

Artículo recibido 18 de junio de 2025.

Artículo aceptado 5 de septiembre de 2025.

Artículo publicado 5 de octubre de 2025.

Análisis genómico del locus *MAT* en *Trichoderma koningiopsis*: implicancias en la capacidad reproductiva sexual

Barengo, Marcela P.^{1,2}; Amerio, Natalia S.^{1,2}; Castrillo, María L.^{1,2}; Bich, Gustavo A.^{1,2}

¹Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas, y Naturales.

Instituto de Biotecnología Misiones. Laboratorio de Biotecnología Molecular. Ruta 12, km 7,5.
CP 3300. Posadas, Misiones.

²Consejo Nacional de investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET. Argentina.

barengomarcela@gmail.com

natymort@hotmail.com

mlc_827@hotmail.com

gustavobich@gmail.com

ORCI Marcela P, Barengo 0000-0003-1814-9690

ORCID Natalia S, Amerio 0000-0003-4342-9977

ORCID María L, Castrillo 0000-0002-4999-1672

ORCID Gustavo A, Bich 0000-0002-3658-5157

Resumen

Trichoderma es un género de hongos filamentosos con creciente interés biotecnológico debido a su uso como agente de biocontrol, productor de enzimas y promotor del crecimiento vegetal. Aunque muchas especies son consideradas asexuales, se han identificado formas sexuales en especies relacionadas clasificadas en el género *Hypocrea*, lo que sugiere la posible existencia de genes sexuales en *Trichoderma*. El locus *MAT*, responsable de la determinación del tipo sexual en hongos ascomicetes, ha sido poco explorado en especies como *Trichoderma koningiopsis*. En este estudio se investigó su presencia mediante análisis genómicos *in silico*, utilizando datos de secuenciación generados por tecnología Illumina a partir de una cepa fúngica nativa de interés biotecnológico. Se buscaron genes del locus *MAT* (*MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*,

MAT1-1-2, *MAT1-1-3*) y genes flanqueantes (*SLA2* y *APN2*). La detección de estos genes permitiría inferir capacidad reproductiva sexual latente, con posibles aplicaciones en el mejoramiento genético. Sin embargo, no se detectó la presencia de los genes *MAT*, lo que sugiere que *T. koningiopsis* es probablemente una especie exclusivamente asexual. En consecuencia, futuras estrategias de mejoramiento genético deberán basarse en métodos alternativos como ingeniería genética, mutagénesis o selección de variantes naturales.

Palabras clave: Genómica, illumina, biotecnología, hongos, mejoramiento genético

Abstract

Genomic analysis of the MAT locus in Trichoderma koningiopsis: implications for sexual reproductive capacity

Trichoderma is a genus of filamentous fungi with increasing biotechnological relevance due to its applications as a biocontrol agent, enzyme producer, and plant growth promoter. Although many *Trichoderma* species are considered asexual, the discovery of sexual forms in closely related species within the genus *Hypocrea* suggests the potential presence of sexual reproduction genes. Among them, the *MAT* (mating-type) locus plays a key role in determining sexual identity in ascomycetous fungi. However, its presence remains unexplored in species such as *Trichoderma koningiopsis*. In this study, we conducted an *in silico* genomic analysis to investigate the presence of *MAT* locus genes in *T. koningiopsis*, using Illumina-generated sequencing data from native fungal strain of biotechnological interest. We searched for *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, *MAT1-1-2*, *MAT1-1-3*, as well as the flanking genes *SLA2* and *APN2*. The absence of *MAT* genes in our dataset suggests that *T. koningiopsis* is likely an obligate asexual species. This finding has direct implications for genetic improvement strategies, which should focus on alternative approaches such as mutagenesis, genetic engineering, or selection of naturally occurring variants.

Keywords: Genome, illumine, biotechnology, fungi, genetic improvement

INTRODUCCION

Los hongos del género *Trichoderma* son organismos filamentosos ampliamente reconocidos por su importancia biotecnológica, especialmente por su efectividad como agentes de biocontrol, productores de enzimas lignocelulolíticas e inductores de resistencia sistémica en plantas (Druzhinina et al., 2012; Kubicek et al., 2019; Amerio et al., 2020). El éxito de *Trichoderma* como agente de biocontrol radica en su habilidad para competir por espacio y nutrientes, así como en la producción de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas que degradan las paredes celulares de fitopatógenos (Schmoll et al., 2016; Kumari et al., 2024; Evren et al., 2025).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* han sido clasificadas como asexuales. Sin embargo, investigaciones recientes han identificado formas sexuales en especies filogenéticamente cercanas, agrupadas en el género *Hypocrea*, lo que sugiere la posible presencia de genes sexuales conservados en *Trichoderma* (Kubicek et al., 2019). Esta hipótesis ha impulsado el interés por explorar la base genética de la reproducción en estas especies, especialmente en aquellas de interés biotecnológico.

En este contexto, el locus *MAT* (*Mating Type Locus*) es el principal determinante de la sexualidad en hongos. Este locus codifica factores de transcripción que regulan la compatibilidad sexual y, por ende, la posibilidad de reproducción sexual fúngica. Los genes típicos del locus *MAT* incluyen *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, *MAT1-1-2* y *MAT1-1-3*, así como los genes flanqueantes conservados conocidos como *SLA2* y *APN2* (Schmoll et al., 2016; Pöggeler et al., 2018; Kubicek et al., 2019). La identificación de estos genes en el genoma de *Trichoderma* permitiría inferir la existencia de una capacidad reproductiva sexual latente, lo cual tendría implicancias directas en el diseño de estrategias de mejoramiento genético (Seidl et al., 2009).

La genómica de hongos está en plena expansión gracias a tecnologías de secuenciación masiva (NGS), que desentrañan la diversidad genética, la arquitectura cromosómica y fenómenos evolutivos como duplicación de genes y transferencia horizontal (Neu et al., 2017; Castrillo et al., 2017). Estos avances permiten descubrir redes metabólicas, vías de patogenicidad y mecanismos de adaptación, aunque persiste

un reto importante: una gran proporción de genes aún carece de función asignada (Castrillo et al., 2017; Bielecka et al., 2022).

La disponibilidad de tecnologías de secuenciación de nueva generación, como Illumina, ha facilitado el acceso a información genómica detallada, permitiendo la búsqueda exhaustiva de genes de interés mediante análisis *in silico*. Estos enfoques han revolucionado el estudio de la genética de hongos, brindando herramientas precisas para la identificación y caracterización de loci específicos (Nafea et al., 2024).

En el género *Trichoderma*, varios genomas están disponibles en bases de datos públicas; estudios comparativos revelan agrupaciones génicas o *clusters* para la biosíntesis de metabolitos secundarios, genes implicados en la interacción ambiental y señales de comunicación con otros organismos (Kubicek et al., 2019; Lütkenhaus et al., 2019). Asimismo, se evidencia que el locus *MAT* en *T. reesei* codifica ambos idiomorfos (*MAT1-1* y *MAT1-2*) (Kubicek et al., 2019).

A pesar de que muchas especies de *Trichoderma* se consideran asexuales, se observan estadios sexuales en especies relacionadas dentro del género *Hypocrea*, lo que sugiere la posible existencia de reproducción sexual críptica (Seidl et al., 2009). El locus *MAT*, conformado por los idiomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2*, codifica factores de transcripción determinantes del tipo sexual en ascomicetes, y suele estar flanqueado por genes como *APN2* y *SLA2*, cuya conservación facilita su identificación (Pöggeler et al., 2018).

Para *T. koningiopsis*, ya se dispone de un ensamblaje genómico nuclear de ~36,6 Mbp y un mitogenoma circular de 27.560 pb obtenido por tecnología Illumina (Castrillo et al., 2017; Castrillo et al., 2023). Sin embargo, en el caso de *T. koningiopsis*, una especie con alto potencial biotecnológico y aplicaciones en el control de fitopatógenos, la presencia y organización del locus *MAT* no ha sido caracterizada aún. El análisis genético o genómico de este locus permitiría no solo esclarecer aspectos fundamentales de la biología reproductiva de la especie, sino también orientar el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento genético, tanto convencionales como biotecnológicas. La detección del locus *MAT* permitiría confirmar un potencial sexual críptico, habilitando estrategias de mejoramiento genético mediante cruzamientos dirigidos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, mediante herramientas genómicas *in silico*, la presencia y organización del locus *MAT* y sus genes asociados en el genoma de una cepa nativa de *T. koningiopsis*, con el fin de inferir su capacidad de reproducción sexual y establecer las bases para el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético orientadas a aplicaciones biotecnológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prospección y caracterización del locus MAT y sus genes asociados relacionados a la capacidad sexual en hongos

Se seleccionaron datos genómicos (tecnología NGS Illumina Truseq) de una cepa de *T. koningiopsis* (LBM 116 - POS7) de interés biotecnológico con antecedentes de eficacia en biocontrol de fitopatógenos y secreción de enzimas, perteneciente al cepario del Instituto de Biotecnología Molecular de Misiones (Castrillo, 2015; Castrillo et al., 2017). Se realizó una prospección integral (búsqueda, localización y caracterización) de los genes de interés en el genoma de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7) utilizando como datos crudos las 9.483.872 lecturas o secuencias cortas del genoma de este hongo (Nro. de acceso Genbank MRBD000000000.1, Nro. de Bioproyecto PRJNA356137). Las lecturas o secuencias cortas fueron sometidas a control de calidad con herramientas como FastQC (Andrews, 2010) y Trimmomatic (Bolger et al., 2014), eliminando lecturas de baja calidad y adaptadores.

Para la búsqueda de genes del locus *MAT* (*MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, *MAT1-1-2*, *MAT1-1-3*) y genes flanqueantes (*SLA2*, *APN2*), primeramente, se realizaron búsquedas BLASTn en la base de datos del NCBI de secuencias de referencia (Tabla 1). La búsqueda y localización de genes de interés en el genoma de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7) se realizó *de novo* utilizando el programa bioinformático Geneious 9.1.8 (Kearse et al., 2012). Los genes de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7) detectados fueron corroborados por búsquedas de similitud a través del motor BLAST en la base de datos del NCBI (Altschul et al., 1990).

Tabla 1. Genes de referencia. Fuente Genbank.

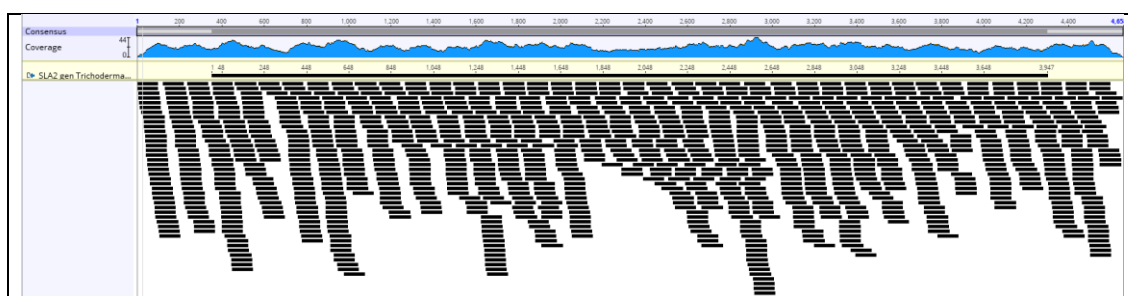
Locus	N° de acceso Genbank
<i>MAT1-1-1</i>	FJ 599756, KY 624603, KY 624604
<i>MAT1-2-1</i>	KY 624604
<i>MAT1-1-2</i>	FJ 599756, KY 624603, KY 624604
<i>MAT1-1-3</i>	FJ 599756, KY 624603, KY 624603
<i>SLA2</i>	FJ 798800, MH401191, XM_014101264
<i>APN2</i>	CP 075864, OM362514

RESULTADOS

Luego del proceso de evaluación y filtrado de lecturas o secuencias cortas la calidad de las lecturas permitió una búsqueda exhaustiva de los genes del locus *MAT* y sus regiones flanqueantes.

Aun utilizando 9.483.872 lecturas o secuencias cortas, a través de la estrategia de mapeo por referencia y búsqueda *de novo*, no se detectó la presencia de ninguno de los genes *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, *MAT1-1-2* ni *MAT1-1-3* en el genoma de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7). Asimismo, no se identificaron secuencias con similitud significativa a los dominios funcionales característicos de estos genes.

Por otro lado, utilizando la misma estrategia de análisis genómico comentada más arriba sí se identificaron los genes flanqueantes *SLA2* y *APN2* en el genoma de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7), demostrando la conservación de estos genes respecto a las secuencias de referencia de otras especies fúngicas. Para el gen *SLA2* se detectó la secuencia parcial, de aproximadamente 3145 pb con una cobertura máxima de 44X (Figura 1a). Para el gen *APN2* se detectó una secuencia de aproximadamente 3960 pb con una cobertura máxima de 38X (Figura 1b).



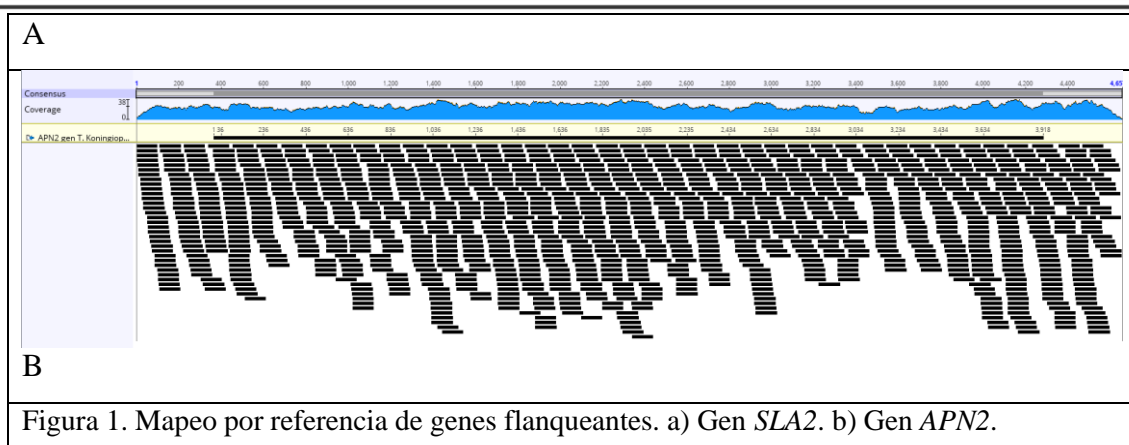


Figura 1. Mapeo por referencia de genes flanqueantes. a) Gen *SLA2*. b) Gen *APN2*.

El análisis de búsqueda por similitud en la base de datos del NCBI de los genes flanqueantes confirmó su pertenencia al clado de *Trichoderma*, descartando posibles errores de ensamblado.

Si bien se reconoce que basar un estudio genómico en una única cepa conlleva limitaciones, el genoma de *T. koningiopsis* POS7 fue previamente ensamblado con aproximadamente 9,4 millones de lecturas Illumina y una cobertura adecuada, resultando en un genoma de 36,6 Mpb que constituye una referencia confiable para la búsqueda de genes funcionales (Castrillo et al., 2017). En este contexto, los datos obtenidos se consideran una base robusta para la exploración *in silico* de los genes del locus *MAT* en esta especie.

La ausencia del locus *MAT* en *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7) sugiere que la especie es exclusivamente asexual. Este hallazgo es consistente con la falta de reportes de estructuras sexuales en la literatura y con la biología reproductiva observada en condiciones de laboratorio. Asimismo, numerosas especies de *Trichoderma* ya han sido reportadas con ausencia de reproducción sexual, como *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma afroharzianum*, donde estudios filogenéticos sugieren que la ganancia o pérdida de capacidad de reproducción sexual ha ocurrido numerosas veces en la evolución del género *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2010; Druzhinina et al., 2012; Kubicek et al., 2019).

Estos resultados tienen importantes implicancias para el mejoramiento genético de la especie, ya que descartan la posibilidad de utilizar cruzamientos sexuales

convencionales para la generación de nuevas variantes o la combinación de rasgos de interés biotecnológico.

DISCUSIÓN

En este estudio no se detecta la presencia de genes del locus *MAT* en la cepa *Trichoderma koningiopsis* LBM 116 (POS7), pese a una búsqueda exhaustiva con ~9,48 millones de lecturas cortas Illumina mediante mapeo y ensamblado *de novo*. Este resultado representa un hallazgo relevante para la biotecnología y el desarrollo de agentes de biocontrol. Detectar la biología reproductiva de una cepa fúngica promisorio tiene implicancias directas en estrategias de mejoramiento genético, y como consecuencia se determinó que no será viable aplicar cruzamientos dirigidos entre cepas.

La imposibilidad de realizar cruzamientos sexuales limita las estrategias de mejoramiento genético a métodos alternativos como la ingeniería genética, la mutagénesis aleatoria y la selección de variantes naturales. En ese sentido, el resultado negativo de detección *in silico* del locus *MAT* en el mejoramiento genético de cepas, aporta información valiosa al evitar duplicación de esfuerzos experimentales o dedicar recursos a protocolos sexuales que probablemente no funcionen.

En este contexto, la exploración de la variabilidad presente en poblaciones de *Trichoderma*, especialmente en cepas nativas, se perfila como la alternativa más prometedora para optimizar el uso de *T. koningiopsis* (sólo o en consorcio de cepas) en programas de biocontrol y en la producción de bioinsumos.

El análisis genómico de una única cepa de *T. koningiopsis* LBM 116 (POS7) ciertamente impone límites al alcance o extrapolación de las conclusiones. Aunque su genoma fue previamente ensamblado con alta cobertura y calidad y sirve como estándar en la literatura (Castrillo et al., 2017), no hay garantía de que otras cepas de la misma especie no porten versiones divergentes del locus *MAT*. Además, aunque algunos trabajos han hallado baja divergencia molecular en ciertos marcadores en especies de *Trichoderma*, en otros casos sí se ha documentado una alta variabilidad intraespecífica (Muthumeenakshi et al., 1994; El-Komy et al., 2015)

Merece la pena resaltar que, en última instancia, además del locus *MAT* relacionado a la reproducción sexual en hongos, existen otros factores externos igualmente involucrados en este proceso en algunas cepas fúngicas, como la interacción entre cepas a través de comunicación química por metabolitos secundarios, la luz ambiental y el medio de cultivo (Dattenböck et al., 2018).

Es importante considerar que la ausencia del locus *MAT* podría estar asociada a una pérdida evolutiva, posiblemente relacionada con la adaptación a nichos ecológicos específicos donde la reproducción asexual podría haberle conferido alguna ventaja selectiva. Mutantes del locus *MAT* en *Fusarium graminearum* poseen una virulencia reducida en la colonización de tejidos vegetales, lo que indica que estos genes también podrían estar cumpliendo roles en otras actividades biológicas del hongo (Zheng et al., 2013).

Como metas para mejorar las limitantes de información genómica a partir de una única cepa de *T. koningiopsis*, en futuras investigaciones proponemos la estrategia de ampliar el análisis genómico *in silico* a otras cepas de *T. koningiopsis* como así también de diferentes orígenes geográficos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

Amerio, N.S., Castrillo, M.L., Bich, G.A., Zapata, P.D. & Villalba, L.L. (2020). *Trichoderma* en la Argentina: Estado del arte. *Ecología austral*, 30(1), 113-124.

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at:
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Bielecka, M., Pencakowski, B. & Nicoletti, R. (2022). Using next-generation sequencing technology to explore genetic pathways in endophytic fungi in the syntheses of plant bioactive metabolites. *Agriculture*, 12(2), 187.

Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Castrillo, M.L. (2015) Caracterización de celulasas secretadas por aislamientos de *Trichoderma*, nativos de la provincia de Misiones (Argentina) aplicables en la etapa de sacarificación. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Misiones. 286 p.

Castrillo, M.L., Bich, G.Á., Modenutti, C., Turjanski, A., Zapata, P.D. & Villalba, L.L. (2017). First whole-genome shotgun sequence of a promising cellulase secretor, *Trichoderma koningiopsis* strain POS7. *Genome Announcements*, 5(37), 10-1128.

Castrillo, M.L., Bich, G.Á., Amerio, N.S., Barengo, M.P., Zapata, P.D., Saparrat, M.C.N. & Villalba, L.L. (2023). *Trichoderma koningiopsis* (Hypocreaceae) has the smallest mitogenome of the genus *Trichoderma*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1141087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1141087>

Dattenböck, C., Tisch, D., Schuster, A., Monroy, A.A., Hinterdobler, W. & Schmoll, M. (2018). Gene regulation associated with sexual development and female fertility in different isolates of *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5, 1-11.

Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Komoń-Zelazowska, M., Mulaw, T.B. & Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1-14.

Druzhinina, I.S., Komoń-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G.J. & Kubicek, C. P. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation

in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(5), 358-368.

El_Komy, M., Saleh, A., Eranthodi, A. & Molan, Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The plant pathology journal*, 31(1), 50.

Evren, G., Korkom, Y., Saboori, A. & Cakmak, I. (2025). Exploring the potential of *Trichoderma* secondary metabolites against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 211, 108299.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Kubicek, C.P., Steindorff, A.S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., ... & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC genomics*, 20, 1-24.

Kumari, R., Kumar, V., Arukha, A.P., Rabbee, M.F., Ameen, F. & Koul, B. (2024). Screening of the biocontrol efficacy of potent *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Scelrotium rolfsii* causing wilt and collar rot in chickpea. *Microorganisms*, 12(7), 1280.

Lütkenhaus, R., Traeger, S., Breuer, J., Carreté, L., Kuo, A., Lipzen, A., ... & Nowrousian, M. (2019). Comparative genomics and transcriptomics to analyze fruiting body development in filamentous ascomycetes. *Genetics*, 213(4), 1545-1563.

Muthumeenakshi, S., Mills, P., Brown, A. & Seaby, D. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, 140(Pt 4), 769–777.

Nafea, A.M., Wang, Y., Wang, D., Salama, A.M., Aziz, M.A., Xu, S. & Tong, Y. (2024). Application of next-generation sequencing to identify different pathogens. *Frontiers in microbiology*, 14, 1329330.

Neu, E., Featherston, J., Rees, J. & Debener, T. (2017). A draft genome sequence of the rose black spot fungus *Diplocarpon rosae* reveals a high degree of genome duplication. *PLoS One*, 12(10), e0185310.

Pöggeler, S., Nowrousian, M., Teichert, I., Beier, A. & Kück, U. (2018). Fruiting-body development in ascomycetes. *The Mycota: Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects*, 1-56.

Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., ... & Herrera-Estrella, A. (2016). The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 205-327.

Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. P. & Schmoll, M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13909-13914.

Zheng, Q., Hou, R., Juanyu, Zhang, Ma, J., Wu, Z., ... & Xu, J. R. (2013). The MAT locus genes play different roles in sexual reproduction and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 8(6), e66980.