

ARTÍCULO

TRANSCRIPTÓMICA DE *Sporobolus alterniflorus*: ESTUDIO DE UNA PLANTA CON UNA INTERESANTE ADAPTACIÓN QUE PODRÍA EXTRAPOLARSE A CULTIVOS DE INTERÉS AGRONÓMICO

Gonzalez Flores, M.^{1,2}; Corio, C.³; Degele, C.; Mantegna, M.^{1,2}; Medina, A.^{4*}

1- Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN CONICET-UNCo), Argentina.

2- Facultad de Ciencia Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina.

3- Agromarkers, Brasil.

4- Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina.

*E-mail: alonsoim@gmail.com

RESUMEN

Sporobolus alterniflorus es una especie vegetal halófila que se encuentra en las costas patagónicas, conocida por su notable tolerancia a condiciones de alta salinidad. Este estudio tuvo como objetivo identificar genes asociados a la resistencia a la salinidad. Se recolectaron clones de tres poblaciones naturales en Bahía San Antonio (Río Negro) y se cultivaron en condiciones hidropónicas estándar y en condiciones salinas. Se extrajo ARN de raíces y hojas y se secuenció el cDNA. El ensamblado *de novo* del transcriptoma generó aproximadamente 8.000 genes. El análisis de expresión diferencial identificó 20 genes altamente expresados en condiciones salinas, vinculados a rutas fotosintéticas, transporte de sodio, membranas y resistencia a arsénico. Los resultados confirman mecanismos adaptativos como la exclusión iónica y síntesis de solutos compatibles. Este trabajo sienta las bases para en un futuro desarrollar cultivos más resistentes a la salinidad.

Palabras clave: tolerancia a la salinidad, *Sporobolus alterniflorus*, expresión génica.

1. INTRODUCCIÓN

Sporobolus alterniflorus (basionimia: *Spartina alterniflorus*, Loisel. 1807), comúnmente conocida como pasto salado o “smooth cordgrass”, es una especie halófila originaria de las costas patagónicas, reconocida por su notable tolerancia a condiciones de alta salinidad (Fitter y Hay, 2002). Esta especie presenta una estrecha relación sistemática con otras especies de relevancia agronómica, como *Oryza sativa* (arroz), *Gossypium spp.* (algodón), *Medicago sativa* (alfalfa) y *Triticum spp.* (trigo) (Schreb, 1838).

Esto la convierte en un modelo prometedor, ya que, al poseer un material genético taxonómicamente cercano a estos cultivos de interés, tendría un *background* genético similar de respuestas metabólicas, lo que se traduce en una mayor probabilidad de poder introducir genes de *Sporobolus* en especies de interés agronómico.

Esta especie endémica ha sido escasamente estudiada. Hasta la fecha, solo se ha publicado un trabajo reciente en poblaciones costeras de los Estados Unidos que evalúa la relación de los genes de síntesis de dimetilsulfoniopropionato y su tolerancia al estrés (Payet *et al.*, 2024). Sin embargo, aún no se han caracterizado en detalle todos los mecanismos metabólicos responsables de su elevada tolerancia a la salinidad. Tampoco se ha explorado el potencial de esta especie en las poblaciones introducidas en las costas de Río Negro.

En base a estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue identificar genes claves asociados a la resistencia a la salinidad en *S. alterniflorus* mediante análisis transcriptómico bajo condiciones experimentales controladas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo involucró una parte experimental (wet lab) y una parte de análisis bioinformático (dry lab). La primera fue desarrollada en su totalidad por los Investigadores de la Facultad de

Ciencias Marinas y la segunda está siendo explorada por los investigadores de la Facultad de Ciencias Agrarias (Figura 1). Este trabajo fomenta la cooperación entre unidades académicas y nos alienta a fortalecer vínculos institucionales.

2.1. Diseño y procedimiento de muestreo para la recolección de *Sporobolus alterniflorus*

Se realizó un muestreo de *Sporobolus alterniflorus* en la zona de Punta Verde, ubicada dentro del Área Natural Protegida Bahía San Antonio (ANPBSA), San Antonio Oeste. La recolección se llevó a cabo durante la marea baja para facilitar el acceso y observar el contraste con la marea alta (Figura 2).

El diseño de muestreo consistió en una transecta de 70 metros sobre el talud más extenso del arroyo de marea. Esta transecta se dividió en 10 puntos (parches), separados cada 7 metros. En cada punto se extrajeron tres individuos, totalizando 30 plantas. Aunque *S. alterniflorus* no presenta una distribución en parches, este enfoque mixto permite maximizar la diversidad genética incluida en el muestreo.

Las plantas fueron extraídas con pala de punta, delimitando un área circular de aproximadamente el doble del diámetro del cuello de cada planta, con el objetivo de preservar la integridad del sistema radicular.

Posteriormente, se almacenaron en bolsas de nylon grueso para evitar la desecación durante el transporte hasta el montaje del ensayo.

Dado que se trata de una zona protegida con especies que actúan como ingenieros ecosistémicos, el muestreo fue planificado para minimizar impactos ambientales.

2.2. Cultivo experimental bajo condiciones controladas de salinidad

De las muestras recolectadas, se cultivaron diez clones en dos condiciones durante 30 días: (i) medio hidropónico estándar y (ii) medio hidropónico suplementado con 27 g/L de NaCl. Todos los clones crecieron normalmente bajo ambas condiciones (Figura 3).

2.3. Extracción de ARN y secuenciación del transcriptoma

Se extrajo ARN de raíces y hojas de un único clon expuesto a ambas condiciones. El ADN complementario (cDNA) se secuenció utilizando tecnología Roche® 454 de pirosecuenciación, generando aproximadamente 1,96 Gb por transcripto, con fragmentos de entre 400 y 1000 bp y una cobertura promedio de 10–50X.

2.4. Ensamblado y anotación funcional del transcriptoma

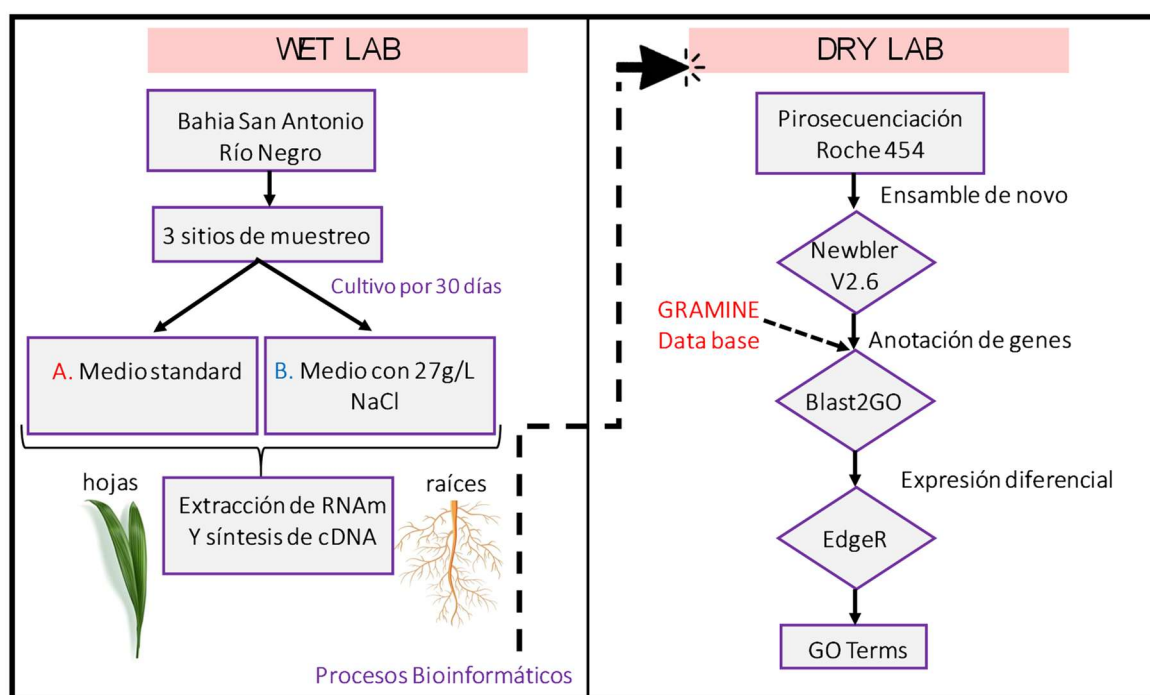


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología realizada.



Figura 2. Fotografías del área de muestreo de la Costa del Río Negro, con marea baja y alta.



Figura 3. Tratamientos en el invernáculo del INTA Valle Inferior.

Dado que no existe un genoma de referencia para esta especie, se realizó un ensamblado *de novo* del transcriptoma utilizando Newbler v2.6©. Se obtuvieron aproximadamente 10.000 isogrupos, con una longitud promedio de ~3.000 bp. La anotación génica se llevó a cabo con Blast2GO (Conesa & Götz, 2008), utilizando como referencia la base de datos GRAMENE y especies de la familia Poaceae, lo que permitió anotar unas ~8.000 genes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Distribución y caracterización de la especie *Sporobolus alterniflorus* en costas de Río Negro

La distribución mundial de la vegetación de *Sporobolus* indica que se encuentran principalmente en zonas costeras, por ejemplo, en la costa atlántica de América del Norte, desde el río St. Lawrence hasta el Golfo de México, y también en otras regiones como la costa atlántica de América del Sur, California y el NW de Europa. En Europa, especies como *Sporobolus maritima* y su híbrido *Sporobolus anglica* son comunes, mientras que en Asia y Australia predominan especies como *Salicornia australis* y *Triglochin maritima*. En América del Norte, los pantanos salados están dominados por *Sporobolus alterniflorus* y *Sporobolus patens* en la costa oriental, y en la occidental por comunidades mixtas.

En Sudamérica, especialmente en Argentina, trabajos previos basados en características sistemáticas, mencionan

que comunidades de *Sporobolus* se localizan en la costa atlántica, con dominancia de *Sporobolus densiflorus* y *S. alterniflorus*, formando mosaicos de vegetación en las costas de Río Negro (Naciri *et al.*, 2012).

Trabajos muy antiguos mencionan que en los pantanos argentinos la especie *S. alterniflorus* domina en áreas intermareales, mientras que *S. densiflorus* en zonas más elevadas y *Uncus spp.* en las áreas más altas, costeras, con variaciones según la influencia de las mareas y la sedimentación (Ringuelet, 1938; Vervoorst, 1967).

Sin embargo, en las regiones de las costas de Río Negro, no se encontraron datos de la caracterización molecular a nivel de especie de las poblaciones de *Sporobolus spp.* En este trabajo se realizó una caracterización taxonomía basado en datos morfológicos que definen las especies del género y una determinación molecular (ITS-1 y ITS-2). Con los resultados de las secuencias de ITS se confirmó que las muestras estudiadas corresponden a *S. alterniflorus*, corrigiendo la identificación inicial basada en morfología que arrojaba la identificación de la especie como *S. densiflora*.

3.2. Propagación vegetativa en condiciones controladas

Una vez identificadas a nivel de especie, las plantas se propagaron vegetativamente en vivero. Unas 30 plantas obtuvieron un buen desarrollo y adaptación en las condiciones del estudio. Esta especie se reproduce principalmente de forma vegetativa, mediante rizomas, y presenta dos fenotipos: alto y bajo. Además, posee una fisiología eficiente en climas cálidos y secos debido a su mecanismo de fijación de carbono C4, lo que le permite aprovechar mejor el agua y adaptarse a ambientes salinos y soleados.

Respecto a la clonación, las plantas se propagaron mediante métodos vegetativos, principalmente a través de rizomas que permiten la formación de nuevas plantas en el mismo sitio. La buena salud de las plantas indicó que las técnicas de propagación vegetativa empleadas fueron efectivas, facilitando su crecimiento y establecimiento en el área de estudio.

A su vez, como se mencionó previamente, la especie *S. alterniflorus*, muestra una capacidad notable para crecer en zonas de agua salada. En las costas de Río Negro la salinidad ronda entre 35-28 g/L. Es por ello, que en la condición de salinidad estudiada (27 g/L) las plantas no mostraron ningún signo de deficiencia en su crecimiento.

3.3. Análisis de expresión génica y funciones asociadas al estrés salino

Debido a que hasta el momento no se cuenta con el genoma ensamblado y anotado para la especie *S. alterniflorus*, los genes anotados se obtuvieron en base a comparaciones con datos previos en estudios con *S. marítima* (Ferreira de Carvalho *et al.*, 2013) y otras especies halófitas (Chelaifa, *et*

al., 2010). En este estudio se secuenciaron y ensamblaron 7.357 genes para hojas y 6.139 para raíces de *S. alterniflorus*, permitiendo la identificación de relaciones de ortología, localización celular y función biológica mediante herramientas como Blast2GO, Pfam, TIGR e InterPro.

Estos genes, evidenciaron una amplia diversidad de funciones biológicas y localizaciones subcelulares, con predominio de componentes plastidiales, mitocondriales y citoplasmáticos. Se destaca la presencia de genes relacionados con procesos metabólicos clave (síntesis de carbohidratos, compuestos nitrogenados, estrés osmótico), así como la identificación de familias génicas relevantes en salinidad, como genes relacionados con ubiquitinación, factores de transcripción y proteínas de defensa como Thaumatina.

El proceso de ensamblaje y anotación de los transcriptos reveló la expresión diferencial de 20 genes más altamente expresados en condiciones de estrés salino que en tratamiento sin salinidad para cada tejido (raíz y hoja), destacando una baja coincidencia entre los genes diferencialmente expresados en hoja y raíz, lo que sugiere respuestas transcriptómicas específicas por órgano (Tabla 1).

Entre los genes destacados se incluyen aquellos vinculados al transporte iónico (Na^+/H^+ , Ca^{2+}), la biosíntesis de solutos compatibles, la respuesta al estrés oxidativo y procesos metabólicos generales relacionados con carbohidratos y compuestos nitrogenados. Este trabajo representa un aporte clave al conocimiento de los mecanismos moleculares de adaptación a la salinidad, aportando un marco de referencia valioso para futuros estudios en especies halófitas.

Trabajos recientes en otras poblaciones, confirman parcialmente nuestros resultados. Todd *et al.* (2024, Plants), realizaron un análisis transcriptómico en *Sporobolus alterniflorus*, expuesto a distintos niveles de salinidad en ambientes naturales de la costa este de EE.UU., donde identificaron un conjunto de genes diferencialmente expresados ante el estrés salino, relacionados con transporte de iones (antiportadores Na^+/H^+ , canales de calcio), rutas metabólicas de solutos compatibles y respuestas

Tabla 1. Listado de 20 genes diferencialmente sobreexpresados en salinidad.

Nro.	Genes	Hojas	Raíces
1	Glyceraldehído-3-fosfatasa deshidrogenasa B	+++	+
2	Familia Fosforibulokinasa / Uridina kinasa	++	+
3	Translocador Tpt fosfato/ fosfoenolpiruvato	+	+
4	Piruvato, fosfato dikinasa	+	+
5	Factor de rápida alcalinización (RALF)	+	+
6	Módulo de unión a carbohidrato en celulosa (BMs)	+	+
7	Metalotioneína	+	+
8	Peroxidasa	+	+
9	Factor de transcripción	++	+++
10	Tolerancia salina	++	+
11	Estrés osmótico	++	+
12	Inducible por presencia de sal	-	-
13	Transporte de sodio	++	+
14	Antiporte vacuolar	+++	+
15	Antioxidante	+++	+
16	Familia Proteínas Thaumatina	+	+
17	Familia de simporte de sodio (<i>Sodium Bile acid</i>)	-	+
18	Familia Inositol monofosfatasa [Joshi <i>et. al.</i> , 2013]	+	++
19	Factor adenosina difosfato de ribosilación (<i>ADP-ribosylation</i>)	+	+
20	SUMO proteínas de ubiquitina (activación + conjugación)	+++	+++

hormonales. Aunque su abordaje es más ecológico y orientado al entorno natural, sus hallazgos son consistentes con los patrones observados en nuestro trabajo, principalmente en relación con la presencia de genes codificantes de antiportes vacuolares (Gonzalez *et al.*, 2024). Esta respuesta fisiológica podría ser importante en la resistencia a la salinidad para la planta.

Más recientemente, el estudio de Payet *et al.* (2024, Nature Communications) profundiza en la caracterización funcional de los genes responsables de la síntesis de dimetilsulfoniopropionato (DMSP), un compuesto compatible clave en la adaptación a ambientes salinos. Trabajando con *Sporobolus anglicus*, identifican y validan enzimáticamente genes específicos de esta vía. Esta investigación constituye el primer reporte funcional en plantas superiores de la ruta completa de síntesis de DMSP, aportando una base concreta para futuras búsquedas de ortólogos en otras especies halófitas, como *S. alterniflorus*.

En este contexto, este trabajo se posiciona como un eslabón inicial fundamental en la generación de una base de datos transcriptómica bajo

condiciones experimentales controladas. Aunque en aquel entonces no se contaba con herramientas de anotación y bases de datos completas, como las actuales, los datos generados permiten hoy una reevaluación para la búsqueda de ortólogos de genes como los reportados por Payet *et al.* (2024), integrando así los conocimientos fisiológicos descritos con validaciones funcionales moleculares más recientes.

4.CONCLUSIONES

Este trabajo cumplió con sus objetivos centrales: caracterizar la expresión del ARN mensajero en *Sporobolus alterniflorus*, una especie halófitas capaz de desarrollarse tanto en ambientes salinos como en condiciones no salinas. Se analizaron tejidos de hojas y raíces mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), combinadas con enfoques bioinformáticos avanzados. El análisis se realizó a través de un ensamblaje *de novo* —es decir, sin disponer de un genoma de referencia para la especie— siguiendo metodologías validadas en estudios transcriptómicos (Wang *et al.*, 2009).

A partir de estos datos, se identificaron genes diferencialmente sobreexpresados en respuesta al estrés salino. El análisis de expresión reveló patrones consistentes con mecanismos de adaptación fisiológica, incluyendo la activación de rutas metabólicas asociadas al transporte iónico (Na^+/H^+ , Ca^{2+}), la biosíntesis de solutos compatibles (como prolina o glicina-betaína), la respuesta al estrés oxidativo y otros procesos clave relacionados con la homeostasis celular y la tolerancia a condiciones adversas.

En conjunto, los resultados aportan evidencia del potencial adaptativo de *S. alterniflorus* y fortalecen su perfil como organismo modelo para el estudio de la resistencia a la salinidad. Este conocimiento representa un recurso valioso para futuras estrategias de mejora genética en cultivos agrícolas, mediante la identificación de genes candidatos susceptibles de ser transferidos o editados con el fin de optimizar su rendimiento en ambientes salinos.

5. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos abren la puerta a nuevas investigaciones.

De cara al futuro, surgen dos aproximaciones en las que estamos trabajando:

1. Secuenciación del genoma de *S. alterniflorus* y comparación con el transcriptoma obtenido.

Actualmente, esta especie carece de un genoma de referencia completo, lo que limita la profundidad de los análisis funcionales y comparativos. Por ello, uno de nuestros objetivos prioritarios es la obtención del primer genoma nuclear ensamblado y anotado de *S. alterniflorus*. Se prevé el uso de tecnologías de tercera generación (como *Oxford Nanopore* o *PacBio HiFi*), capaces de resolver regiones repetitivas y estructuras complejas del genoma que suelen ser inaccesibles mediante plataformas tradicionales. Este recurso genómico permitirá reevaluar los transcritos obtenidos, mejorar la precisión de la anotación funcional y facilitar estudios evolutivos y comparativos con otras gramíneas de interés agrícola.

2. Validación funcional mediante edición genética en especies modelo y cultivos.

Los genes identificados como candidatos en *S. alterniflorus* ofrecen un potencial biotecnológico

relevante para mejorar la tolerancia a la salinidad en cultivos sensibles como el arroz (*Oryza sativa*), el trigo (*Triticum spp.*) o el algodón (*Gossypium spp.*). Con este objetivo, se plantea la generación de organismos genéticamente editados (OGEs) utilizando tecnologías de edición génica de alta precisión como CRISPR/Cas. La edición se implementará inicialmente en modelos in vitro, con el propósito de validar experimentalmente el efecto funcional de los genes candidatos en condiciones controladas. Si bien esta aproximación es técnicamente viable, sus resultados pueden variar según el contexto genómico de cada especie receptora, por lo que actualmente se encuentra en una etapa exploratoria.

Además de consolidar estas líneas futuras, este proyecto constituye un ejemplo concreto de cooperación interinstitucional entre la Facultad de Ciencias Marinas y la Facultad de Ciencias Agrarias. Cinco integrantes - entre investigadores, tesis y estudiantes en formación - provenientes de distintas disciplinas (genética, agronomía, bioinformática y biología molecular) trabajan de manera articulada, promoviendo una sinergia interdisciplinaria que enriquece los enfoques, fortalece las capacidades locales y proyecta nuevas instancias de formación y transferencia. Este tipo de colaboración nos permite no solo avanzar en la frontera del conocimiento científico, sino también generar herramientas que contribuyan a enfrentar desafíos concretos, como la salinización de suelos agrícolas, desde una perspectiva innovadora y sustentable.

6. REFERENCIAS

- Chelaifa, H., Mahé, F., & Ainouche, M. (2010). Transcriptome divergence between the hexaploid salt-marsh sister species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Molecular ecology*, 19(10), 2050–63. doi:10.1111/j.1365294X.2010.04637.x
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, 2008, 619832. doi:10.1155/2008/619832
- Ferreira de Carvalho, J., Poulain, J., Da Silva, C., Wincker, P., Michon-Coudouel, S., Dheilly, A., Naquin, D., et al. (2013). Transcriptome de novo assembly from nextgeneration sequencing and comparative analyses in the hexaploid salt marsh species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Heredity*, 110(2), 181–93. doi:10.1038/hdy.2012.76
- Fitter AH y Hay R (2002) *Environmental Physiology of Plants* (3° ed.), Academic Press. 356 pp.

- González Flores Melisa; Coria C; Nicolas Bellora; Medina A. (2024). Identification of Salinity Resistance Genes in *Sporobolus alterniflorus* (Peterson & Saarela, 2014) through Transcriptomic Analysis. XIVCAB2C - 14th Argentinian Conference in Bioinformatics and Computational Biology. 7-8 November 2024. La Plata, Prov. de Buenos Aires, Argentina.
- Naciri, y., Caetano, s. y Salamin, n. (2012), Plant DNA barcodes and the influence of gene flow. *Molecular Ecology Resources*, 12: 575-580. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03130.x>
- Payet, R.D., Bilham, L.J., Kabir, (2024). Elucidation of *Spartina* dimethylsulfoniopropionate synthesis genes enables engineering of stress tolerant plants. *Nat Commun* 15, 8568. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51758-z>
- Ringuelet E (1938) Estudio fitogeográfico del Rincón de Viedma. *Rev. Fac. Agr.* XXI: 15-186.
- Schreber (1838) *Flora italiana, ossia descrizione delle piante*.
- Todd, A.; Bhide, K.; Hayford, R.; Ayyappan, V.; Subramani, M.; Chintapenta, L.K.; Thimmapuram, J.; Ozbay, G.; Kalavacharla, V. Development of a Reference Transcriptome and Identification of Differentially Expressed Genes Linked to Salt Stress in Salt Marsh Grass (*Sporobolus alterniflorus*) along Delaware Coastal Regions. *Plants* 2024, 13, 2008. <https://doi.org/>
- Vervoorst, F.B. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado (Provincia de Buenos Aires). Serie Fitogeográfica. La vegetación de la República Argentina. VIII. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. doi:10.1038/nrg2484