de endoglucanasa entre las especies. En el caso de *M. eximia* no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la actividad de endoglucanasas en los distintos sustratos. En general, los niveles de actividad siguieron la tendencia *M. importuna* > *M. andinensis* > *M. eximia* (Fig. 19).

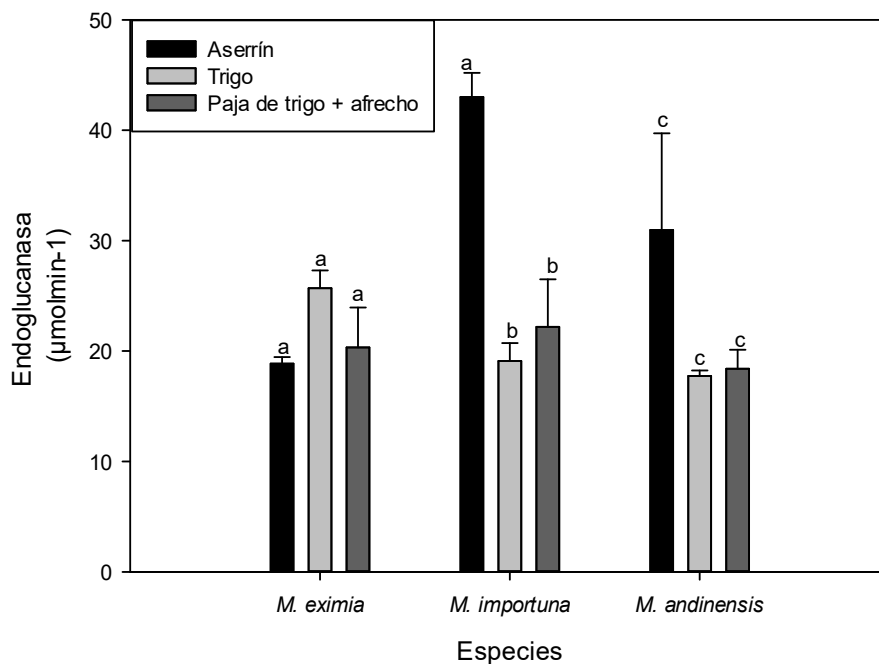


Fig. 19: Actividad de endoglucanasas en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

En cuanto a la actividad de xilanasas, los extractos enzimáticos obtenidos de los medios compuestos por aserrín y la mezcla de paja de trigo + afrecho presentaron los valores más altos de actividad (alrededor de 60,8 UI), valores que fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) a los obtenidos en granos de trigo para las tres especies (Fig. 20). Sin embargo, los niveles de actividad xilanasas alcanzados en los diferentes sustratos fueron similares en las tres especies (Fig. 20).

Respecto a la actividad de amilasa, los niveles alcanzados por las tres especies fueron similares en los diferentes sustratos (Fig. 21). Sin embargo, se obtuvieron resultados distintos en cuanto al tipo de sustrato utilizado, siendo el medio compuesto por la mezcla paja de trigo más afrecho donde se observó la actividad

amilolítica más alta (113,8 UI), con valores que fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los obtenidos en aserrín y granos de trigo (Fig. 21).

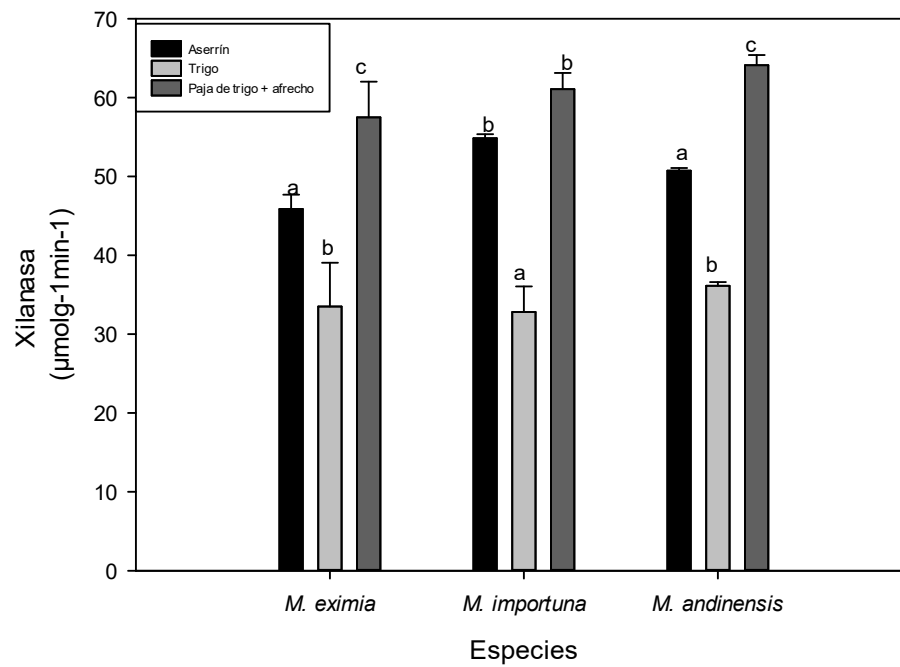


Fig. 20: Actividad de xilanasas en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

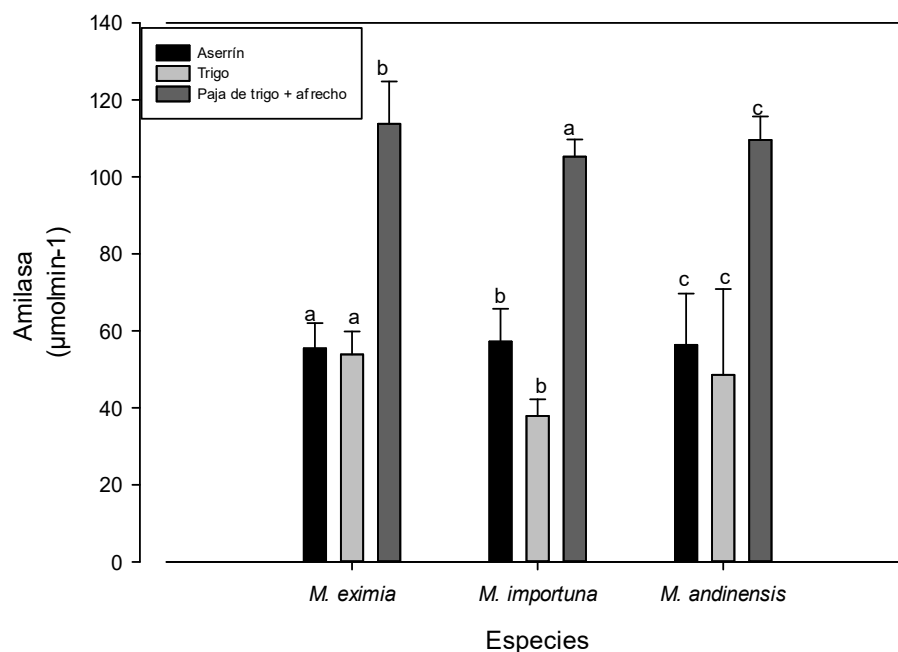


Fig. 21: Actividad de amilasa en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

La actividad de fosfatasas ácidas y alcalinas también fue detectada en los extractos de los cultivos semi-sólidos de las tres especies de *Morchella* (Fig. 22). Sin embargo, los niveles detectados de ambas fosfatasas fueron similares entre las diferentes especies, y no fueron detectadas diferencias significativas entre los diferentes sustratos, por lo menos en el tiempo de incubación analizado (20 días) (Fig. 22).

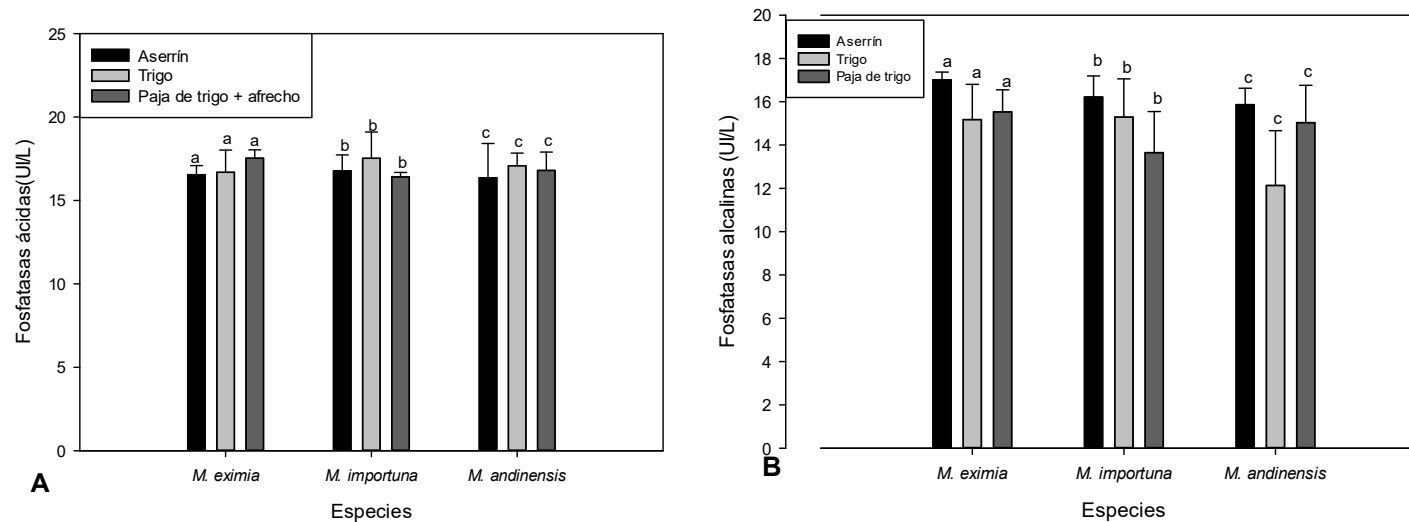


Fig. 22: Actividad de fosfatasa ácida (A) y fosfatasa alcalina (B) en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de sustratos lignocelulósicos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos para una misma especie según test de Fisher.

En los extractos enzimáticos también se evaluó la presencia de las enzimas oxidativas lacasas y peroxidasas, que fueron actividades que sólo fue posible detectar en los cultivos con grano de trigo de las tres especies de *Morchella*, y en mayor proporción en *M. andinensis* (Fig. 23).

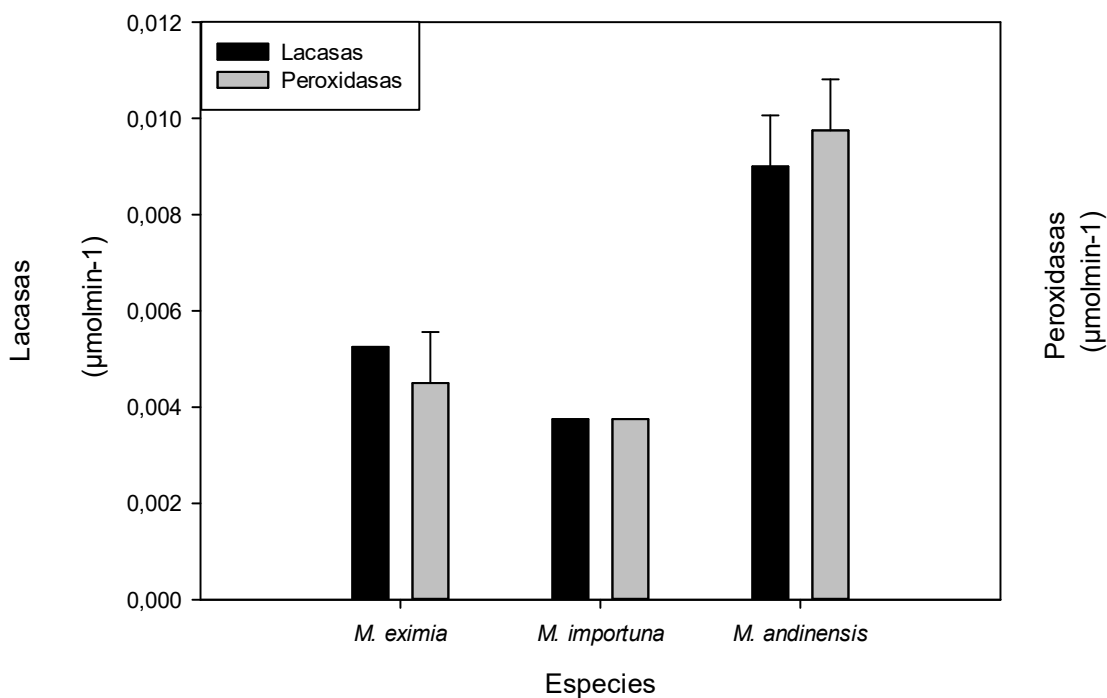


Fig. 23: Actividad de lacasas y peroxidasas en los extractos enzimáticos de las especies de *Morchella* cultivadas en medio semi-sólido en presencia de granos de trigo. Valores de actividad son el promedio de dos réplicas $\pm$ desvío.

8. Discusión

Los hongos poseen la capacidad de secretar una amplia gama de enzimas extracelulares capaces de degradar diversas biomacromoléculas para sus propias necesidades, al ser expuestos a distintos entornos de sustrato tales como celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, entre un gran repertorio de polisacáridos y sustratos lignocelulósicos (Arantes y Goodell 2014; Sista Kameshwar y Qin 2018). Este estudio se enfocó en evaluar en *Morchella* spp. algunas enzimas hidrolíticas relacionadas a la degradación de polisacáridos tales como endoglucanasas que participan en la hidrólisis de celulosa, xilanasas que hidrolizan xilano, pectinasas que hidrolizan pectina y amilasas que hidrolizan almidón, además de proteasas y lipasas, que actúan hidrolizando proteínas y lípidos, respectivamente. Además, se evaluaron enzimas representativas del grupo de las fenoloxidasas que participan en la degradación de lignina, como son las lacasas.

Como ensayo inicial se realizó un *screening* o evaluación preliminar de la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares en 8 cepas de *Morchella* pertenecientes a cuatro especies: *M. andinensis* y *M. tridentina*, provenientes de bosque nativo, y *M. eximia* y *M. importuna*, provenientes de plantaciones forestales. El *screening* se realizó en medio sólido extracto de malta (EMA) suplementado con distintos sustratos para evaluar la actividad enzimática de interés. Se observó que todas las especies/cepas de *Morchella* estudiadas presentaron actividad celulolítica, lo que sugiere que estas especies de hongos pueden descomponer celulosa, un componente importante de la biomasa vegetal. Sin embargo, se observaron diferencias tanto en la intensidad como en el tamaño de los halos de hidrólisis en los distintos aislados, sobre todo en *M. importuna* (239) quien presentó halos de hidrólisis más pequeños en comparación con las otras cepas, lo que sugiere que podría haber variaciones en la producción enzimática entre las diferentes especies/cepas estudiadas. Thakur (2015), realizó evaluaciones cualitativas y cuantitativas de la actividad de enzimas extracelulares incluyendo celulasas, en 7 especies de *Morchella* (*M. angusticeps*, *M. conica*, *M. tibetica*, *M. esculenta*, *M. crassipes*, *M. deliciosa* y *M.*

simlensis), revelando que todas las especies presentaron actividad celulolítica, sugiriendo que la actividad celulolítica es común en el género *Morchella*, aunque podría haber variaciones en la producción entre diferentes cepas. Por otro lado, Tiwari et al. (2006), describen la variabilidad en la producción de enzimas extracelulares en 8 especies de *Morchella*. Este resultado se correlaciona con los resultados observados en el *screening* realizado aquí, en el que se observaron diferencias en la intensidad y tamaño de los halos de hidrólisis de CMC en las distintas cepas del hongo, indicando variaciones en la producción de enzimas hidrolíticas entre las cepas de cada especie estudiada. A pesar de la reacción enzimática positiva observada en el medio se observó una fuerte inhibición en la tasa de crecimiento de todas las cepas. Esto sugiere que la composición del medio, que incluía carboximetilcelulosa (CMC), tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo. Este resultado es consistente con estudios previos, realizados en otras especies fúngicas, que han demostrado que CMC puede inhibir el crecimiento de distintas especies fúngicas (Chen et al. 2016; Oliveira et al. 2019).

En la naturaleza, los hongos y otros microorganismos a menudo producen tanto xilanasas como celulasas simultáneamente, ya que estos dos tipos de enzimas trabajan en conjunto para degradar la lignocelulosa de manera eficiente (Gonzales-Gonzales y Miranda 2022). En algunos casos, la producción de una enzima puede ser inducida por la presencia de la otra (Andlar et al. 2018). Sin embargo, a pesar de lo antes mencionado, no fue posible observar halos de hidrólisis en el medio con xilano en ninguna de las cepas evaluadas, lo que pudo deberse al rápido crecimiento del hongo, el cual cubrió por completo la placa con micelio a los pocos días de inoculado. En contraste, Kamal et al. (2004), observaron la producción de xilanasas por *Morchella* spp. dentro de una amplia gama de enzimas, sugiriendo que el hongo es capaz de degradar sustratos tales como hemicelulosa. Así también, Tiwari et al. (2006) informaron acerca de 7 diferentes enzimas extracelulares para 8 especies de *Morchella*, en donde destacan la producción de xilanasas. Sin embargo, la actividad de la enzima fue variable entre las distintas especies. Por ejemplo, se observó una alta actividad

de xilanasas en *M. importuna*, mientras que en *M. crassipes* y *M. conica* se detectó una actividad relativamente baja. Por otro lado, todas las cepas estudiadas aquí presentaron un rápido crecimiento en el medio de cultivo suplementado con xilano, lo que indica que pueden utilizar el xilano como una fuente de carbono para su crecimiento y producción de esclerocios (Rosales et al. 2018), sugiriendo la producción de xilanasas por *Morchella* spp. que no pudieron ser detectadas a través del ensayo utilizado en el *screening*.

También se evaluó la actividad de amilasas en *Morchella* spp. en medio sólido suplementado con almidón soluble. Las amilasas son enzimas hidrolíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza que catalizan la hidrólisis del almidón y otros polisacáridos relacionados, liberando unidades de glucosa y otros oligosacáridos (Wang et al. 2020). Una vez finalizado el ensayo se pudo confirmar la respuesta positiva al medio en el que se encontraban las especies debido a la aparición de halos transparentes de hidrólisis. Dentro del perfil enzimático estudiado por Thakur (2015) en *Morchella* spp. se reporta la presencia de amilasas en las distintas especies estudiadas, y también la presencia de pectinasas, lipasas y proteasas, planteando que la mayor actividad fue la de proteasas, concluyendo que *Morchella* spp. es capaz de degradar y utilizar distintos sustratos tales como celulosa, almidón, urea, pectina y proteínas eficientemente. El autor plantea la existencia de diferencias interespecíficas respecto a todas las enzimas extracelulares evaluadas. Por otro lado, en el medio de cultivo conteniendo pectina, el crecimiento fue muy distinto tanto entre especies como entre cepas de *Morchella*, siendo *M. andinensis* quien presentó la diferencia más llamativa debido a que la cepa 118 no presentó crecimiento micelial, a diferencia de la cepa 223 que desarrolló un micelio sumergido que abarcó prácticamente por completo la placa. Sin embargo, ambas cepas fueron capaces de producir actividad de pectinasa. La diferencia en cuanto al crecimiento observado entre las cepas o ecotipos estudiados podría deberse a que presentan características fenotípicas diferentes, debido a su adaptación a las distintas condiciones de sus lugares de procedencia (Naranjo-Ortiz y Gabaldón 2019).

Para la evaluación de lipasas, se utilizó medio EMA suplementado con CaCl_2 , NaCl y Tween20, y la reacción positiva se evaluó mediante la aparición de un precipitado blanquecino alrededor de las colonias, producto de la formación de sales de calcio del ácido láurico liberado por las enzimas lipasas. A pesar de que las cepas fueron capaces de producir un tenue precipitado blanco alrededor de las colonias, hubo cepas donde fue difícil visualizar la reacción debido al rápido crecimiento del hongo. La respuesta positiva fue observada en las cepas *M. andinensis* (118 y 223), *M. eximia* (153) y *M. tridentina* (226), lo que sugiere capacidad de hidrolizar lípidos y grasas para liberar ácidos grasos que el hongo podría utilizar como fuente de carbono y energía (Singh y Mukhopadhyay 2012). Lo que podría estar relacionado con la capacidad de *Morchella* para colonizar y obtener nutrientes a partir otros tipos de sustratos orgánicos (Singh y Mukhopadhyay 2012; Alabdall et al. 2021). Krupodorova et al. (2014) y Thakur (2015) estudiaron perfiles enzimáticos producidos por *M. esculenta*, donde la respuesta positiva se manifestó por la aparición de residuos de compuestos saponificados bajo la colonia del hongo, confirmando la capacidad del hongo para producir lipasas.

La producción de proteasas en las distintas especies de *Morchella* se evaluó en medio conteniendo leche descremada al 1%. Inicialmente el medio se veía totalmente opaco por la presencia del sustrato, lo que impedía observar el desarrollo micelial con claridad. Sin embargo, con el paso de los días el hongo comenzó a degradar el sustrato generando zonas o halos claros alrededor de las colonias indicando la reacción positiva (Perwendha et al. 2020). A excepción de *M. andinensis* (118) y *M. tridentina* (251), todas las cepas presentaron actividad proteolítica en el medio. La capacidad de un hongo para producir proteasas y degradar proteínas puede ser una ventaja competitiva que le permite sobrevivir en su hábitat natural (Elhakim et al. 2020). La actividad proteolítica de *Morchella* spp. ha sido confirmada previamente en estudios realizados por Krupodorova et al. (2014), Thakur (2015) y Strapáč et al. (2019), en donde se reporta que la actividad proteolítica varía de acuerdo con el tipo de medio utilizado y el periodo de evaluación, afirmando además que *Morchella* es capaz

de producir enzimas proteolíticas que pueden hidrolizar proteínas y descomponerlas en aminoácidos, lo que puede ayudar al hongo a colonizar nuevos ambientes al permitirle degradar proteínas presentes en fuentes menos comunes o más difíciles de digerir (Yike 2011).

Morchella spp. también fue capaz de producir enzimas lacasas en medio sólido suplementado con ABTS. La reacción ocurre debido a la oxidación del sustrato ABTS por la enzima, produciendo un cambio de color debido a la formación de un radical ABTS•+ altamente coloreado (verde-azulado). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de ABTS oxidado, y, por tanto, refleja la actividad de la lacasa en el medio (Mander et al. 2006; Senthivelan et al. 2019). La reacción fue visible a partir de los primeros días de incubación para todas las especies/cepas de *Morchella*. Sin embargo, con el paso de los días la producción de enzimas lacasas disminuyó, reacción observada debido a la disminución o pérdida de la coloración azul verdosa característica de la respuesta positiva. En *M. tridentina* (251) y *M. andinensis* (118) fue posible observar lo antes descrito, las especies además presentaron un crecimiento mucho menor en comparación al resto. En estudios realizados por Krupodorova et al.(2014) se evaluó el perfil enzimático producido por macrohongos en medio sólido, incluyendo *M. esculenta*, sin embargo aquí se obtuvo respuesta negativa por la cepa, respuesta atribuida al tipo de sustrato utilizado y a las condiciones de cultivo de la especie.

El *screening* inicial sugiere que las especies/cepas de *Morchella* spp. evaluadas son capaces de hidrolizar y crecer sobre una variedad de sustratos como CMC, xilano, almidón, pectina, proteínas, lípidos. Sin embargo, no todas las cepas estudiadas presentaron los mismos resultados en cuanto a su producción enzimática y crecimiento en estos medios, por lo que a partir de lo observado, se puede afirmar que existen diferencias entre las cepas/especies estudiadas, en cuanto a la producción enzimática en los medios evaluados, lo que podría estar relacionado al tipo de entorno natural que pudiera habitar cada cepa evaluada y al tipo de interacciones que pudiesen generarse para poder desarrollarse, tal como afirman algunos autores (Hussain y Sher 2021). Con

base en la actividad enzimática observada en placas (ver tabla 1A, en anexo), se seleccionaron tres especies para cuantificar la producción enzimática de *Morchella* en medio líquido: *M. eximia* (153), *M. importuna* (239) y *M. andinensis* (223).

Para obtener una mayor información en cuanto a la producción de enzimas extracelulares por *Morchella* spp., se realizaron ensayos en dos medios líquidos diferentes: extracto de malta (EM) y caldo de papa dextrosa (PD). La biomasa producida en ambos medios fue muy similar, debido a que ambos contenían los nutrientes que las especies requerían para su desarrollo. Sin embargo, sólo en el medio EM se observó producción de esclerocios. A partir de estos resultados se puede sugerir que los componentes del EM podrían no sólo estimular el crecimiento micelial y la producción de enzimas, sino también proporcionar las condiciones óptimas para la proliferación y/o producción de estructuras del tipo esclerocios de *Morchella* spp. (Winder 2006; Tietel y Masaphy 2018b).

Fue posible detectar actividad de enzimas hidrolíticas, pero no oxidativas en ambos medios de cultivo líquido. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en el ensayo en placas, en medio líquido fue posible detectar y cuantificar la actividad de xilanasas. Los resultados sugieren que el medio de cultivo puede influir significativamente en la producción enzimática de *Morchella* spp., se observó una mayor actividad tanto de endoglucanasas como de xilanasas en las especies cultivadas en medio PD en comparación con EM. El caldo PD es un medio que contiene infusión de papa y D(+)-glucosa, más otros nutrientes, los cuales podrían haber actuado como potenciador de la actividad enzimática en las especies evaluadas (Veerana et al. 2022). Por otro lado, se observó una disminución de la actividad enzimática tanto para endoglucanasas como xilanasas a lo largo del periodo de incubación en el medio EM. He et al. (2019) reportan que cultivar cepas de *Morchella* durante un período prolongado de tiempo produce un envejecimiento del cultivo, el cual tiene un efecto significativo en la producción de enzimas celulasas y xilanasas, causando la disminución o pérdida de la actividad.

Luego de evaluar la actividad amilolítica en medio líquido, se obtuvieron mayores actividades en PD que en EM. Además, se determinó una mayor actividad en *M. eximia* cultivada en EM (día 20), mientras que en PD se observaron valores constantes a lo largo del periodo de cultivo, detectándose la mayor actividad en *M. andinensis*. Las amilasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón en glucosa y otros azúcares simples (Wang et al. 2020), y debido a que el almidón es uno de los principales componentes del caldo de papa, es de esperar que el cultivo de *Morchella* en este medio produzca una mayor cantidad de amilasas. Cai et al. (2021) y Liu et al. (2023) reportaron la presencia de amilasas en distintas especies de *Morchella* en fermentación sumergida utilizando EM y extracto de levadura, lo cual confirma lo observado aquí. Por otro lado, también fue posible detectar fosfatasas ácidas y alcalinas en las tres especies de *Morchella* estudiadas, siendo *M. andinensis* cultivada en caldo PD quien presentó las mayores actividades de ambas fosfatasas, seguida por las especies *M. importuna* y *M. eximia*. La actividad de fosfatasas en *Morchella* puede ser de gran importancia para comprender su fisiología y metabolismo, debido a que esta actividad podría ser utilizada como herramienta para evaluar el estado nutricional del hongo, debido a la poca información que se tiene acerca de su ciclo de vida. Joner y Johansen (2000) afirman que los hongos micorrícicos poseen una mayor actividad de fosfatasas alcalinas, condición que puede estar determinada por la relación simbiótica de estos organismos con su hospedero. En general en la literatura se asocia la capacidad de producir fosfatasas principalmente alcalinas, a especies de hongos micorrícicos, capaces de solubilizar P inorgánico mediante diferentes mecanismos, como la liberación de ácidos orgánicos (Adhikari y Pandey 2019), mecanismos que en *Morchella* han sido sugeridos, pero no se han investigado (Alvarado-Castillo et al. 2014; Kanwal y William 2016).

En este estudio no se detectó actividad de lacasas ni peroxidasas en medio líquido EM o PD. Sin embargo, estudios realizados por Kamal et al. (2004), Kanwal y Reddy (2014) y Masaphy et al. (2022), reportan la producción de peroxidasas, polifenoloxidasas y lacasas en extractos de las especies *M. elata*,

M. angusticeps, *M. conica* y *M. esculenta*, bajo distintas condiciones de cultivo en medio líquido. Lo que demuestra la producción de estas enzimas oxidativas está ampliamente distribuida en el género *Morchella*. Aunque aquí no se detectó actividad oxidativa en medio líquido, sí fue posible detectar lacasas y peroxidasas en medio semisólido compuesto de granos de trigo, sustrato rico en proteínas, lípidos, minerales e hidratos de carbono (Šramková et al. 2009), siendo *M. andinensis* quien presentó las mayores actividades. Se obtuvieron resultados similares a los aquí observados en estudios realizados por Kanwal y Reddy (2014), en donde los autores reportan una actividad máxima de lacasas en *M. crassipes* creciendo en medio semisólido compuesto por granos de trigo y una máxima actividad de peroxidasas dependientes de manganeso y lignina peroxidasas, creciendo en paja de arroz.

Cai et al. (2021), estudió el secretoma producido por *M. conica*, *M. esculenta* y *M. elata* al ser cultivadas en medio semisólido suplementado con los mismos sustratos aquí estudiados y en paja de arroz, siendo posible detectar la producción de amilasas, endocelulasas, xilanasas, lacasas, exocelulasas y β -glucosidasas. Por otro lado, Kapoor et al. (2016) reportan que el afrecho es rico en hidratos de carbono, almidón y proteínas. Mientras que la paja de trigo se compone principalmente de celulosa, hemicelulosas, lignina y un contenido menor de cenizas y proteína (Álvarez et al. 2021), el cual sería según Cai et al. (2021) un medio óptimo para la producción tanto de celulasas, xilanasas y amilasas como de lacasas. Sin embargo, no fue posible observar una respuesta positiva para las enzimas oxidativas en este medio en ninguna de las especies estudiadas. Aun cuando no fue posible detectar enzimas oxidativas del tipo lacasa en medio líquido EM y PD, y en medio semi-sólido en presencia de aserrín y de la mezcla de paja de trigo más afrecho, sí fue posible detectar estas actividades inicialmente en el screening, en medio EMA, donde todas las cepas de *Morchella* mostraron actividad. La falta de actividad en los medios líquidos y semi-sólidos podría estar relacionada a un problema de almacenamiento de los extractos enzimáticos, por lo que pudieran haber perdido la actividad.

9. Conclusiones

- A través de ensayos cualitativos en placa fue posible demostrar la producción de diferentes enzimas extracelulares hidrolíticas que degradan polisacáridos, proteínas y lípidos, y enzimas oxidativas, en las diferentes especies/cepas de *Morchella*.
- Fue posible observar diferencias interespecíficas en las reacciones enzimáticas, pero también intraespecíficas, siendo *M. eximia* (cepa 153), *M. importuna* (cepa 239) y *M. andinensis* (cepa 223) las que presentaron mayor actividad en la mayoría de los ensayos evaluados.
- En medio de cultivo líquido, *Morchella* spp. demostró producir una amplia gama de enzimas hidrolíticas, y el caldo de papa- dextrosa pareció favorecer la producción enzimática, siendo las mayores actividades de endoglucanasas y amilasas detectadas en *M. eximia*, y de fosfatasas en *M. andinensis* y *M. importuna*. Mientras que la producción de xilanasas fue similar en todas las especies.
- En los medios semisólidos utilizando sustratos lignocelulósicos, el crecimiento micelial de *Morchella* spp. fue favorecido en presencia de granos de trigo donde también se observó la producción de esclerocios en todas las cepas.
- La mayor actividad de endoglucanasas fue producida por *M. importuna* en aserrín, mientras que la actividad de amilasa y xilanasas fue similar entre las especies, pero significativamente diferente entre los sustratos, siendo la mezcla paja de trigo más afrecho donde se observaron las máximas actividades.
- La actividad de lacasas y peroxidasas, que no fue posible de determinar en medio líquido, fue detectada en medio suplementado con granos de trigo y siguió la tendencia *M. andinensis* >> *M. eximia* > *M. importuna*.

- Las especies de *Morchella* provenientes de bosque nativo (*M. andinensis* y *M. tridentina*) y de plantaciones forestales (*M. eximia* y *M. importuna*) mostraron similar capacidad de producir una amplia variedad de enzimas hidrolíticas y oxidativas, comprobándose a través del perfil enzimático la capacidad de *Morchella* de degradar los principales componentes de la biomasa vegetal.

10. Bibliografía

- Adhikari P, Pandey A (2019) Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. *Rhizosphere* 9:2–9.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.002>
- Agrawal PK, Rajput K, Chanyal S (2016) Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree-*Cupressus torulosa* D. Don. *World J Pharm Pharm Sci* 5:1034–1054.
<https://doi.org/10.20959/wjpps20167-7137>
- Ajmal M, Akram A, Ara A, Akhund S, Gagosh Nayyar B (2015) *Morchella* *Esculenta*: An edible and health beneficial mushroom. *Pakistan J Food Sci* 25:71–78
- Alabdalall AH, Al-Anazi NA, Aldakheel LA, Amer FHI, Aldakheel FA, Ababutain IM, Alghamdi AI, Al-Khalidi EM (2021) Application and characterization of crude fungal lipases used to degrade fat and oil wastes. *Sci Rep* 11:1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98927-4>
- Ali S, Imran A, Fiaz M, Khalid AN, Khan SM (2021) Molecular identification of True Morels (*Morchella* spp.) from the Hindu Kush temperate forests leads to three new records from Pakistan. *Gene Reports* 23:101125.
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101125>
- Alvarado-Castillo G, Mata G, Pérez-Vázquez A, Martínez-Carrera D, Tablada MEN, Gallardo-López F, Osorio-Acosta F (2011) *Morchella sclerotia* production through grain supplementation. *Interciencia* 36:768–773
- Alvarado-Castillo G, Mata G, Sangabriel-Conde W (2014) Understanding the life cycle of morels (*Morchella* spp.). *Rev Mex Micol* 40:47–50
- Álvarez C, Mullen AM, Pojić M, Hadnađev TD, Papageorgiou M (2021) Classification and target compounds. *Food Waste Recover Process Technol Ind Tech Appl* 21–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820563-1.00024-X>

- Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng Life Sci* 18:768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Arantes V, Goodell B (2014) Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: A review. *ACS Symp Ser* 1158:3–21. <https://doi.org/10.1021/bk-2014-1158.ch001>
- Baynes M, Newcombe G, Dixon L, Castlebury L, O'Donnell K (2012) A novel plant-fungal mutualism associated with fire. *Fungal Biol* 116:133–144. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.10.008>
- Bennett JW (1998) Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology. *J Biotechnol* 66:101–107. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00133-3)
- Bourbonnais R, Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett* 267:99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-w)
- Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cai Y, Gong Y, Liu W, Hu Y, Chen L, Yan L, Zhou Y, Bian Y (2017) Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by *Lentinula edodes* grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. *J Proteomics* 163:92–101. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.023>
- Cai YL, Ma XL, Zhang QQ, Yu FQ, Zhao Q, Huang W, Song JX, Liu W (2021) Physiological Characteristics and Comparative Secretome Analysis of *Morchella importuna* Grown on Glucose, Rice Straw, Sawdust, Wheat Grain, and MIX Substrates. *Front Microbiol* 12:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636344>

- Chen CY, Zheng JP, Wan CP, Chen M, Chen JY (2016) Effect of carboxymethyl cellulose coating enriched with clove oil on postharvest quality of “Xinyu” Mandarin oranges. *Fruits* 71:319–327. <https://doi.org/10.1051/fruits/2016019>
- Clowez P, Alvarado P, Becerra M, Bilbao T (2014) *MORCHELLA FLUVIALIS* sp. nov (ASCOMYCOTA, PEZIZALES): A NEW BUT WIDESPREAD MOREL IN SPAIN. *Bol Soc Micol Madrid* 38:23–32
- Du X-H, Yang ZL (2021) Mating Systems in True Morels (*Morchella*) . *Microbiol Mol Biol Rev* 85. <https://doi.org/10.1128/membr.00220-20>
- Du XH, Zhao Q, Yang ZL (2015) A review on research advances, issues, and perspectives of morels. *Mycology* 6:78–85. <https://doi.org/10.1080/21501203.2015.1016561>
- Elhakim E, Mohamed O, Elazouni I (2020) Virulence and proteolytic activity of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Egypt J Biol Pest Control* 30:4–11. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00227-y>
- Eliuz E, Goksen G (2017) Morel Culture Study Part I: *Morchella* sp. mycelial growth and nutrient-primed mycelia. *J Appl Biol Biotechnol* 5:066–069. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50111>
- Gonzales-Gonzales M del R, Miranda R (2022) Cellulases, hemicellulases and ligninolytic enzymes: mechanism of action, optimal processing conditions and obtaining value-added compounds in plant matrices. *MOJ Food Process Technol* 10:30–37. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2022.10.00270>
- Güler P (2000) Cultural Characteristics of *Morchella esculenta* Mycelium on Some Nutrients. *Turkish J Biol* 24:783–794
- Guler P, Ozkaya EG (2009) Morphological development of *Morchella conica* mycelium on different agar media. *J Environ Biol* 30:601–604

- Guzmán G, Tapia F (1998) The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis*. *Mycologia* 90:705–714. <https://doi.org/10.2307/3761230>
- He P, Yu M, Cai Y, Liu W, Wang W, Wang S, Li J (2019) Effect of aging on culture and cultivation of the culinary-medicinal mushrooms *morchella importuna* and *M. Sextelata* (ascomycetes). *Int J Med Mushrooms* 21:1089–1098. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019032891>
- He S, Zhao K, Ma L, Yang J, Chang Y (2018) Effects of different cultivation material formulas on the growth and quality of *Morchella* spp. *Saudi J Biol Sci* 25:719–723. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.021>
- Hussain S, Sher H (2021) Ecological characterization of Morel (*Morchella* spp.) habitats: A multivariate comparison from three forest types of district Swat, Pakistan. *Acta Ecol Sin* 41:1–9. <https://doi.org/10.1016/J.CHNAES.2020.10.007>
- Joner EJ, Johansen A (2000) Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 104:81–86. <https://doi.org/10.1017/S0953756299001240>
- Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ (2011) Enzyme production by filamentous fungi: Analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microb Cell Fact* 10:1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>
- Kamal S, Singh SK, Tiwari M (2004) Role of enzymes in initiating sexual cycle in different species of *Morchella*. 57:18–23
- Kanwal HK, Reddy MS (2014) Influence of sclerotia formation on ligninolytic enzyme production in *Morchella crassipes*. *J Basic Microbiol* 54:1–7. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200802>
- Kanwal N, William K (2016) In Vitro Propagation of *Morchella esculenta* and Study of its Life Cycle. *J Bioresour Manag* 3. <https://doi.org/10.35691/jbm.6102.0044>

- Khoirunnisa SA, Oetari A, Sjamsuridzal W (2020) Carboxymethyl cellulose (CMC)-degrading ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at various temperatures. *AIP Conf Proc* 2242:1–7. <https://doi.org/10.1063/5.0007875>
- Krupodorova T, Ivanova T, Barshteyn V (2014) SCREENING OF EXTRACELLULAR ENZYMATIC ACTIVITY OF MACROFUNGI. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 3:315–318
- Liu Q, Ma H, Zhang Y, Dong C (2018) Artificial cultivation of true morels: current state, issues and perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 38:259–271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1333082>
- Liu W, He P, Zhang J, Wu L, Er L, Shi X, Gu Z, Yu F, Pérez-Moreno J (2023) Ultrastructure and Physiological Characterization of *Morchella* Mitospores and Their Relevance in the Understanding of the Morel Life Cycle. *Microorganisms* 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020345>
- Loizides M (2017) Morels: the story so far. *F Mycol* 18:42–53. <https://doi.org/10.1016/j.fldmyc.2017.04.004>
- Loizides M, Alvarado P, Moreau PA, Assyov B, Halasů V, Stadler M, Rinaldi A, Marques G, Zervakis GI, Borovička J, Van Vooren N, Grebenc T, Richard F, Taşkin H, Gube M, Sammut C, Agnello C, Baroni TJ, Crous P, Fryssouli V, Gonou Z, Guidori U, Gulden G, Hansen K, Kristiansen R, Læssøe T, Mateos J, Miller A, Moreno G, Perić B, Polemis E, Salom JC, Siquier JL, Snabl M, Weholt Ø, Bellanger JM (2022) Has taxonomic vandalism gone too far? A case study, the rise of the pay-to-publish model and the pitfalls of *Morchella* systematics
- Lübeck M, Lübeck PS (2022) Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>

- Machuca A, Gerding M, Chávez D, Palfner G, Oyarzúa P, Guillén Y, Córdova C (2021) Two new species of *Morchella* from *Nothofagus* forests in Northwestern Patagonia (Chile). *Mycol Prog* 20:781–795. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01703-x>
- Mander GJ, Wang H, Bodie E, Wagner J, Vienken K, Vinuesa C, Foster C, Leeder AC, Allen G, Hamill V, Janssen GG, Dunn-Coleman N, Karos M, Lemaire HG, Subkowski T, Bollschweiler C, Turner G, Nüsslein B, Fischer R (2006) Use of laccase as a novel, versatile reporter system in filamentous fungi. *Appl Environ Microbiol* 72:5020–5026. <https://doi.org/10.1128/AEM.00060-06>
- Masaphy S (2010) Biotechnology of morel mushrooms: Successful fruiting body formation and development in a soilless system. *Biotechnol Lett* 32:1523–1527. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0328-3>
- Masaphy S, Vanti GL, Zabari L (2022) Laccase enhancement and antifungal toxicity reduction: Bidirectional influences between Pomegranate peel extract and *Morchella conica* mycelium activity. *Bioresour Technol Reports* 17:100936. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100936>
- Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- More SS, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM (2011) Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Res* 2011:1–8. <https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T (2019) Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biol Rev* 94:1443–1476. <https://doi.org/10.1111/brv.12510>
- O'Donnell K, Rooney AP, Mills GL, Kuo M, Weber NS, Rehner SA (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. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.006>

- Oliveira J, Gloria EM, Parisi MCM, Baggio JS, Silva PPM, Ambrosio CMS, Spoto MHF (2019) Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against *Colletotrichum acutatum* in strawberries. *Sci Hortic (Amsterdam)* 243:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.032>
- Ortiz GE, Ponce-Mora MC, Nosedá DG, Cazabat G, Saravalli C, López MC, Gil GP, Blasco M, Albertó EO (2017) Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44:197–211. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>
- Ower (1982) Notes on the Development of the Morel Ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74:142. <https://doi.org/10.2307/3792639>
- Ower RD, Mills GL, Malachowski H (1986) Cultivation of *morchella*
- Papinutti L, Lechner B (2008) Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1715–1721. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0464-0>
- Perwendha R, Oetari A, Sjamsuridzal W (2020) Skimmed Milk-Degrading Ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at Various Temperatures. *AIP Conf Proc* 2242. <https://doi.org/10.1063/5.0007874>
- Phanpadith P, Yu Z, Yu D, Phongsavath S, Shen K, Zheng W, Phommakoun B (2020) Promotion of maize growth by a yellow morel, *Morchella crassipes*. *Symbiosis* 80:33–41. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00651-1>
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE (2007) Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America. *USDA For Serv - Gen Tech Rep PNW-GTR* 1–165. <https://doi.org/10.2737/PNW-GTR-710>

- Reddy MS, Kanwal HK (2022) Influence of carbon, nitrogen sources, inducers, and substrates on lignocellulolytic enzyme activities of *Morchella spongiosa*. *J Agric Food Res* 7:100271. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100271>
- Richard F, Bellanger JM, Clowez P, Hansen K, O'Donnell K, Urban A, Sauve M, Courtecuisse R, Moreau PA (2015) True morels (*Morchella*, Pezizales) of Europe and North America: Evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy. *Mycologia* 107:359–382. <https://doi.org/10.3852/14-166>
- Rosales E, Pazos M, Ángeles Sanromán M (2018) Solid-State Fermentation for Food Applications
- Sakthi SS, Kanchana D, Saranraj P, Usharani G (2012) Evaluation of Amylase Activity of the amylolytic fungi *Aspergillus niger* using Cassava as substrate. 24–34
- Sambyal K, Singh RV (2021) A comprehensive review on *Morchella importuna*: cultivation aspects, phytochemistry, and other significant applications. *Folia Microbiol (Praha)* 66:147–157. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00849-7>
- Sanz-Rocha M, Gerding M, Quezada T, Vargas M, Chávez D, Machuca Á (2023) Molecular and cultural characterization of *Morchella* spp. from disturbed environments of central-southern Chile. *Fungal Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.01.009>
- Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda RC, Narayani T (2019) Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnol Reports* 23:e00344. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00344>
- Singh AK, Mukhopadhyay M (2012) Overview of fungal lipase: A review. *Appl Biochem Biotechnol* 166:486–520. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>

- Sista Kameshwar AK, Qin W (2018) Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology* 9:93–105. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1419296>
- Sopalun K, lamtham S (2020) Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. *South African J Bot* 134:273–279. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.005>
- Šramková Z, Gregová E, Šturdík E (2009) Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chim Slovaca* 2:115–138
- Strapáč I, Bedlovičová Z, Baranová M (2019) Proteolytic Activity of Edible Spruce *Morchella esculenta* . *Folia Vet* 63:60–64. <https://doi.org/10.2478/fv-2019-0020>
- Sunitha VH, Devi DN, Srinivas C (2013) Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. 9:1–9. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148>
- Tan H, Yu Y, Tang J, Liu T, Miao R, Huang Z, Martin FM, Peng W (2021) Build Your Own Mushroom Soil: Microbiota Succession and Nutritional Accumulation in Semi-Synthetic Substratum Drive the Fructification of a Soil-Saprotrophic Morel. *Front Microbiol* 12:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656656>
- Tanaka T, Shimomura Y, Himejima M, Taniguchi M, Oi S (1986) Characterization of xylan-utilizing anaerobes from mesophilic and thermophilic methane sludge and their xylan degrading enzymes. *Agric Biol Chem* 50:2185–2192. <https://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867742>
- Taşkın H, Hüseyin Doğan H, Büyükalaca S (2015) *Morchella galilaea*, an autumn species from Turkey. *Mycotaxon* 215–221
- Thakur M (2015) Qualitative and Quantitative Screening of Vegetative Mycelium of *Morchella* Species for the Activity of Extracellular Enzymes in North West Himalayas. *Int J Curr Res Biosci Plant Biol* 2:88–93

- Tietel Z, Masaphy S (2018a) True morels (*Morchella*)—nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1888–1901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1285269>
- Tietel Z, Masaphy S (2018b) True morels (*Morchella*)—nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58:1888–1901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1285269>
- Tiwari M, Kamal S, Singh S (2006) Extracellular enzymatic polymorphism in *Morchella* and related species
- Vanti GL, Leshem Y, Masaphy S (2021) Resistance response enhancement and reduction of *Botrytis cinerea* infection in strawberry fruit by *Morchella conica* mycelial extract. *Postharvest Biol Technol* 175:111470. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111470>
- Veerana M, Yu N-N, Bae S-J, Kim I, Kim E-S, Ketya W, Lee H-Y, Kim N-Y, Park G (2022) Enhancement of Fungal Enzyme Production by Radio-Frequency Electromagnetic Fields. *J Fungi* 8:1187. <https://doi.org/10.3390/jof8111187>
- Vignale MV, Sodr  Mendez Barros F, Grassi EM (2022) Nuevo registro de *Morchella esculenta* (Ascomycota, Pezizales) para la selva paranaense. *Lilloa* 59:81–93. <https://doi.org/10.30550/j.lil/2022.59.1/2022.05.09>
- Volk TJ, Leonard TJ (1990) Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycol Res* 94:399–406. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80365-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80365-1)
- Volk TJ, Leonard TJ (1989) Experimental Studies on the Morel. I. Heterokaryon Formation Between Monoascosporous Strains of *Morchella*. *Mycologia* 81:523–531. <https://doi.org/10.1080/00275514.1989.12025783>
- Wang BT, Hu S, Yu XY, Jin L, Zhu YJ, Jin FJ (2020) Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in *Fungi*. *Polymers (Basel)* 12:1–17. <https://doi.org/10.3390/polym12030530>
- Winder RS (2006) Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycol Res* 110:612–623. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.02.003>

- Wu H, Chen J, Li J, Liu Y, Park HJ, Yang L (2021) Recent Advances on Bioactive Ingredients of *Morchella esculenta*. *Appl Biochem Biotechnol* 193:4197–4213. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03670-1>
- Yike I (2011) Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. *Mycopathologia* 171:299–323. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9386-2>
- Zhang GP, Zhang F, Ru WM, Han JR (2010) Solid-state fermentation of cornmeal with the ascomycete *Morchella esculenta* for degrading starch and upgrading nutritional value. *World J Microbiol Biotechnol* 26:15–20. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0135-y>

11. Anexo

Tabla 1.A: intensidad de reacción de especies/ecotipos de *Morchella spp* cultivado en medio sólido de extracto de malta suplementado con distintos sustratos en donde: *: intensidad alta; **: media; *: baja; - : nula.**

	ABTS 0,02%	Tween20 1%	Almidón 0,2%	pectina 0,2%	CMC 0,5%	xilana 0,5%	Leche 1%
<i>M. andinensis</i> (223)	***	***	**	***	***	-	***
<i>M. andinensis</i> (118)	*	-	*	***	***	-	-
<i>M. eximia</i> (153)	***	**	**	***	***	-	***
<i>M. eximia</i> (236)	***	-	**	***	***	-	***
<i>M. importuna</i> (237)	**	-	**	***	***	-	*
<i>M. importuna</i> (239)	***	*	*	***	*	-	***
<i>M. tridentina</i> (226)	*	**	***	**	***	-	***
<i>M. tridentina</i> (251)	**	*	*	***	***	-	-

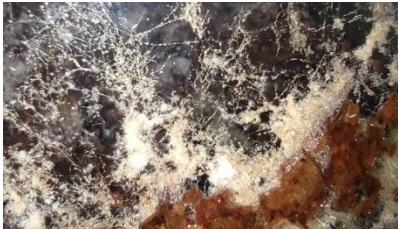
	Aserrín	Trigo	Paja de trigo + afrecho
<i>M. eximia</i> (153)			
<i>M. importuna</i> (239)			
<i>M. andinensis</i> (223)			

Fig. 16.a: Observación de micelio desarrollado por especies de *Morchella* creciendo en distintos sustratos lignocelulósicos luego de 15 días de incubación estática a 24°C.