UNIVERSIDAD DEL VALLE

Metatranscriptoma de los endófitos de hojas y raíces de *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* en la bahía de Buenaventura, Colombia.

César Alejandro Lemos Lucumí

Director

Nelson Toro Perea

Maestría en Ciencias - Biología

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

06 de marzo de 2025

Tabla de contenido

Resumen 3

Palabras clave: 3

Abstrac ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Key words: 4

Introducción 4

Antecedentes 6

Objetivo General 8

Objetivos específicos 8

Métodos 9

Toma de las muestras 9

Extracción de Ácidos Nucleicos, Identificación Molecular y Secuenciación de ARN total 10

Análisis Bioinformáticos 11

Filtros de calidad y contaminación 11

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de diversidad Alfa y Beta 11

Ensamblaje de los metatranscriptomas 12

Anotación funcional, Expresión diferencial y enriquecimiento funcional 12

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de A. germinans y R. mangle 13

Resultados 14

Filtros de calidad y contaminación 14

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de diversidad Alfa y Beta 14

Ensamblaje de los metatranscriptomas 18

Anotación funcional 19

Expresión diferencial y enriquecimiento funcional 20

Comparaciones intraespecíficas 20

Comparaciones interespecíficas 27

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de *A. germinans* y *R. mangle* 33

Discusión 37

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de diversidad Alfa y Beta 37

Anotación funcional, expresión diferencial y enriquecimiento funcional 38

Comparaciones intraespecíficas 39

Comparaciones interespecíficas 40

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de *A. germinans* y *R. mangle* 42

Conclusiones 44

Literatura citada 45

Anexos 54

Resumen

El manglar es un ecosistema con una gran diversidad de organismos. En la bahía de Buenaventura la parte vegetal del ecosistema está compuesta principalmente por las especies *Rhizophora mangle* o mangle rojo, y *Avicennia germinans* o mangle negro. Una interacción poco estudiada pero muy importante, es la de las plantas con sus microorganismos endófitos. Esta relación es difícil de estudiar ya que la mayoría de los microorganismos endófitos no son cultivables mediante las técnicas actuales, sin embargo, el avance de las tecnologías de secuenciación ha generado la creación de herramientas ómicas de análisis de datos masivos, que permiten caracterizar las comunidades microscópicas presenten en una muestra. La metatranscriptómica nos confiere la capacidad de estudiar las funciones génicas que se encuentran activas en una comunidad, sin necesidad de realizar cultivos *in vitro*. Con el objetivo de estudiar las relaciones ecológicas, a nivel microscópico, que existen en los manglares, se realizó la caracterización del metatranscriptoma de los endófitos de hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*, en la bahía de Buenaventura, Colombia. Los resultados demostraron que existen diferencias significativas en la taxonomía y en las funciones encontradas en los metatranscriptomas analizados. Estas diferencias, se asociaron a la especie de planta hospedera y al tejido del que provenían las muestras. Además, se encontró que los microorganismos de ambas especies de mangle podrían aportar a la capacidad de sobrevivir de estas plantas en ambientes con altas temperaturas, presencia de metales pesados, xenobióticos y altos niveles de salinidad, además, de ayudar en la asimilación y almacenamiento de diversos nutrientes. Esta evidencia sugiera que la microbiota endofítica de *A. germinans* y *R. mangle* presenta un alto potencial biotecnológico y su estudio, a fondo, sería de gran utilidad para determinar su utilidad en el campo agrícola y de la bioprospección.

Palabras clave: Biotecnología, Interacción Planta-Microorganismo**,** Microbiota**,** RNAseq.

Abstract

The mangrove is an ecosystem with a great diversity of organisms. In Buenaventura Bay, the plant part of the ecosystem is mainly composed of the species Rhizophora mangle or red mangrove, and Avicennia germinans or black mangrove. A little studied but very important interaction is that of the plants with their endophytic microorganisms. This relationship is difficult to study since most of the endophytic microorganisms are not cultivable by current techniques; however, the advance of sequencing technologies has generated the creation of omics tools for massive data analysis, which allow us to characterize the microscopic communities present in a sample. Metatranscriptomics gives us the ability to study the gene functions that are active in a community, without the need for in vitro cultures. To study the ecological relationships, at the microscopic level, that exist in mangroves, the characterization of the metatranscriptome of the endophytes of leaves and roots of R. mangle

and *A. germinans*, in the bay of Buenaventura, Colombia, was carried out. The results showed that there are significant differences in the taxonomy and functions found in the analyzed metatranscriptomes. These differences were associated with the host plant species and the tissue from which the samples were taken. In addition, it was found that the microorganisms of both mangrove species could contribute to the ability of these plants to survive in environments with high temperatures, presence of heavy metals, xenobiotics and high salinity levels, in addition to helping in the assimilation and storage of various nutrients. This evidence suggests that the endophytic microbiota of *A. germinans* and *R. mangle* has a high biotechnological potential and its study, in depth, would be very useful to determine its utility in the agricultural and bioprospecting fields.

Key words: Biotechnology, Microbiota, Plant-Microorganism Interaction, RNAseq.

Introducción

El manglar es un ecosistema de transición entre las zonas terrestres y marinas, se encuentra en las zonas tropicales y subtropicales entre los 23°N y 23°S (Primavera et al, 2019). Estos ecosistemas tienen una gran importancia para muchas comunidades humanas ya que las proveen de diferentes servicios ecosistémicos como madera y hojas para la construcción de viviendas y carbón como combustible. Además, los manglares son el hábitat de muchas especies de peces y crustáceos que hacen parte de la dieta de humanos y otras especies (Kathiresan, 2012) Como aportes ecológicos, las especies arbóreas del manglar protegen a las zonas terrestres de las fuertes mareas, ayudan a la sedimentación y disminuyen la erosión de los suelos costeros (Koh et al, 2018). El manglar también cumple un rol clave en la lucha contra el cambio climático ya que dentro de estos ecosistemas se retienen emisiones de carbono de forma más eficiente que en los bosques terrestres (Atwood et al, 2017).

Los manglares se caracterizan por presentar especies de plantas altamente tolerantes a la salinidad del agua, ya que han desarrollado diversos tipos de adaptaciones para resistir la salinidad del entorno. Dentro de las especies de mangle que podemos encontrar en el pacífico colombiano están *Rhizophora mangle* o mangle rojo, y *Avicennia germinans* o mangle negro. Según los reportes en la literatura, *R. mangle* se encuentra en la zona más cercana al mar, por lo cual recibe el oleaje constante y actúa como barrera, mientras que *A. germinans* se encuentra detrás en la zonificación y no se ve afectada directamente por el oleaje (Duke y Allen, 2006). Sin embargo, en la bahía de Buenaventura, específicamente en la desembocadura del río Dagua, este patrón espacial no existe y los individuos de *R. mangle* y *A. germinans* se encuentran todos en la zona más externa del manglar, generando que estén expuestos a las mismas condiciones ambientales. En cuanto a las adaptaciones de estas especies a su hábitat podemos resaltar la presencia de neumatóforos en el mangle negro, estas estructuras son raíces aéreas que le permiten a la planta adquirir oxígeno de forma más eficiente (González-Hernández et al, 2016). El hecho de que estas dos especies de mangle se

encuentren bajo las mismas condiciones ambientales y que *A. germinans* presente estructuras especializadas como los neumatóforos, las convierte en objetos de estudio interesantes si se quiere entender cómo dos especies filogenéticamente separadas logran sobrevivir bajo la misma presión ambiental.

Además de las plantas, el ecosistema de manglar está compuesto por muchos tipos de seres vivos, entre ellos se encuentran los microorganismos, que también se conocen como la microbiota. Estos microorganismos pueden estar en diferentes ubicaciones con respecto a las plantas de mangle. Aquellos que se encuentran en el suelo del manglar se denominan microorganismos de suelo o no rizosféricos, los que se desarrollan en las regiones del suelo aledañas a las raíces se denominan microorganismos rizosféricos, aquellos microorganismos que se encuentran en las superficies aéreas de las plantas se conocen como microorganismos filosféricos y, finalmente, los microorganismos que se desarrollan en compartimientos internos de las plantas, entre o dentro de sus células, se denominan microorganismos endófitos (Santoyo et al, 2016; Yao et al, 2019; Santoyo, 2022). Sin importar la ubicación de los microorganismos, se ha demostrado, que estos cumplen roles fundamentales como el control de patógenos, promoción del crecimiento de las plantas, metabolismo de nutrientes, eliminación de compuestos que pueden representar un riesgo para las plantas y amortiguación del estrés abiótico causado por el ambiente (Compant et al, 2019).

Diversos estudios en manglares del mundo han permitido identificar las funciones que cumplen los microorganismos en este ecosistema, entre ellas están el reciclaje de nutrientes, producción de gases, fijación de nitrógeno y dióxido de carbono, degradación de compuestos y producción de moléculas tóxicas para otros organismos (Ottman et al, 2012). Además, los microorganismos de diferentes manglares se han empleado como fuente de compuestos que se utilizan para biorremediación, agricultura y un amplio rango de moléculas de importancia en la medicina (Rampadarath et al, 2018). La mayoría de los estudios se han centrado en la caracterización de la microbiota rizosférica o del suelo de los manglares, dejando un poco de lado el estudio y caracterización de la comunidad de microorganismos endófitos (Palit et al, 2022). A pesar de los avances que se han hecho hasta el momento, se estima que solo se ha identificado menos del 10% de la diversidad de microorganismos entre algas, hongos y bacterias, pertenecientes al bioma del manglar (Thatoi et al, 2013). Teniendo en cuenta esta falta de información y las posibilidades de encontrar funciones génicas nuevas, resulta interesante estudiar a los microorganismos endófitos del manglar en búsqueda de un potencial biotecnológico y de lucha contra el cambio climático que pueda ser aprovechado en diferentes formas.

Para conocer y caracterizar las funciones en las que se encuentran involucrados los microorganismos, se puede emplear un enfoque meta-ómico. Las herramientas ómicas permiten realizar el análisis masivo de secuencias de ADN, ARN, proteínas y metabolitos presentes en una muestra. Una de las grandes ventajas de las técnicas ómicas es el hecho de

que no se necesita generar cultivos de microorganismos para poder realizar su identificación, por lo cual permite sobrepasar uno de los grandes problemas que presenta el estudio de la microbiota (Warnecke & Hess, 2009). Entre estas técnica se destaca la metatranscriptómica, esta herramienta se refiere al estudio de todos los transcritos, o moléculas de ARN, presentes en una muestra ambiental, utilizando la secuenciación masiva (Bashiardes et al, 2016). La metatranscriptómica de comunidades de organismos no solo permite identificar gran parte de las bacterias, hongos, arqueas y virus presentes, sino que también nos posibilita el estudio de los genes que se encuentran transcripcionalmente activos bajo condiciones específicas (Warnecke & Hess, 2009; Gilbert & Hughes, 2011). Por lo tanto, la metatranscriptómica es una herramienta que resultaría útil para poder descubrir una mayor cantidad de especies y de funciones génicas que se encuentren activas en los manglares del pacífico colombiano. Teniendo en cuenta todo lo anterior, surgen diferentes preguntas, tales como: ¿qué microorganismos se encuentran transcripcionalmente activos en la microbiota de *Rhizophora mangle* y de *Avicennia germinans* de la bahía de Buenaventura, Colombia?, ¿los microorganismos asociados a estas dos especies de plantas cumplen las mismas funciones?, ¿los microorganismos asociados a los mangles colaboran con su maquinaria molecular a la capacidad de las plantas de sobrevivir en un ambiente con alta salinidad, alta radiación solar y presencia de contaminantes? y ¿ La microbiota endofítica de *R. mangle* y *A. germinans* presenta genes activos con potencial biotecnológico para la agricultura y la industria?

Antecedentes

Buenaventura es un municipio del departamento del Valle del Cauca, ubicado al sur occidente de Colombia, en la bahía de Buenaventura, en el océano Pacifico, lo cual, lo ha convertido en el puerto más importante de Colombia, ya que, por él, circula aproximadamente el 53% del comercio internacional del país (Perez, 2007). La bahía de Buenaventura comprende un bosque húmedo tropical que se caracteriza por tener un clima cálido todo el año, con un promedio de temperatura de 26°C, una alta humedad relativa y alta pluviosidad, con un promedio anual de 7400 mm (Enriquez et al, 2014). Una buena parte de los ríos que hay en la región geográfica del Valle del Cauca desembocan al océano pacífico en la bahía de Buenaventura. Esto crea unas condiciones en las que el agua dulce se mezcla con el agua salada, generando los estuarios (Vidal et al, 2021). Estos estuarios presentan las condiciones óptimas para el desarrollo de especies vegetales adaptadas a la salinidad. El crecimiento de estas plantas permite la consolidación del ecosistema de manglar. La flora arbórea de los manglares del pacífico colombiano está constituida por *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Rhizophora racemosa* (mangle rojo), *Rhizophora harrisonii* (mangle rojo), *Avicennia germinans* (mangle negro), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco) y *Pelliciera rhizophorae* (mangle piñuelo) (Blanco-Libreros & Álvarez-León, 2019).

Dos de las especies más abundantes en los manglares de Buenaventura son *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans*. *R. mangle* o mangle rojo, es una especie de la familia Rhizophoracea, es muy utilizada por las poblaciones que viven en los manglares del pacífico colombiano, gracias a la alta capacidad de almacenamiento de carbón, su madera es empleada como leña para hacer fuego, para la construcción de casas, cercas, postes eléctricos e incluso juguetes (Salazar et al, 2019). En el perfil del manglar del pacífico colombiano, *R. mangle* se suele ubicar en la zona más cercana al océano, siendo la primera defensa contra el oleaje. *R. mangle* es la especie de mangle que permanece en contacto con el agua de mar por mayores periodos de tiempo, especialmente en la región aérea de sus raíces (León, 2003). Con respecto al mangle negro, *A. germinans,* éste es una especie arbórea de la familia Acanthacea, se distingue por presentar un tipo de raíces aéreas llamadas neumatóforos, los cuales son raíces especializadas en el intercambio gaseoso en zonas de baja disponibilidad de oxígeno (Salas-Leiva et al, 2009). En el pacífico colombiano, *A. germinans* es generalmente encontrada detrás del mangle rojo, más al interior del bosque de manglar (León, 2003). Sin embargo, en la desembocadura del río Dagua, en la bahía de Buenaventura, los especímennes de *R. mangle* y *A. germinans* se desarrollan juntos en la zona más externa del manglar.

Los árboles de mangle de Buenaventura son el hábitat de una gran cantidad de organismos que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos y que han sido caracterizados en mayor o menor medida. Entre estos podemos encontrar peces, moluscos, micro y macro artrópodos (Cantera & Blanco, 2001). Sin embargo, existen grupos que no han sido estudiados en los manglares de Buenaventura, entre ellos tenemos a los microorganismos. Diversos estudios han identificado la importancia de los microorganismos para las plantas y en general para los ecosistemas (Lau & Leon, 2012; Prakash et al, 2015; Compant et al, 2019). Los estudios de microorganismos endófitos han demostrado el impacto que estos tienen en la defensa de la planta contra la herbivoría y las infecciones por patógenos, la producción de enzimas que complementan el metabolismos de las plantas (D'alessandro et al, 2014), la respuesta al estrés abiótico causado por el cambio climático, la contaminación generada por los seres humanos (Nair & Padmavathy, 2014), y la obtención de compuestos con potencial biotecnológico para la agricultura o la medicina (Raimi & Adeleke, 2021). A pesar de todo esto, el estudio de los endófitos de manglares es casi nulo y se limita al conocimiento de algunas pocas especies cultivables en laboratorio (Liu et al, 2007; Ravindram et al, 2012; Soldan et al, 2019). Debido a este vació de conocimiento y al gran avance tecnológico de las últimas décadas, se han empezado a implementar el uso de herramientas ómicas, entre ellas la metagenómica y la metatranscriptómica, para el estudio de los microorganismos de manglar.

Cada una de estas herramientas presenta ventajas y desventajas. Por un lado, la metagenómica permite realizar una caracterización taxonómica muy robusta de las comunidades, ya que se generan datos de todas las secuencias de ADN presentes en una muestra, lo que posibilita la reconstrucción de genomas microbianos y robustece la capacidad de asociar secuencias a una

especie o grupo en particular. Además, permite realizar la caracterización funcional de las comunidades, sin embargo, estas funciones son putativas, debido a que no se puede asegurar que los microorganismos expresen estos genes. Es ahí donde entra la metatranscriptómica, la cual, al ser secuenciación masiva de ARN, permite tener certeza de que las funciones encontradas no son putativas y que los microorganismos realmente tienen la capacidad de cumplir con un rol ecológico. No obstante, el transcriptoma de un organismos varía de acuerdo con el momento en el que se tome la muestra, por lo que la caracterización taxonómica de una comunidad, a través del metatranscriptoma, solo refleja una estructura puntual bajo unas condiciones exactas (Kumar & Yadav, 2024). Para este estudio se escogió la metatranscriptómica ya que permitió realizar la caracterización de la comunidad endofítica de microorganismos bajo las condiciones de alta salinidad y marea baja.

Los estudios de metatranscriptómica de manglares son recientes, hasta la fecha únicamente se han realizado 9 estudios en microorganismos de manglar empleando la metodología de metatranscriptómica. En el año 2018 se publicó el primer trabajo en esta área titulado "Metatranscriptomics analysis of mangroves habitats around Mauritius" (Rampadarath et al, 2018). En los últimos dos años las investigaciones en manglares empleando técnicas ómicas han aumentado (Zhang et al, 2023; Wang et al., 2024). Sin embargo, si evaluamos el estudio de metatranscriptómica en manglares en Latinoamérica nos daremos cuenta de que existen únicamente 2 trabajos, uno realizado en Brasil en el océano atlántico titulado "Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils" (Cabral et al, 2018) y otro hecho en la costa caribe colombiana titulado "Metatranscriptomic characterization of the bacterial community of a contaminated mangrove from the Caribbean" (Isaza et al, 2021). Ambos trabajos son importantes como pioneros en el estudio de metatranscriptomas en los manglares de Latinoamérica. Por otro lado, la búsqueda de información muestra claramente que hay un vacío en esta área de investigación en nuestras costas del océano pacífico y muy pocos estudios de endófitos de mangle a través de técnicas ómicas (Bohra et al., 2024). Esto hace importante y necesario el inicio de una línea de investigación que nos permita identificar la diversidad de microorganismos presentes en nuestras costas y las funciones que estos están desempeñando en el ecosistema de manglar.

Objetivo General

Establecer y comparar la actividad transcripcional de cada una de las comunidades de endófitos encontrados en el tejido foliar y radicular de las especies *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans* en la bahía de Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia.

Objetivos específicos

Obtener el metatranscriptoma de cada uno de los tejidos y de las especies de manglar del estudio.

Establecer los grupos taxonómicos de las diferentes comunidades de endófitos, de acuerdo con la expresión de sus genes.

Determinar las funciones génicas activas de las comunidades de microorganismos endófitos de *R. mangle* y *A. germinans,* y comparar la expresión génica por tejido y especie de planta hospedera.

Identificar las funciones génicas que podrían estar asociadas con procesos que tengan un potencial biotecnológico, tales como tolerancia a la salinidad, a xenobióticos, resistencia a metales pesados y metabolismo de nutrientes.

Métodos

Toma de las muestras

La zona de manglar, donde se realizó la toma de muestras, está ubicada en la desembocadura del rio Dagua, en la bahía de Buenaventura, en el suroccidente colombiano (3°52'44,887"N, 77°3'44,577"W) (Figura 1). Este bosque de manglar cuenta con una extensión de 1984,5 Ha y presenta un alto nivel de intervención humana que se evidencia en contaminación por basuras y metales pesados (SIDAP, 2011; Gamboa-García et al., 2020; Bolívar-Anillo et al., 2023). Las muestras se colectaron en junio 14 de 2023. El muestreo se llevó a cabo entre las 8:00 y las 11:00 de la mañana, coincidiendo con el nivel más bajo de la marea en ese día. Se recolectó tejido foliar y radicular de tres individuos de *R. mangle* y 3 individuos de *A. germinans*, separados entre sí por aproximadamente 10 metros. Previo al proceso de colecta, se siguió un protocolo de desinfección del tejido con el objetivo de eliminar los microorganismos de la superficie. Se aplicó hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos, seguido de etanol al 75% por 5 minutos y finalmente se realizó un lavado con agua destilada durante 3 minutos, este proceso se realizó tanto para las raíces como para las hojas. Para la colecta del tejido foliar, se buscaron hojas sin signos de daño mecánico o enfermedades y se tomaron directamente del árbol. En cuanto al tejido radicular, se seleccionó un fragmento de la raíz que estuviera expuesta a la acción de las mareas y se empleó un taladro con brocas estériles para obtener solamente el tejido interno. Todo el tejido colectado se almacenó inmediatamente en nitrógeno líquido y, posteriormente, se transportó al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, donde se almacenó a - 80 °C hasta su procesamiento. Para realizar la caracterización fisicoquímica de la zona de muestreo se tomó una muestra de suelo, la cual fue analizada por el laboratorio AGRILAB (Bogotá, Colombia), y una muestra de agua que fue analizada mediante la sonda multiparamétrica HANNA HI9829 (Anexo 1).

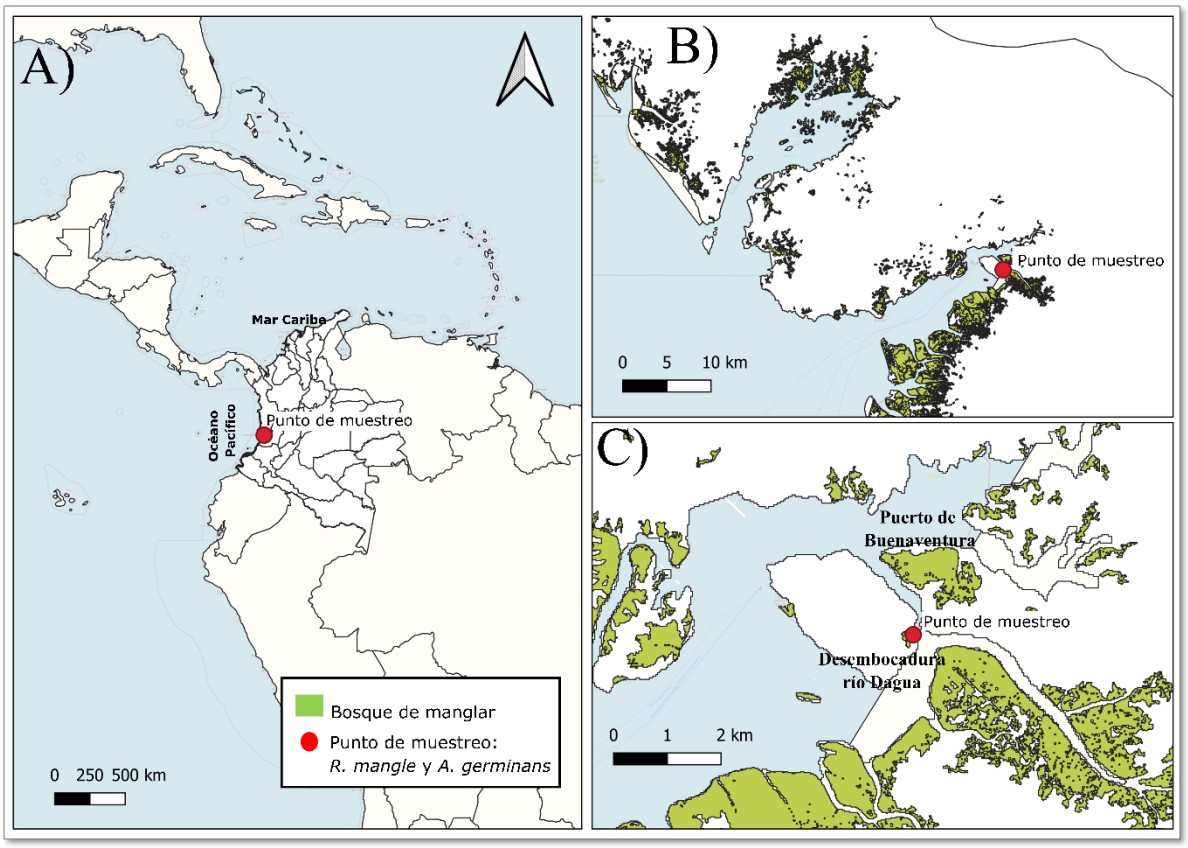


Figura 1. A) Ubicación geográfica del sitio de muestreo, B) Municipio de Buenaventura C) Desembocadura del río Dagua, Bahía de Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia.

Extracción de Ácidos Nucleicos, Identificación Molecular y Secuenciación de ARN total

Las hojas y raíces de las dos especies de mangle fueron pulverizadas manualmente en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido, el tejido homogenizado fue almacenado a -80°C hasta su utilización. Con el fin confirmar la taxonomía de los individuos, se llevó a cabo la extracción del ADN empleando el kit "InviSorb® Spin Plant Mini Kit" de la empresa Invitek, con una modificación en el protocolo: se realizó una segunda maceración después de agregar el buffer de lisis, mediante el uso del DREMEL 3000 y pistilos esterilizados, esto para aumentar la ruptura de paredes celulares y mejorar la eficiencia de la extracción. Posteriormente, fueron amplificados los sistemas atpI-atpH y psbJ-petA, dos regiones intergénicas del cloroplasto. Los cebadores empleados y el perfil térmico fueron descritos por Cerón-Souza y colaboradores (2012). Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Seúl, Corea del Sur), para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron mapeadas contra la base de datos del NCBI para confirmar que los individuos colectados pertenecieran a las especies *Rhizophora mangle* y *Avicennia germinans.*

Una vez confirmada la identificación taxonómica, se procedió a realizar la extracción del ARN total. Para las muestras provenientes de *Rhizophora mangle* se siguió el protocolo de CTAB de White y colaboradores (2008), con modificaciones: Se agregó un volumen de isopropanol en vez de utilizar cloruro de litio 8M, y se realizó la incubación a -20°C en vez de a 4°C. Para las muestras de *Avicennia germinans* se siguió el protocolo de RNAzol (Sigma-Aldrich), el cual consiste en una separación del ARN empleando tiocianato de guanidina y fenol. La cantidad e integridad del ARN obtenido fueron determinadas empleando el fluorómetro Qubit 4. El ARN extraído fue enviado a Macrogen, Seúl, Corea del Sur, donde se realizó la construcción de las librerías utilizando el kit TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero Plus. La secuenciación se realizó mediante la plataforma Illumina Novaseq 6000. Se generaron 11 librerías "paired-end" de 70 millones de lecturas con fragmentos de 100 bases (Tabla 1). Debido a problemas en la construcción de la librería de la raíz de la muestra 3 de *R. mangle* no fue posible obtener el transcriptoma derivado de este tejido. Por lo tanto, finalmente, los análisis bioinformáticos se realizaron con 11 librerías, cinco de *R. mangle* y seis de *A. germinans*.

Análisis Bioinformáticos

Filtros de calidad y contaminación

En total se recibieron 22 archivos con las lecturas crudas de las 11 librerías de RNA total. Inicialmente, las librerías fueron analizadas mediante el programa FastQC (Andrews, 2010), para determinar la calidad de las secuencias. Seguidamente, se empleó Trimmomatic (Bolger et al, 2014), para eliminar todas las lecturas que presentaran un puntaje de Phred menor a 20 y retener únicamente aquellas con buena calidad. Como las librerías producidas eran de ARN total, para conservar solamente las lecturas de microorganismos, fue necesario eliminar todos los transcritos que provinieran de las plantas hospederas. Para esto, se hizo un ensamblaje *de novo* de los genomas de las especies de mangle bajo estudio (Lemos-Lucumi et al., datos no publicados)y utilizando Bowtie2 (Li et al., 2009) y SamTools (Langmead, & Salzberg, 2012) se procedió a hacer la sustracción del transcriptoma de los endófitos. Como paso final en los filtros de calidad y contaminación, se eliminaron todas las lecturas que coincidieran con ARN ribosomal, para esto se empleó el algoritmo SortMeRNA (Kopylova et al, 2012) y la base de datos SILVA (Kopulova et al, 2013) para ARN ribosomal de microorganismos eucariotas y procariotas.

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de diversidad Alfa y Beta

Una vez obtenidas las lecturas limpias y exclusivas de los microorganismos, se realizó la anotación taxonómica empleando el programa Kraken2 (Wood et al., 2019). Para este proceso se descargaron las bases de datos de Arqueas, Bacterias, Hongos, Protozoarios y Virus y se contrastaron con las lecturas de cada librería por separado. Para realizar los cálculos de

diversidad, solo se tuvieron en cuenta aquellas anotaciones que presentaron al menos cinco conteos al analizar todas las muestras. Los resultados fueron exportados al programa R studio, donde fueron analizados con el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2023), y así, calcular diferentes índices de diversidad alfa mediante el algoritmo Vegan (Dixon, 2003). Para la diversidad beta, se empleó un análisis de coordenadas principales (PCoA) con los métodos de distancia de Jaccard y Bray-Curtis, empleando el paquete RAM (Chen et al., 2015). Con el fin de establecer si la diferencia en la taxonomía de los microorganismos era estadísticamente significativa y se asociaba a la planta hospedera, al tejido del que provienen las muestras o a la interacción entre estos dos factores se realizó un análisis PERMANOVA con 9999 permutaciones, mediante el paquete Vegan.

Ensamblaje de los metatranscriptomas

Para el ensamblaje *de novo* de los metatranscriptomas se empleó el algoritmo rnaSPAdes (Bushmanova et al., 2019). Se utilizaron las lecturas provenientes de hojas y raíces, generando un ensamblaje por cada planta hospedera. Posteriormente, la calidad de los ensamblajes se mejoró mediante la opción "covered_cds" del flujo de trabajo MetaGT (Shafranskaya et al, 2022) Esta opción permite aumentar la cobertura de los transcritos a partir de la comparación con las secuencias codificantes (CDS) del metagenoma proveniente de la misma muestra. Los metagenomas fueron proporcionados por Cárdenas-Hernández y colaboradores (Datos no publicados). Posterior al proceso de ensamblaje y la mejora de la cobertura, se utilizó el programa CD-Hit (Fu et al., 2012) para eliminar la redundancia entre transcritos, con los parámetros de 90% de cobertura y 95% de similitud. Finalmente, los metatranscriptomas fueron evaluados mediante RNAquast (Bushmanova et al., 2016) para determinar los parámetros básicos de los ensamblajes como la longitud total, el número de contigs y el N50.

Anotación funcional, enriquecimiento funcional y expresión diferencial

La anotación funcional de los metatranscriptomas se realizó mediante el programa DIAMOND (Buchfink et al. 2014), siguiendo el flujo de trabajo SAMSA2 (Westreich et al., 2018). Para esta anotación se utilizaron las secuencias de proteínas no redundantes (RefSeq) del NCBI pertenecientes a Arqueas, Bacterias, Hongos, Protozoarios y Virus (O'Leary et al. 2016). Seguidamente, mediante el programa DIAMOND, las lecturas de cada librería fueron contrastadas contra los metatranscriptomas anotados para obtener los valores de expresión por cada gen, la anotación se realizó con los parámetros por defecto de DIAMOND.

Los datos de expresión por muestra se exportaron a R, en donde se realizó un filtro por conteos, conservando únicamente aquellos genes que presentaron cinco o más conteos en todas las muestras analizadas. Posteriormente, los conteos fueron normalizados con base en la media geométrica, empleando el paquete DESeq2 (Love et al., 2014). Los valores

normalizados de los conteos de expresión génica fueron empleados en la construcción de un análisis de componentes principales (PCA) para visualizar patrones de agrupación de muestras de acuerdo con la planta hospedera y al tejido del que provienen. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica se realizó un PERMANOVA con 9999 permutaciones, empleando como factores a la especie de planta hospedera, el tejido del que proviene la muestra y la interacción entre ambos factores.

Para realizar el análisis de expresión diferencial, se utilizó la tabla de conteos normalizados y el paquete DESeq2. Se realizaron comparaciones entre tejidos, de forma intra e interespecífica. Se tomaron como significativos a aquellos genes que presentaron un valor-p ajustado menor a 0.05 y un log2Foldchange mayor a 2 o menor a -2. Finalmente, los resultados fueron visualizados mediante volcanoplots, utilizando el paquete EnhanchedVolcano (Blighe et al., 2024) en R. Para cada comparación se seleccionaron los 50 de genes con la expresión diferencial más significativa y con los valores-p ajustados más cercanos a cero. los genes con expresión diferencial fueron visualizados a través de gráficos de barras. Con el fin de determinar cuáles categorías génicas se encontraban enriquecidas, de acuerdo con las comparaciones realizadas, los genes con expresión diferencial significativa fueron anotados contra la base de datos EggNOG, empleando el algoritmo eggNOG-mapper (Cantalapiedra et al., 2021

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de A. germinans y R. mangle

Para determinar el potencial biotecnológico de los microorganismos, se realizó la anotación de cada muestra contra la base de datos PLaBAse (Patz et al., 2021), la cual contiene información de genes relevantes en la interacción planta-microorganismo. Para generar esta anotación se empeló el programa PGPg_finder (Pellegrinetti et al., 2024). Las categorías que se tuvieron en cuenta fueron; resistencia al estrés biótico, resistencia al estrés abiótico, resistencia a metales pesado, metabolismo, resistencia a la salinidad y resistencia a los xenobióticos. Los conteos obtenidos de la anotación fueron estandarizados en escala logarítmica y se visualizaron mediante un mapa de calor, empleando el paquete Pheatmap (Kolde & Kolde) en R. Para profundizar más en el potencial biotecnológico de los microorganismos, y en el aporte de la comunidad de endófitos a la capacidad de la planta de resistir el estrés ambiental, se realizó una búsqueda en el quinto nivel de la base de datos PLaBAse, de las proteínas asociadas a las categorías de resistencia a la salinidad, resistencia al níquel y cobre, degradación de petróleo y naftaleno y resistencia a las altas temperaturas, estas categorías fueron seleccionadas teniendo en cuenta que presentaron los mayores niveles de expresión génica. Los conteos de cada enzima fueron estandarizados en escala logarítmica y visualizados mediante el uso de un mapa de calor en R.

Resultados

Filtros de calidad y contaminación

La secuenciación de las 11 muestras generó entre 69.9 y 97.5M de lecturas por librería, de las cuales se conservaron entre 0.32 y 3.1M, después de aplicar los filtros de calidad y la eliminación de las lecturas de las plantas hospederas (Tabla 1). Se observó que, en las muestras provenientes de raíces, de ambas especies, se conservaron más lecturas (1.75 millones de lecturas +/- 0.8) que en las muestras provenientes de hojas (0.64 millones de lecturas +/- 0.35), con excepción de la muestra RmH1, la cual conservó 1.28 millones de lecturas (Tabla 1).

Tabla 1. Número de lecturas por muestra antes y después de los filtros de contaminación y calidad.

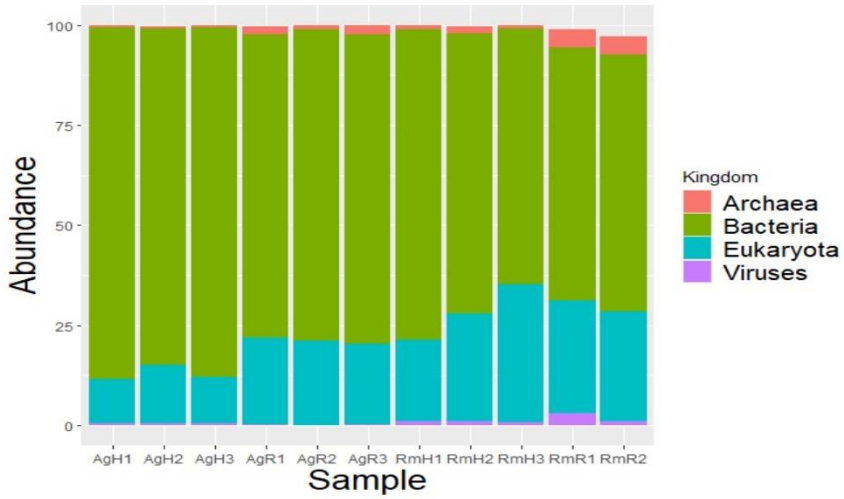
Muestra	Planta hospedera	Tejido	Lecturas crudas	Lecturas procesadas	Porcentaje de lecturas conservadas
AgH1	*Avicennia germinans*	Hoja	80371418	481158	0.60
AgH2	*Avicennia germinans*	Hoja	73465628	329180	0.45
AgH3	*Avicennia germinans*	Hoja	81555078	387596	0.48
AgR1	*Avicennia germinans*	Raíz	69951896	1336828	1.91
AgR2	*Avicennia germinans*	Raíz	74975016	3115154	4.15
AgR3	*Avicennia germinans*	Raíz	77547500	1424818	1.84
RmH1	*Rhizophora mangle*	Hoja	97557880	1280356	1.31
RmH2	*Rhizophora mangle*	Hoja	73187512	697818	0.95
RmH3	*Rhizophora mangle*	Hoja	76745492	655212	0.85
RmR1	*Rhizophora mangle*	Raíz	78466460	1875656	2.39
RmR2	*Rhizophora mangle*	Raíz	79177582	957354	1.21

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de las diversidades Alfa y Beta

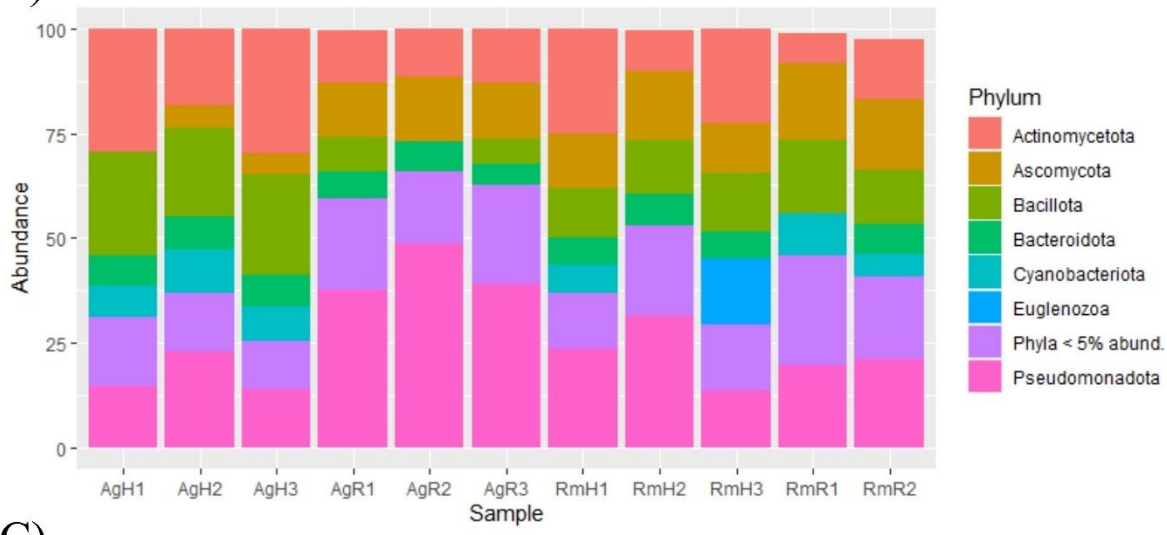
Mediante la anotación taxonómica contra las bases de datos de Arqueas, Bacterias, Hongos, Virus y Protozoarios se lograron identificar un total de 2347 taxa diferentes. Los virus fueron el grupo menos abundante, representando entre 0.1 y 3% de los transcritos, seguido por las arqueas que tenían una expresión relativa entre el 0.5 y 4% entre todas las muestras. Los eucariotas fueron el segundo grupo con mayor expresión, representando entre 12 y 32% de las secuencias y, finalmente, las bacterias fueron el taxon con mayor representación en todas las muestras con un porcentaje de 75 a 88% (Figura 2A). A nivel de phylum el grupo más abundante fue Pseudomonadota, representando casi el 50% de las secuencias encontradas en las raíces de *A. germinans*, seguido por el phylum Bacillota, el cual fue el grupo con mayor abundancia relativa en las hojas de *A. germinans*. El phylum Ascomycota fue el grupo de eucariotas con mayor expresión relativa entre todas las muestras (Figura 2B). El género *Mycobacterium* fue el que presentó los mayores niveles de expresión génica relativa, y fue

especialmente abundante en las hojas de ambas especies de plantas hospederas (Figura 2C), mientras que, el género *Clostridium* mostró una alta expresión relativa en las hojas de *A. germinans* y los géneros *Palleronia* y *Paracoccus* se encontraron mayormente activos en las muestras provenientes de raíces de *A. germinans* (Figura 2C).

A)


100
75
50
25
0
Abundance
AgH1 AgH2 AgH3 AgR1 AgR2 AgR3 RmH1 RmH2 RmH3 RmR1 RmR2
Sample
Kingdom
Archaea
Bacteria
Eukaryota
Viruses

B)


100
75
50
25
0
Abundance
AgH1 AgH2 AgH3 AgR1 AgR2 AgR3 RmH1 RmH2 RmH3 RmR1 RmR2
Sample
Phylum
Actinomycetota
Ascomycota
Bacillota
Bacteroidota
Cyanobacteriota
Euglenozoa
Phyla < 5% abund.
Pseudomonadota

C)

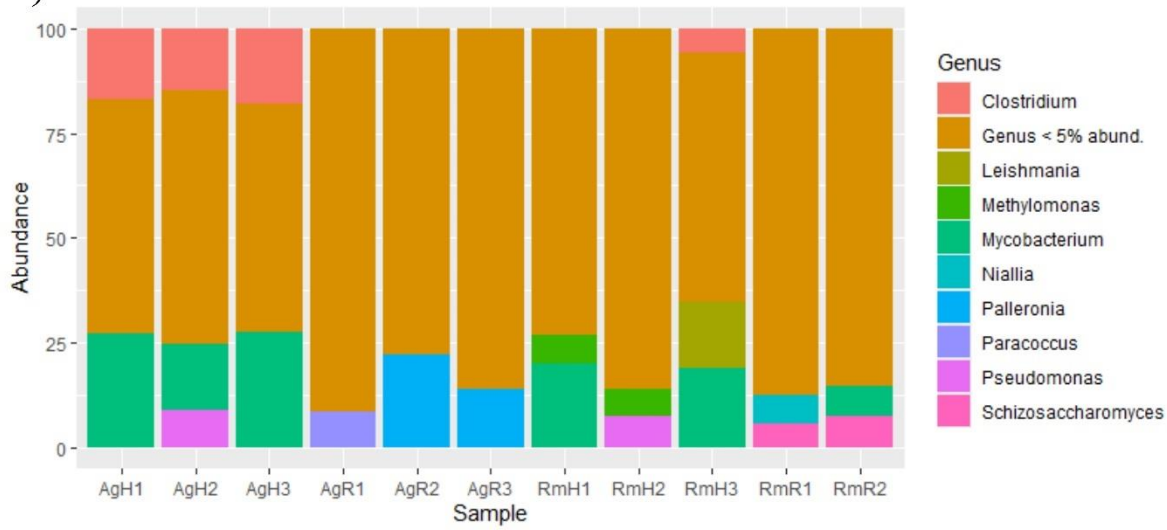

100
75
50
25
0
Abundance
AgH1 AgH2 AgH3 AgR1 AgR2 AgR3 RmH1 RmH2 RmH3 RmR1 RmR2
Sample
Genus
Clostridium
Genus < 5% abund.
Leishmania
Methylomonas
Mycobacterium
Niallia
Palleronia
Paracoccus
Pseudomonas
Schizosaccharomyces

Figura 2. Abundancia relativa de los grupos de microorganismos identificados en las 11 muestras, tanto de hojas como de raíces. A) Dominio, B) Phylum, C) Género.

Los cálculos de la diversidad alfa observada, Chao1, ACE, Shannon, Simpson y Fisher evidenciaron que las muestras asociadas a raíces presentaron una mayor diversidad en comparación con las muestras provenientes de hojas (Figura 3A). En cuanto a la diversidad beta, el PCoA mostró una clara separación por especie de planta hospedera y tejido, tanto por el método de distancia de Bray-Curtis (Figura 3B) como por el método de distancia de Jaccard (Anexo 2). El método de Bray-Curtis permitió una explicación de la varianza de 74%, mientras que el método de Jaccard explicó un 60.4% de la varianza en sus dos primeras componentes. Además, mediante el análisis PERMANOVA, se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a la planta hospedera (Valor-p: 0.0001, F:6.9862), al tejido del que proviene la muestra (Valor-p: 0.0001, F: 6.3158) y a la interacción de ambos factores (Valor-p: 0.004, F: 3.4255), demostrando que los factores analizados en este estudio tienen un efecto significativo sobre la expresión génica de la comunidad de microorganismos.

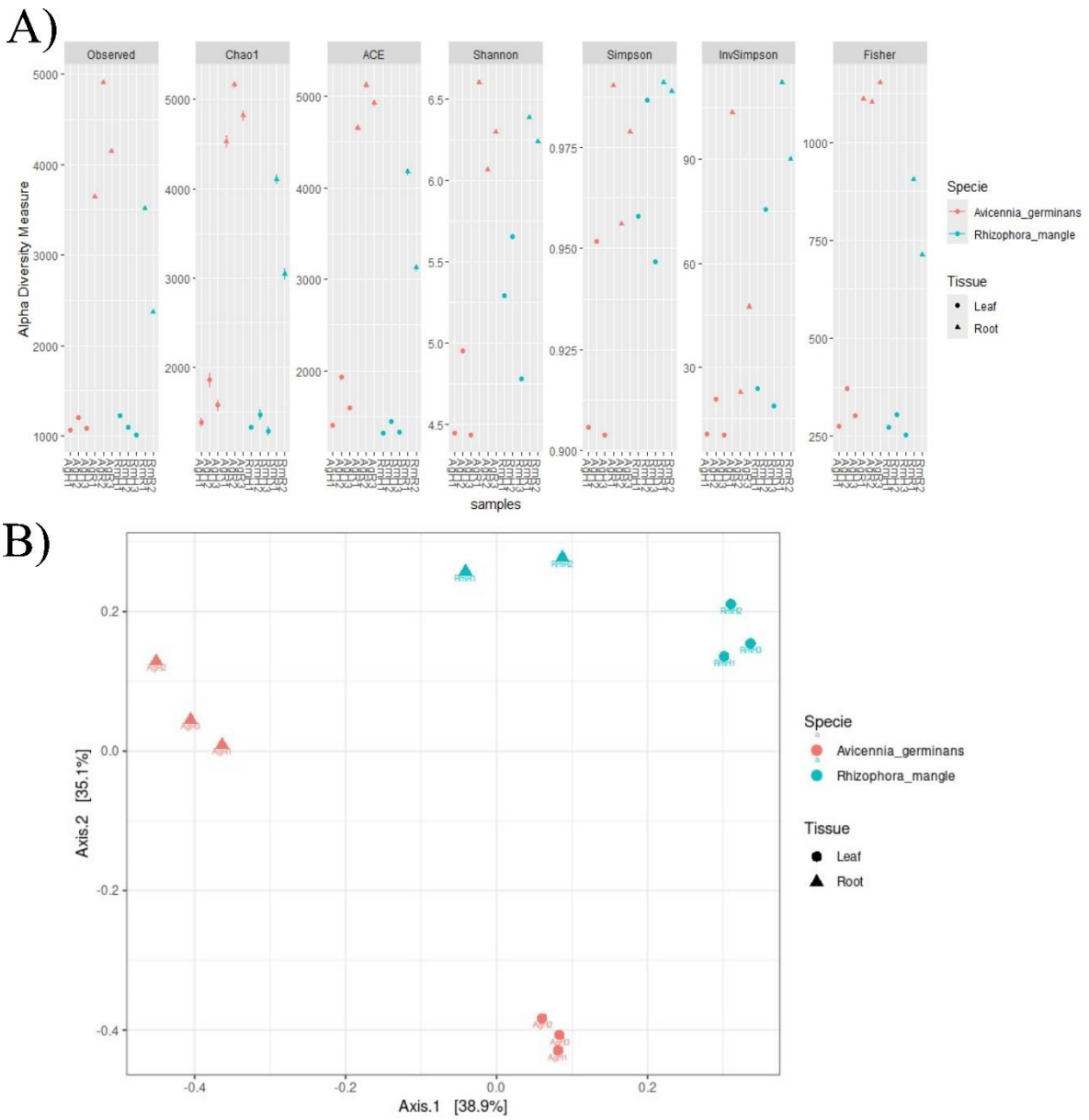


Figura 3. Análisis de diversidad taxonómica de las 11 muestras. A) Índices de diversidad alfa, B) Análisis de coordenadas principales construido mediante el método de distancias de Bray-Curtis.

Ensamblaje de los metatranscriptomas

Para el ensamblaje del metatranscriptoma de *A. germinans* se trabajó con 7.04 millones de lecturas en total, mientras que para el ensamblaje de *R. mangle* se utilizaron 5.46 millones de lecturas (Tabla 1). El ensamblaje de *A. germinans* generó un total de 17052 contigs, con un N50 de 876 (Anexo 3), por otro lado, el ensamblaje del metatranscriptoma de *R. mangle* se conformó por 7517 contigs y un N50 de 711 (Anexo 3).

Anotación funcional

La anotación funcional de los metatranscriptomas permitió la identificación de 10204 funciones génicas activas en las 11 muestras (Anexo 4). Para las 6 muestras provenientes de *A. germinans* se anotaron 6009 transcritos (Anexo 4), mientras que para las 5 muestras de *R. mangle* se identificaron 4810 funciones génicas activas (Anexo 4). A nivel de tejido, independientemente de la especie de planta hospedera, se encontraron 3953 genes activos en las 6 muestras asociadas a hojas (Anexo 4) y 9117 en las 5 muestras provenientes de raíces (Anexo 4). Entre los genes con mayor actividad transcripcional se encontraron las subunidades 1, 4 y 7 de la NADH deshidrogenasa además de varias subunidades de la enzima citocromo oxidasa, la serina hidroximetil transferasa, la glutamina sintetasa, catalasas y enolasas (Anexo 4). El PCA de las funciones génicas activas presentó una explicación de la variación de 89% a partir de sus dos primeras componentes y, además, mostró una separación de las funciones activas asociada a la especie de planta hospedera y al tejido del que proviene la muestra (Figura 4). Este hallazgo es apoyado por los resultados del PERMANOVA, los cuales reflejan diferencias estadísticamente significativas asociadas a la planta hospedera (Valor-p:0.0001, F:49.2062), al tejido del que proviene la muestra (Valor-p:0.0032, F:10.9228) y a la interacción de ambos factores (Valor-p:0.0169, F:6.1929).

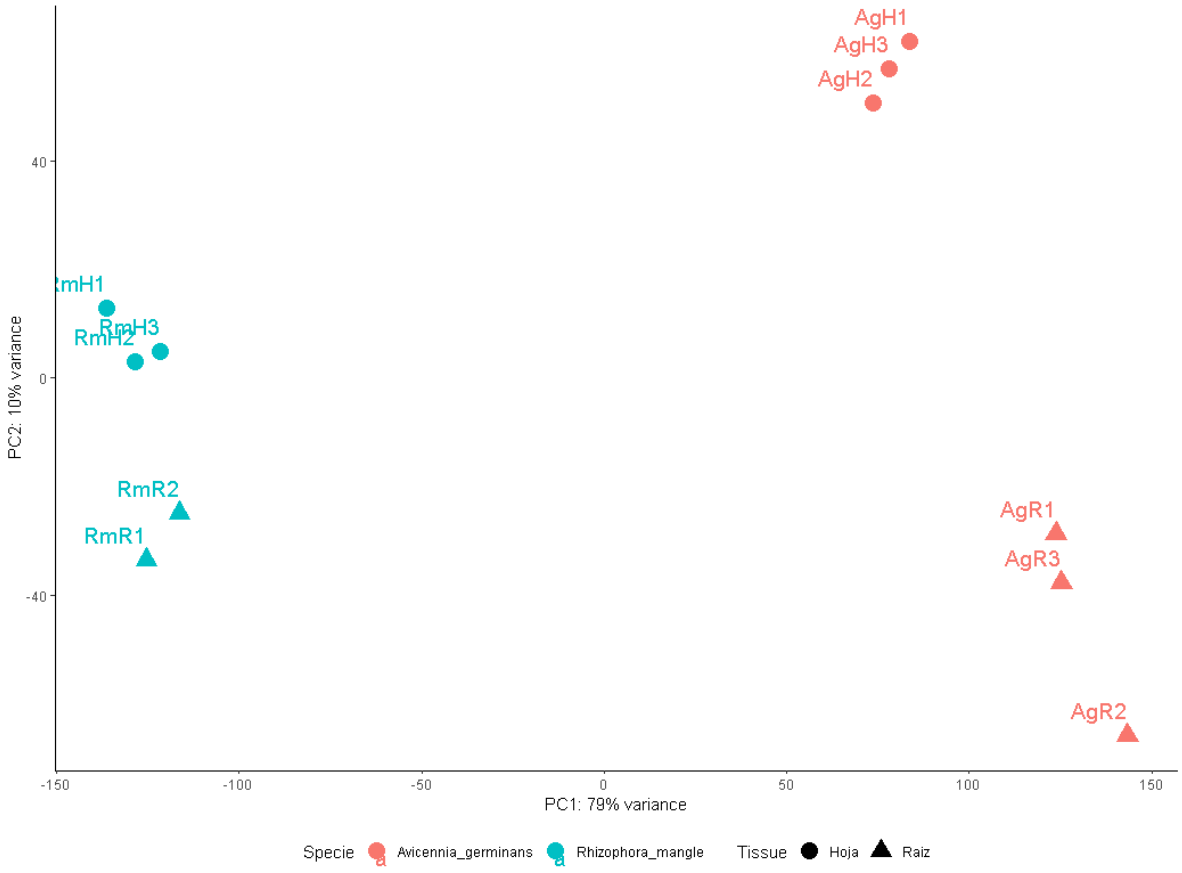


Figura 4. Análisis de componentes principales de las anotaciones funcionales basadas en el RefSeq del NCBI.

Expresión diferencial y enriquecimiento funcional

Comparaciones intraespecíficas

Para la especie *Avicennia germinans*, se encontraron, en total, 202 genes con expresión diferencial significativa al comparar los metataranscriptomas de hojas contra los de raíces (Figura 5A). 22 de los genes, se encontraron sobreexpresados en las hojas, mientras que 180 se encontraron sobreexpresados en las raíces. Entre los genes con mayor significancia estadística, expresados en las hojas de *A. germinans,* se encontraban la glutamina y glutamato sintetasa, la glicina deshidrogenasa, la fructosa bifosfatasa y la fructosa bifosfato aldolasa, mientras que, para las muestras de raíz, los genes con mayor significancia fueron la ATP sintasa subunidad B, la NADH deshidrogenasa, el citocromo c oxidasa y el apocitocromo b (Figura 6A). El enriquecimiento funcional contra la base de datos EggNOG mostró como categoría más expresada al transporte y metabolismo de aminoácidos en las hojas de *A. germinans* (Figura 6B), mientras que en las muestras asociadas a raíces la categoría más enriquecida fue la producción y conservación de energía (Figura 6C).

Por otro lado, Al comparar los metatranscriptomas de hojas y raíces de *Rhizophora mangle* se hallaron 52 genes con expresión diferencial significativa, de los cuales 4 se encontraban sobreexpresados en hojas y 48 en raíces (Figura 5B). Para las hojas, los genes con mayor significancia estadística fueron la glutamina sintetasa 1 y 2, mientras que para las raíces se encontraron genes como la transcriptasa inversa, las subunidades 4 y 5 de la NADH deshidrogenasa, y varias subunidades de la enzima citocromo c oxidasa (Figura 7A). El análisis contra la base de datos EggNOG mostró que, el transporte y metabolismo de aminoácidos se encuentra enriquecido en las hojas (Figura 7B), mientras que en las raíces se encuentran más activas las categorías relacionadas con el citoesqueleto y la producción y conservación de energía (Figura 7C).

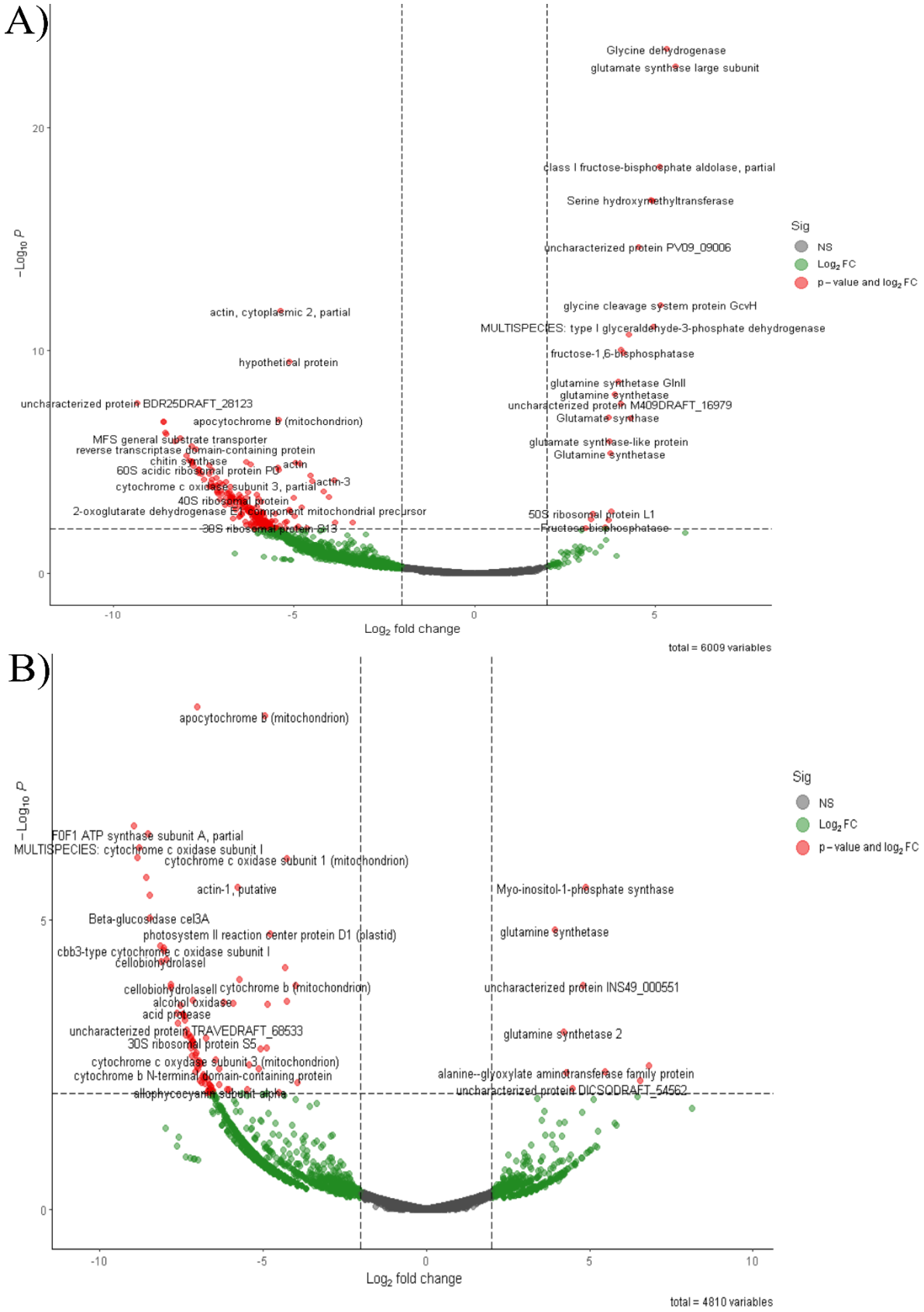
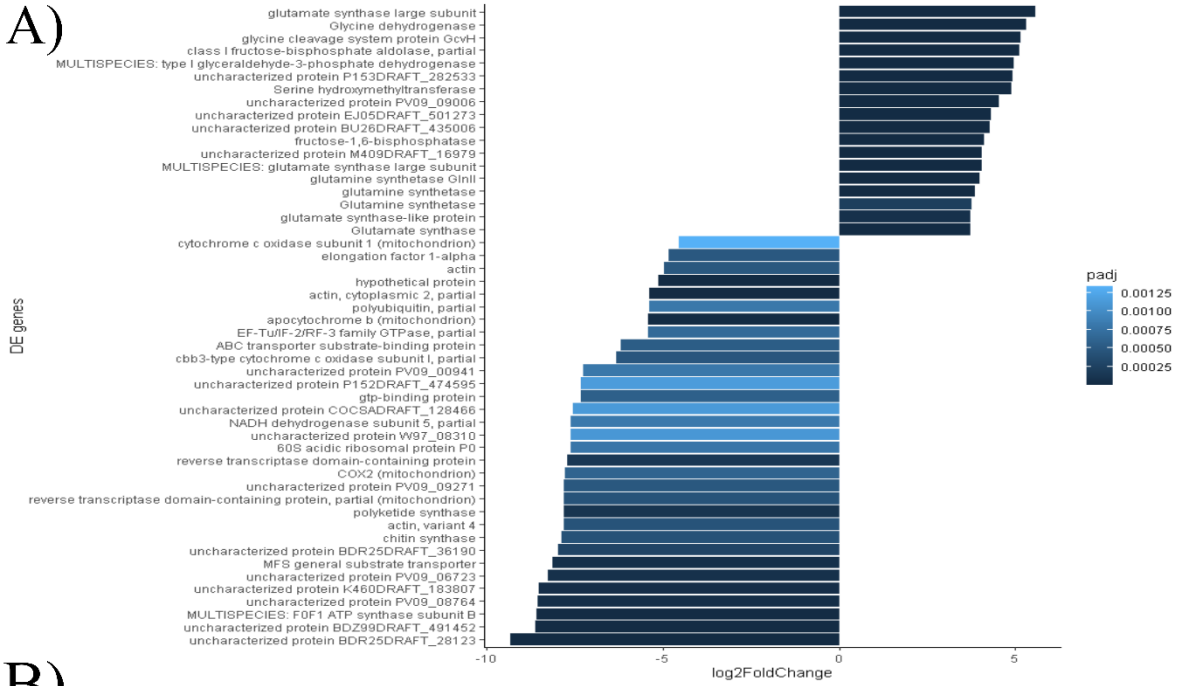
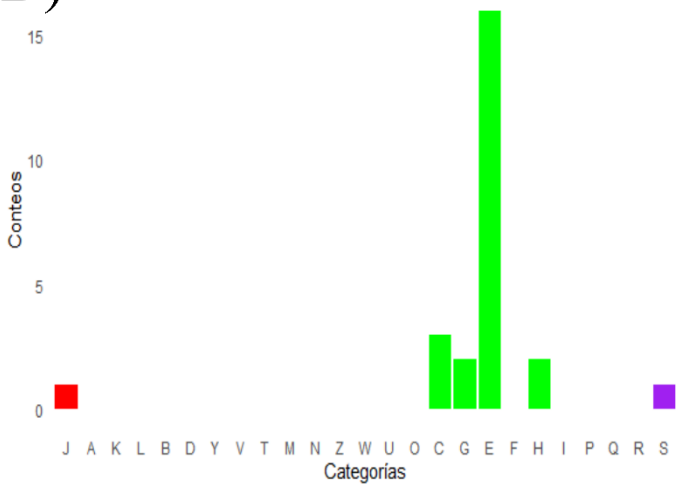

A)
Glycine dehydrogenase
glutamate synthase large subunit
class I fructose-bisphosphate aldolase, partial
Serine hydroxymethyltransferase
uncharacterized protein PV09_09006
glycine cleavage system protein GcvH
MULTISPECIES: type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
fructose-1,6-bisphosphatase
glutamine synthetase GlnII
glutamine synthetase
uncharacterized protein M409DRAFT_16979
Glutamate synthase
glutamate synthase-like protein
Glutamine synthetase
50S ribosomal protein L1
Fructose-bisphosphatase
actin, cytoplasmic 2, partial
hypothetical protein
uncharacterized protein BDR25DRAFT_28123
apocytochrome b (mitochondrion)
MFS general substrate transporter
reverse transcriptase domain-containing protein
chitin synthase
actin
60S acidic ribosomal protein P0
actin-3
cytochrome c oxidase subunit 3, partial
40S ribosomal protein
2-oxoglutarate dehydrogenase E3 component mitochondrial precursor
39S ribosomal protein S13
Sig
NS
Log2 FC
p – value and log2 FC
– Log10 P
Log2 fold change
total = 6009 variables
B)
apocytochrome b (mitochondrion)
F0F1 ATP synthase subunit A, partial
MULTISPECIES: cytochrome c oxidase subunit I
cytochrome c oxidase subunit 1 (mitochondrion)
actin-1, putative
Myo-inositol-1-phosphate synthase
Beta-glucosidase cel3A
photosystem II reaction center protein D1 (plastid)
glutamine synthetase
cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I
cellobiohydrolasel
cellobiohydrolaseII cytochrome b (mitochondrion)
uncharacterized protein INS49_000551
alcohol oxidase
acid protease
uncharacterized protein TRAVEDRAFT_68533
glutamine synthetase 2
30S ribosomal protein S5
cytochrome c oxydase subunit 3 (mitochondrion)
alanine--glyoxylate aminotransferase family protein
cytochrome b N-terminal domain-containing protein
uncharacterized protein DICSQDRAFT_54562
allophycocyanin subunit alpha
Sig
NS
Log2 FC
p – value and log2 FC
– Log10 P
Log2 fold change
total = 4810 variables

Figura 5. Volcanoplots de las comparaciones de expresión génica entre tejidos de plantas hospederas. A la derecha de las figuras se encuentran los genes sobreexpresados en hojas, y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en Raíces. A) Hojas de *Avicennia germinans* vs Raíces de *Avicennia germinans*, B) Hojas de *Rhizophora mangle* vs Raíces de *Rhizophora mangle*. Gris: No significativo. Verde: Cumple con tener más de 2 o menos de -2 en el valor de Log2FoldChange. Rojo: Cumple con el criterio de Log2FoldChange y con un valor-p ajustado menor a 0.05.

A)



B)



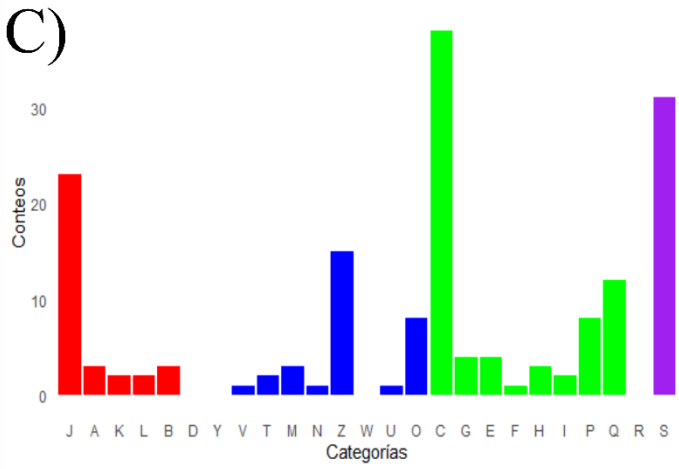
ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

[J] Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
[A] Procesamiento y modificación del ARN
[K] Transcripción
[L] Replicación, recombinación y reparación
[B] Estructura y dinámica de la cromatina

PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN

[D] Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica
[Y] Estructura nuclear
[V] Mecanismos de defensa
[T] Mecanismos de transducción de señales
[M] Biogénesis de la pared celular/membrana
[N] Motilidad celular
[Z] Citoesqueleto
[W] Estructuras extracelulares
[U] Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
[O] Modificación postraduccional, recambio proteico, chaperonas

C)



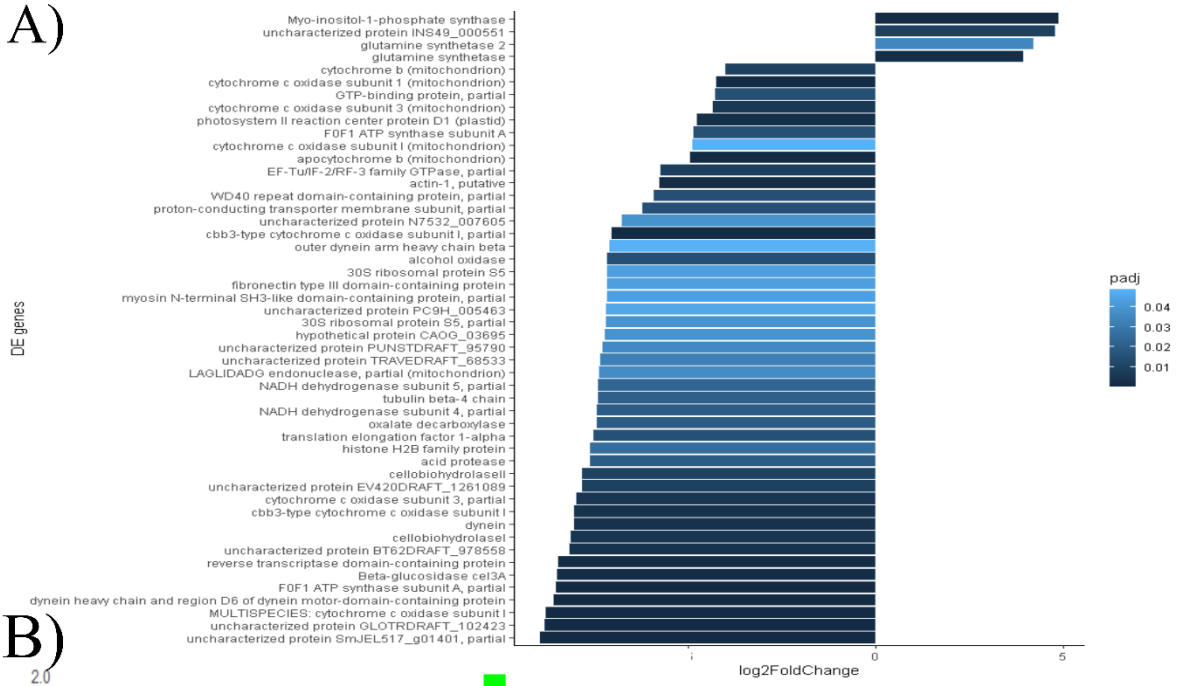
METABOLISMO

[C] Producción y conversión de energía
[G] Transporte y metabolismo de carbohidratos
[E] Transporte y metabolismo de aminoácidos
[F] Transporte y metabolismo de nucleótidos
[H] Transporte y metabolismo de coenzimas
[I] Transporte y metabolismo de lípidos
[P] Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
[Q] Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios

POCO CARACTERIZADOS

[R] Sólo predicción de función general
[S] Función desconocida

Figura 6. Expresión diferencial y enriquecimiento funcional de la comparación entre hojas y raíces de *Avicennia germinans* A) Gráfico de los 50 genes con mayor significancia estadística, a la derecha de la figura se encuentran los genes sobreexpresados en las hojas y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en las raíces, B) Enriquecimiento funcional de los 22 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de hojas de *A. germinans*, C) Enriquecimiento funcional de los 180 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de raíces de *A. germinans*.



ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN
[J] Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
[A] Procesamiento y modificación del ARN
[K] Transcripción
[L] Replicación, recombinación y reparación
[B] Estructura y dinámica de la cromatina

PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN
[D] Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica
[Y] Estructura nuclear
[V] Mecanismos de defensa
[T] Mecanismos de transducción de señales
[M] Biogénesis de la pared celular/membrana
[N] Motilidad celular
[Z] Citoesqueleto
[W] Estructuras extracelulares
[U] Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
[O] Modificación postraduccional, recambio proteico, chaperonas

METABOLISMO
[C] Producción y conversión de energía
[G] Transporte y metabolismo de carbohidratos
[E] Transporte y metabolismo de aminoácidos
[F] Transporte y metabolismo de nucleótidos
[H] Transporte y metabolismo de coenzimas
[I] Transporte y metabolismo de lípidos
[P] Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
[Q] Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios

POCO CARACTERIZADOS
[R] Sólo predicción de función general
[S] Función desconocida

Figura 7. Expresión diferencial y enriquecimiento funcional de la comparación entre hojas y raíces de *Rhizophora mangle* A) Gráfico de los 50 genes con mayor significancia estadística, a la derecha de la figura se encuentran los genes sobreexpresados en las hojas y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en las raíces, B) Enriquecimiento funcional de los 4 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de hojas de *R. mangle*, C) Enriquecimiento funcional de los 48 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de raíces de *R. mangle*.

Comparaciones interespecíficas

La comparación entre hojas de *A. germinas* contra hojas de *R. mangle* mostró que, de los 1560 genes con expresión diferencial significativa, 885 se encontraron sobreexpresados en *A. germinans* y 675 en *R. mangle* (Figura 5A). Entre los genes con mayor significancia estadística en las hojas de *A. germinans* se encontraron la enzima málica dependiente de NAD, la glutamina sintetasa y la sintetasa de glucógeno, mientras que en las hojas de *R. mangle* los genes más significativos fueron la serina hidroximetil transferasa, la enzima superóxido dismutasa, la glutamato y glutamina sintasa, la fructosa 1,6 bifosfatasa, triosa fosfato isomerasa y la malato deshidrogenasa (Figura 6A). La comparación contra la base de datos eggNOG evidenció que, la categoría más enriquecida en el metatranscriptoma de las hojas de *A. germinans* y *R. mangle* fue la modificación postraduccional, recambio proteico y chaperonas (Figura 6B y 6C).

Para la comparación entre raíces, se observaron 588 genes sobreexpresados significativamente en *A. germinans* y 1219 genes sobreexpresados en *R. mangle* (Figura 5B). El gen de la actina fue el de mayor significancia entre los genes sobreexpresado en las raíces de *A. germinans*, mientras que para las muestras de raíces de *R. mangle* se encontró a la enzima málica dependiente de NAD, sintasa de glucógeno, NADH reductasa, proteinasa aspártica y la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (Figura 7A). En cuanto al enriquecimiento funcional, se identificaron como categorías principales a la traducción, estructura ribosómica y biogénesis y la modificación postraduccional en las raíces de *A. germinans* y *R. mangle* (Figura 7B y 7C).

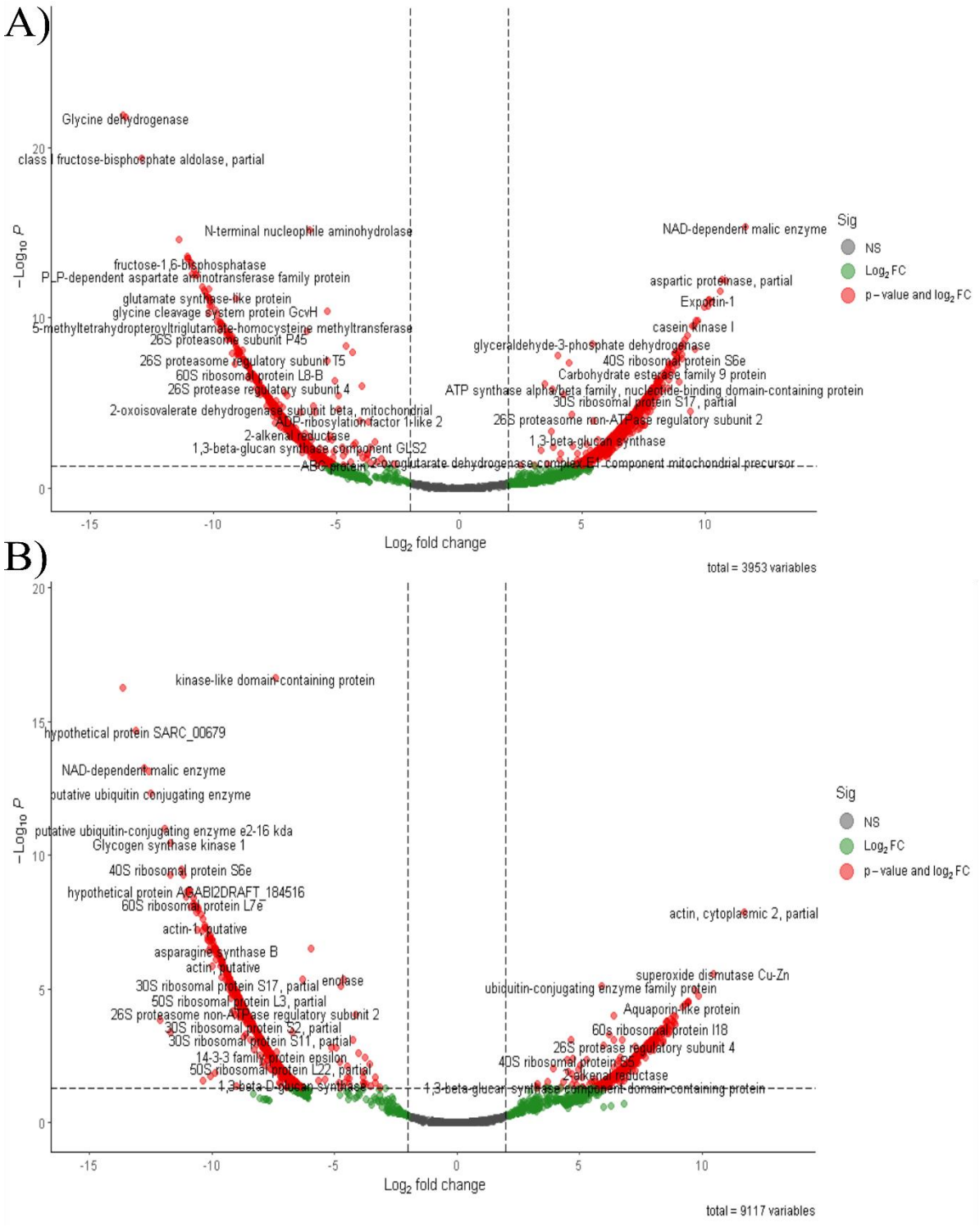
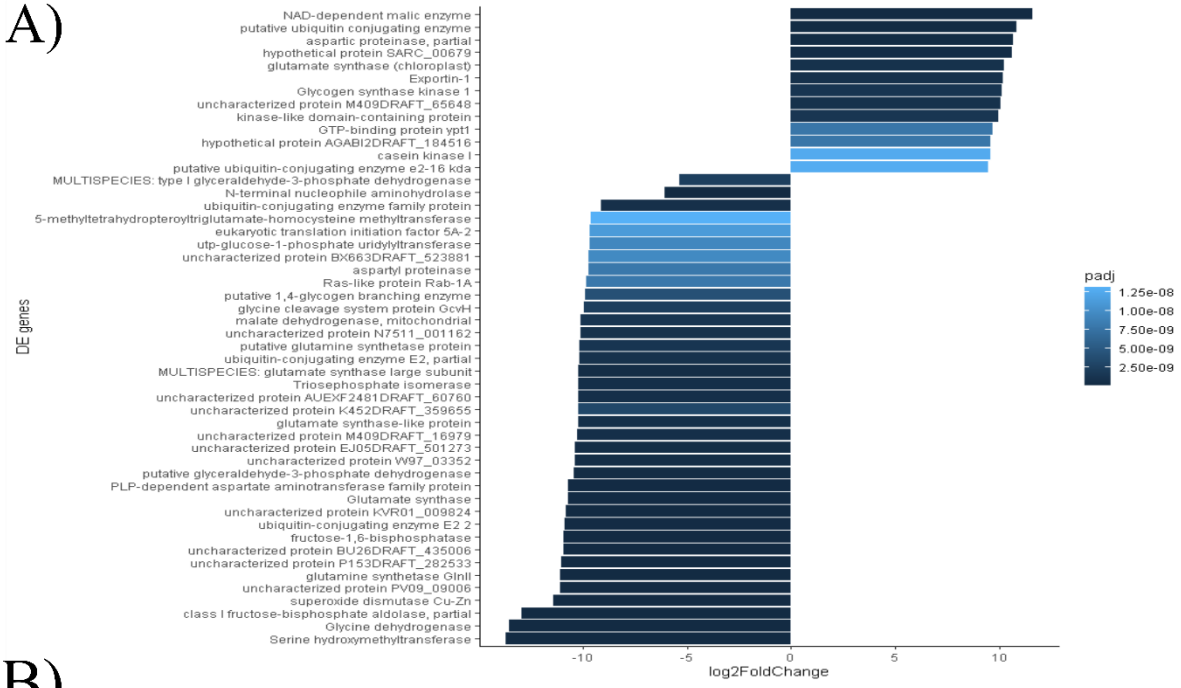


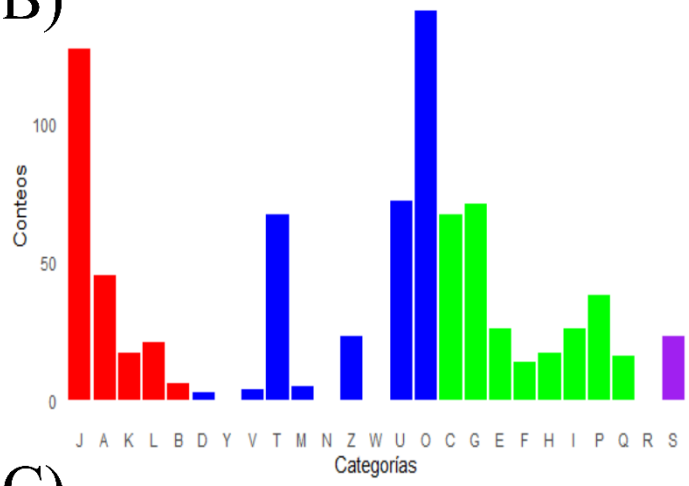
Figura 8. Volcanoplots de las comparaciones de expresión génica entre especies de plantas hospederas. A la derecha de las figuras se encuentran los genes sobreexpresados en *Avicennia germinas*, y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en *Rhizophora mangle*. A) Hojas de *Avicennia germinans* vs Hojas de *Rhizophora mangle*, B) Raíces de *Avicennia*

germinans vs Raíces de *Rhizophora mangle*. Gris: No significativo. Verde: Cumple con tener más de 2 o menos de -2 en el valor de Log2FoldChange. Rojo: Cumple con el criterio de Log2FoldChange y con un valor-p ajustado menor a 0.05.

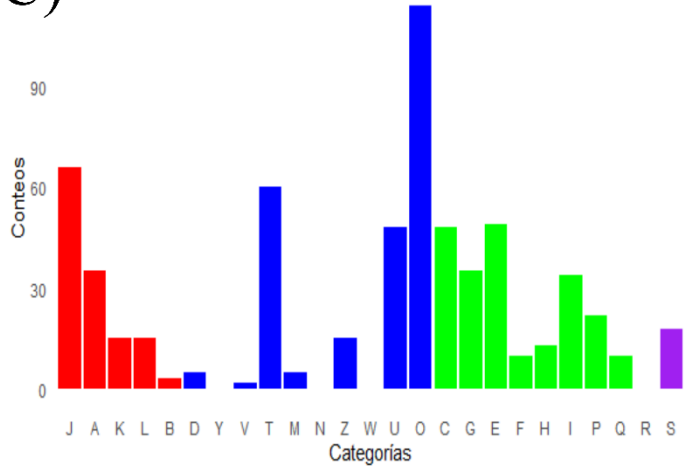
A)



B)



C)



ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

[J] Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
[A] Procesamiento y modificación del ARN
[K] Transcripción
[L] Replicación, recombinación y reparación
[B] Estructura y dinámica de la cromatina

PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN

[D] Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica
[Y] Estructura nuclear
[V] Mecanismos de defensa
[T] Mecanismos de transducción de señales
[M] Biogénesis de la pared celular/membrana
[N] Motilidad celular
[Z] Citoesqueleto
[W] Estructuras extracelulares
[U] Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
[O] Modificación postraduccional, recambio proteico, chaperonas

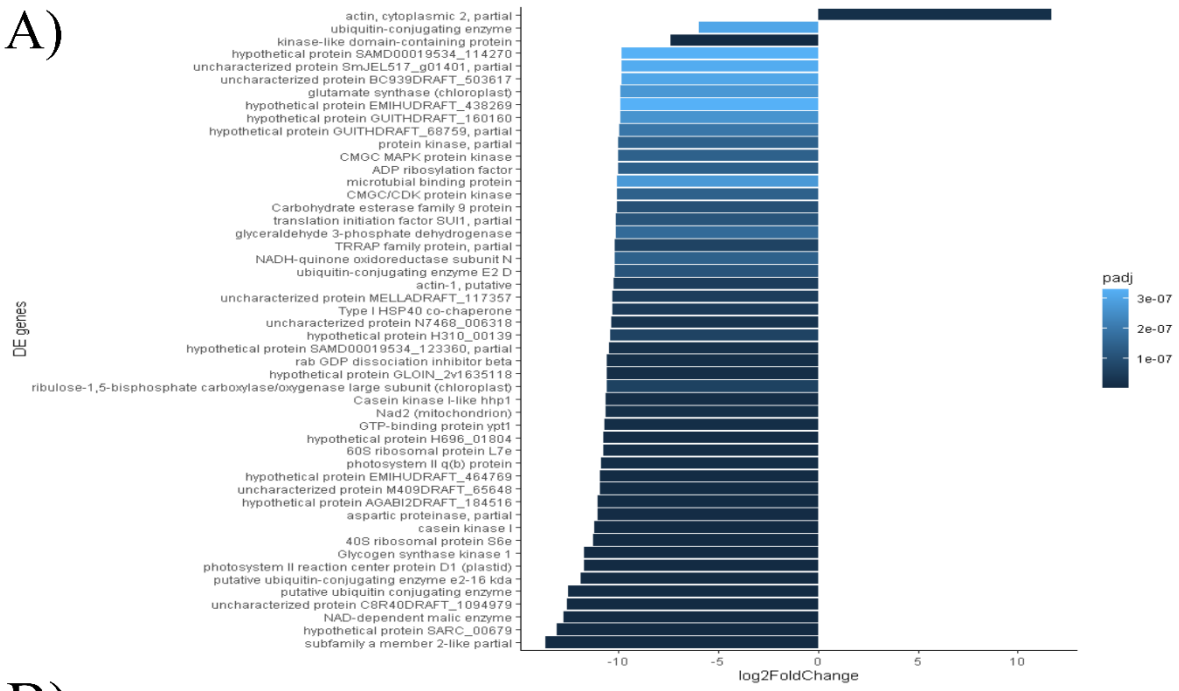
METABOLISMO

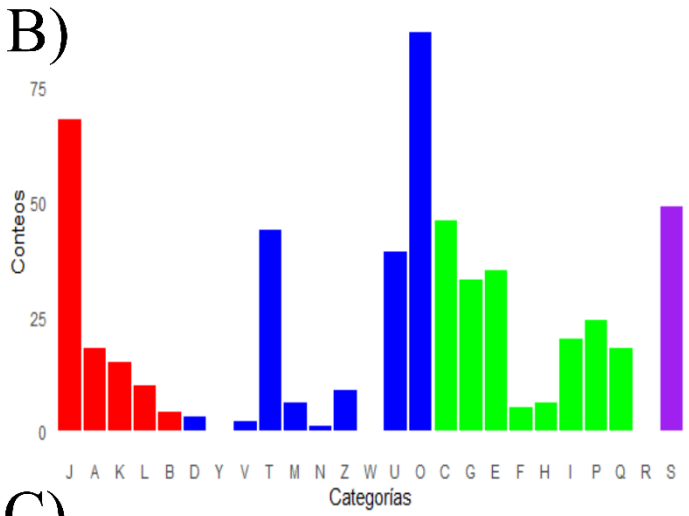
[C] Producción y conversión de energía
[G] Transporte y metabolismo de carbohidratos
[E] Transporte y metabolismo de aminoácidos
[F] Transporte y metabolismo de nucleótidos
[H] Transporte y metabolismo de coenzimas
[I] Transporte y metabolismo de lípidos
[P] Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
[Q] Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios

POCO CARACTERIZADOS

[R] Sólo predicción de función general
[S] Función desconocida

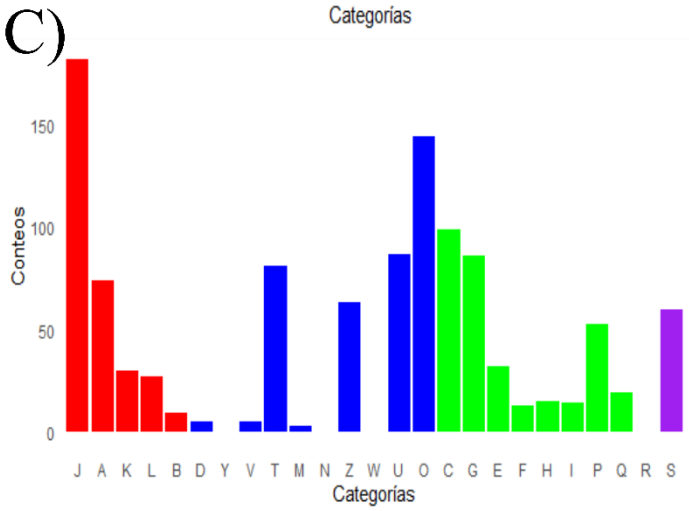
Figura 9. Expresión diferencial y enriquecimiento funcional de la comparación interespecífica de los metatranscriptomas de hojas. A) Gráfico de los 50 genes con mayor significancia estadística, a la derecha de la figura se encuentran los genes sobreexpresados en las hojas de *A. germinans* y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en las hojas de *R. mangle*, B) Enriquecimiento funcional de los 885 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de hojas de *A. germinans*, C) Enriquecimiento funcional de los 675 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de hojas de *R. mangle*.





ALMACENAMIENTO Y PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN
[J] Traducción, estructura ribosómica y biogénesis
[A] Procesamiento y modificación del ARN
[K] Transcripción
[L] Replicación, recombinación y reparación
[B] Estructura y dinámica de la cromatina

PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACIÓN
[D] Control del ciclo celular, división celular, partición cromosómica
[Y] Estructura nuclear
[V] Mecanismos de defensa
[T] Mecanismos de transducción de señales
[M] Biogénesis de la pared celular/membrana
[N] Motilidad celular
[Z] Citoesqueleto
[W] Estructuras extracelulares
[U] Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
[O] Modificación postraduccional, recambio proteico, chaperonas



METABOLISMO
[C] Producción y conversión de energía
[G] Transporte y metabolismo de carbohidratos
[E] Transporte y metabolismo de aminoácidos
[F] Transporte y metabolismo de nucleótidos
[H] Transporte y metabolismo de coenzimas
[I] Transporte y metabolismo de lípidos
[P] Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
[Q] Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios

POCO CARACTERIZADOS
[R] Sólo predicción de función general
[S] Función desconocida

Figura 10. Expresión diferencial y enriquecimiento funcional de la comparación interespecífica de los metatranscriptomas de raíces. A) Gráfico de los 50 genes con mayor significancia estadística, a la derecha de la figura se encuentran los genes sobreexpresados en las raíces de *A. germinans* y a la izquierda se encuentran los genes sobreexpresados en las raíces *R. mangle*, B) Enriquecimiento funcional de los 588 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de raíces de *A. germinans*, C) Enriquecimiento funcional de los 1219 genes con sobreexpresión significativa en el metatranscriptoma de raíces de *R. mangle*.

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de *A. germinans* y *R. mangle*

La anotación contra la base de datos PLaBAse mostró que las comunidades de microorganismos de *A.germinans* y *R. mangle* presentan una alta expresión de genes relacionados con el metabolismo básico, la resistencia al estrés biótico y abiótico, la degradación de xenobióticos, la resistencia a los metales pesados y la resistencia al estrés por salinidad. Se observa un patrón general de expresión, con genes que se encuentran activos en los microorganismos endófitos de las raíces, pero, prácticamente, inactivos en las hojas (Figura 11). Dentro del grupo de genes de resistencia al estrés abiótico, la categoría más abundante y activa en las raíces fue la de la tolerancia a las altas temperaturas. Para el grupo de metales pesados, las categorías con mayor actividad transcripcional fueron las de resistencia al cobre, el níquel y el zinc. Todas las categorías relacionadas con el metabolismo de fósforo, azufre, nitrógeno y carbono se encontraron presentes y activas, siendo, sin embargo, la categoría metabólica con mayor actividad transcripcional la adquisición y homeóstasis del hierro. Igualmente, se encontraron 17 categorías funcionales relacionadas con la degradación de diferentes xenobióticos, apareciendo las categorías de degradación de naftaleno e hidrocarburos, como las más activas. Finalmente, la categoría con una alta abundancia y expresión fue la relacionada con la neutralización del estrés salino, presentando un patrón de expresión génica contrario al observado para las demás categorías, teniendo una mayor actividad en las hojas que en las raíces (Figura 11).

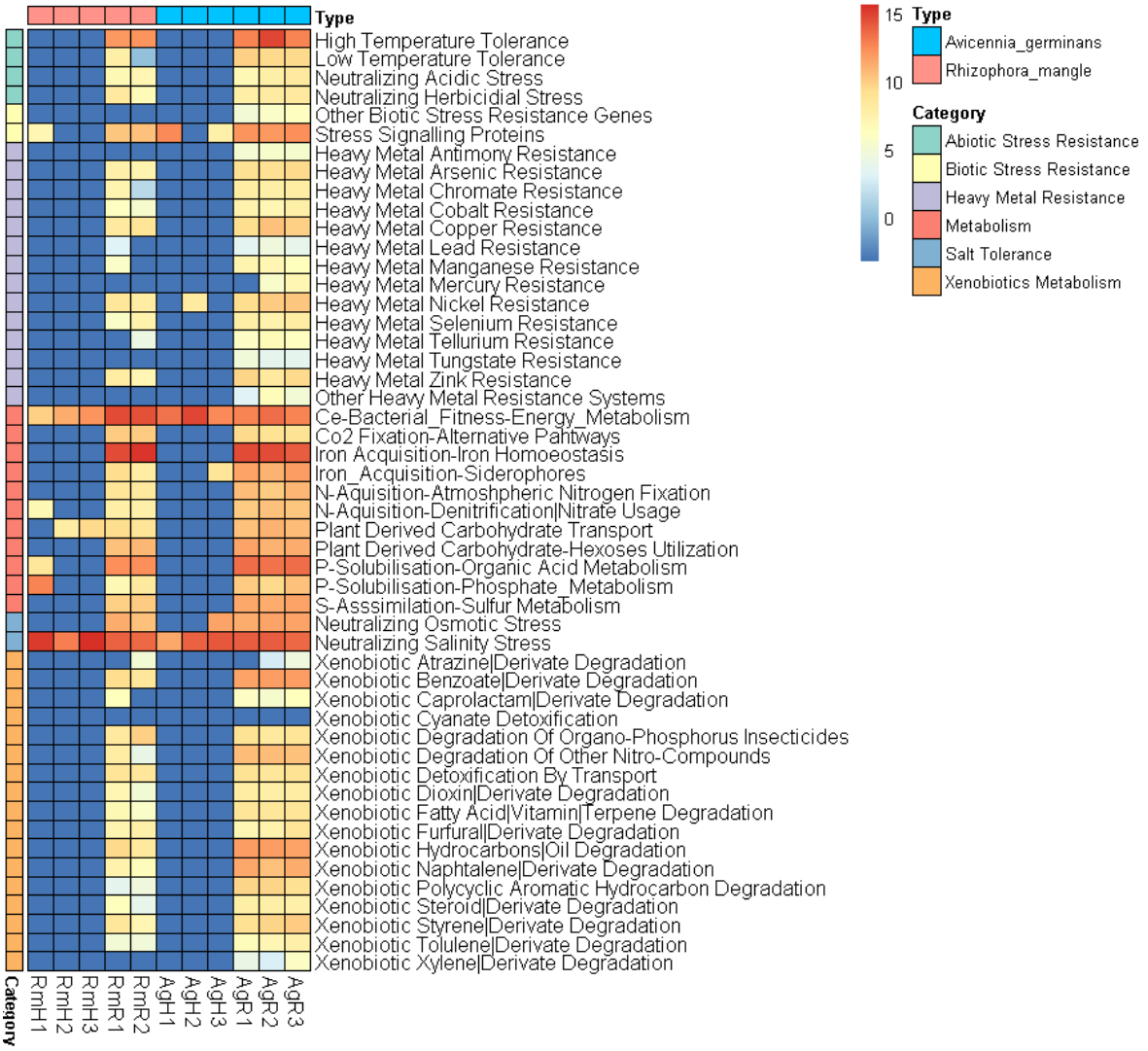


Figura 11. Heatmap de las funciones relevantes en la interacción planta-endófito seleccionadas de la base de datos PLaBAse

Al analizar la anotación funcional contra el nivel cinco de la base de datos PLaBAse se encontró que, las proteínas transportadoras de Cu+, oxidasa de cobre y transportadoras de péptido/níquel fueron las más activas, con relación a la resistencia a metales pesados (Figura 12). Para la degradación de hidrocarburos, se observó que las enzimas más expresadas, tanto para *A. germinans* como para *R. mangle*, fueron la alcohol deshidrogenasa, la metanol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa, además de las subunidades alfa y beta de la enzima mono oxigenasa de alquenos (Figura 12). En cuanto a la respuesta al estrés generado por altas temperaturas, se detectaron diversos tipos de proteínas de choque térmico, mayor mente chaperonas, entre ellas la más activa fue la familia de proteínas HSP20, seguida de la chaperona molecular DnaK, además, se observó una expresión constante de las subunidades A, B, C, P y X de las proteasas Clp (Figura 12). Para la categoría de resistencia a la salinidad,

se detectaron proteínas transportadores de diferentes tipos de iones, entre los cuales se encuentran el calcio, el cloro, el magnesio, el potasio, el sodio (Figura 13). Adicionalmente, se identificaron diferentes enzimas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos ectoína y prolina, además del metabolismo del disacárido trehalosa (Figura 13). Las proteínas con mayor actividad transcripcional fueron las diferentes subunidades de la bomba de protones H+ ATPasa y el antiportador H+/Na+, además, estas proteínas fueron las únicas que presentaron actividad en el metatranscriptoma de hojas (Figura 13). Los resultados de la anotación funcional contra el quinto nivel de la base de datos PLaBASe muestran que, el metatranscriptoma endófito de los neumatóforos de *A. germinans* expresa una mayor variedad de proteínas que permiten a los microorganismos colaborar con la planta para degradar moléculas o resistir factores adversos del ambiente, en comparación con el metatranscriptoma endófito de las raíces de *R. mangle* (Figura 12 y Figura 13)

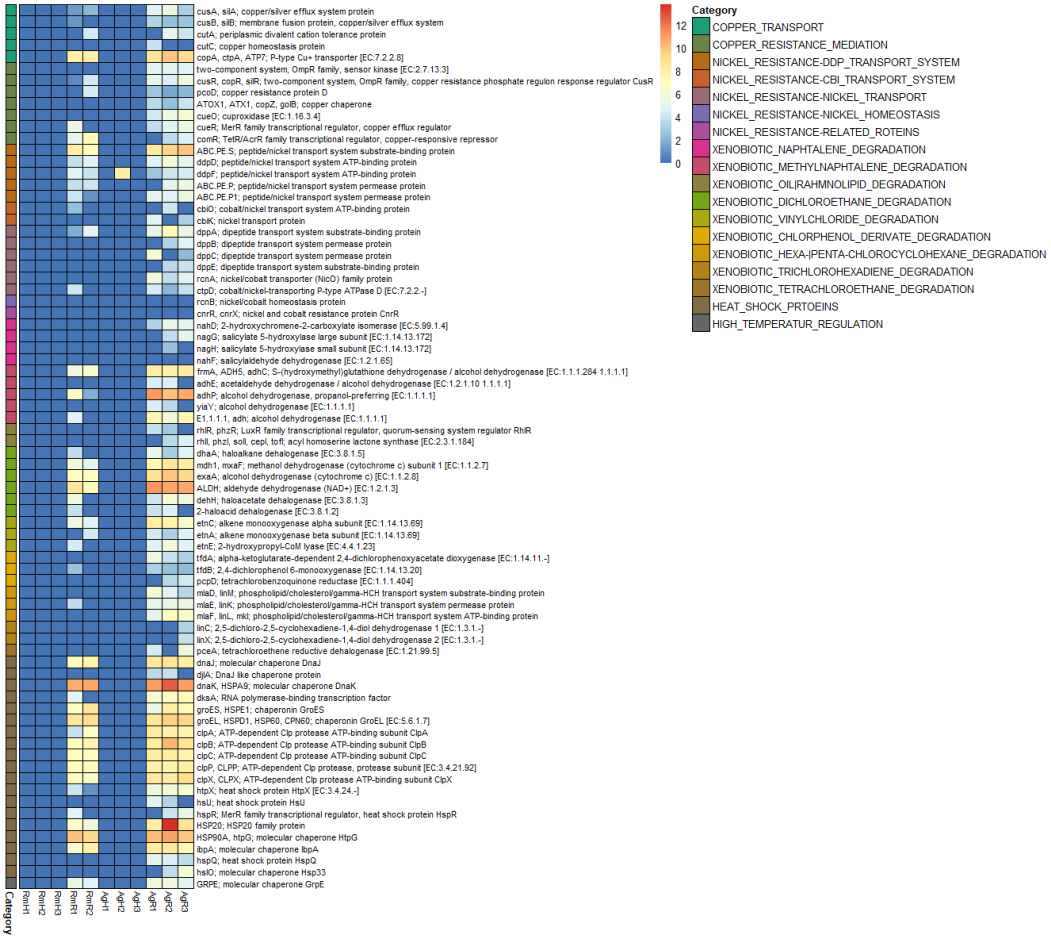


Figura 12. Mapa de calor de las proteínas relacionadas con la resistencia al cobre y níquel, la eliminación de naftaleno y petróleo y la resistencia a las altas temperaturas.

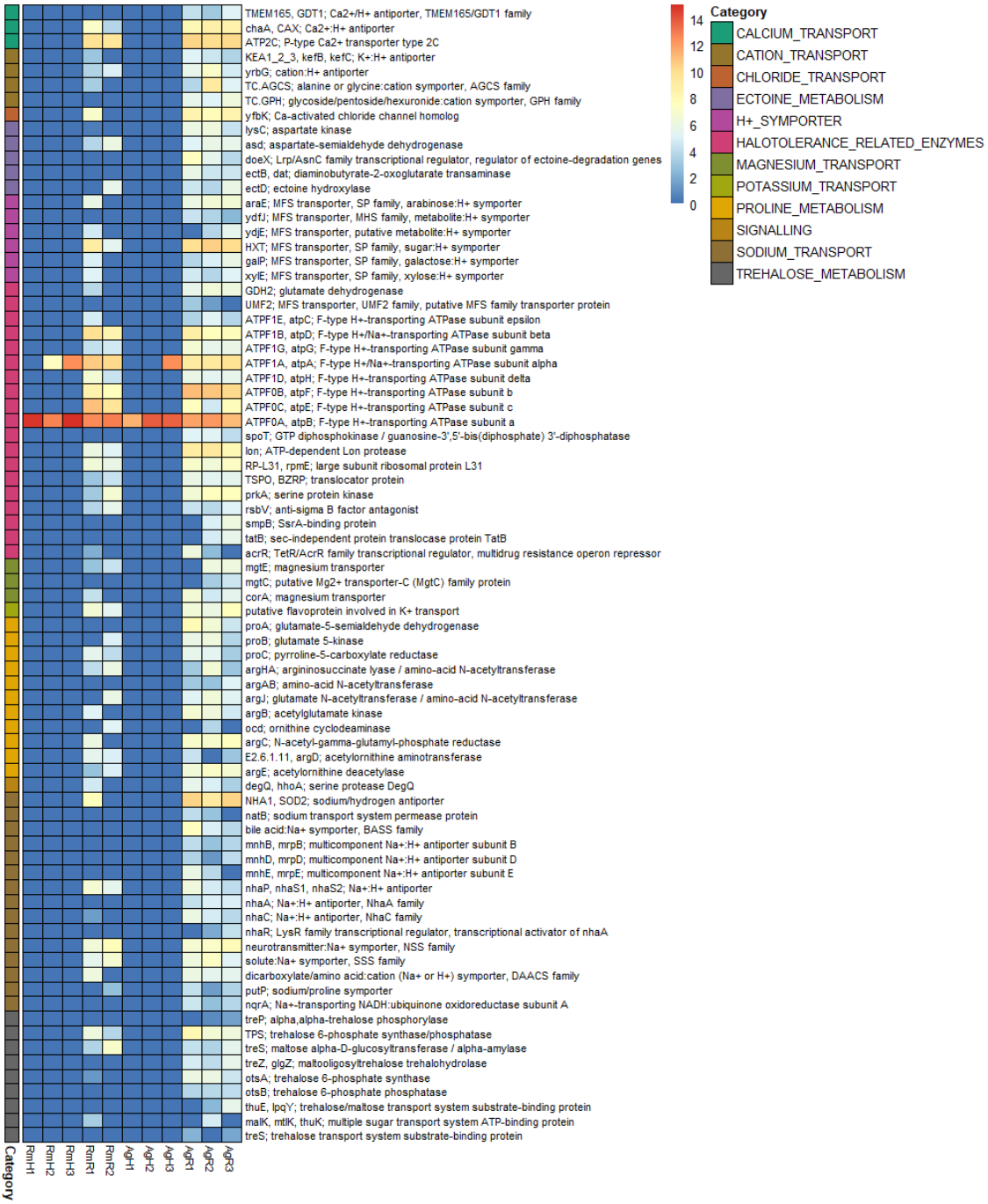


Figura 13. Mapa de calor de las proteínas que participan en la resistencia a la salinidad mediada por microorganismos.

Discusión

En este trabajo se realizó una caracterización taxonómica y funcional del transcriptoma de la comunidad de microorganismos endófitos presentes en hojas y raíces de las especies de mangle *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*. Fue posible demostrar que existen diferencias significativas, tanto en la taxonomía como en función génicas asociadas a la especie de planta hospedera y al tejido vegetal que se esté analizando. Se determinó que los microorganismos cumplen funciones relacionadas con la capacidad de los mangles para sobrevivir en ambientes con alta salinidad, baja disponibilidad de compuestos ricos en nitrógeno, estrés biótico y abiótico y contaminación por xenobióticos y metales pesados. Por lo cual se infiere que, la asociación planta-microorganismos resulta clave para la supervivencia de *A. germinans* y *R. mangle* en la bahía de Buenaventura, Colombia.

Anotación taxonómica de las lecturas, Análisis de las diversidades Alfa y Beta

La anotación taxonómica de las lecturas mostró que los microorganismos con mayor actividad transcripcional pertenecen al grupo de las bacterias, en los diferentes niveles taxonómicos analizados (Figura 2A, 2B y 2C). A nivel de phylum, se observa a Pseudomonadota como el grupo con mayor actividad (Figura 2B), lo cual, concuerda con diversos análisis de microbiota endofítica que demostraron cómo este grupo es el más abundante en diversos tejidos de diferentes especies de plantas (Acuña et al., 2023; Lukina et al., 2024; Roca-Couso et al., 2024). *Mycobacterium* fue el género con mayor expresión génica relativa (Figura 2C), este género ha sido ampliamente estudiado por su importancia médica, sin embargo, recientemente, se descubrió que existen bacterias de este grupo que se desarrollan como endófitos (Koskimaki et al., 2010), y la secuenciación del genoma de *Mycobacterium* Mya-zh01, permitió identificar su potencial para contribuir en la germinación y desarrollo vegetativo en orquídeas (Pan et al., 2020). Teniendo esto en cuenta, se plantea que la especie de *Mycobacterium* presente en *A. germinans* y *R. mangle* puede ser un endófito que colabora en el desarrollo vegetativo de estos mangles y, por esto, se encuentra con una muy alta expresión génica relativa.

Otro de los géneros con una alta actividad transcripcional fue *Clostridium*, las especies endofíticas de este género han demostrado la capacidad de producir ácido acético y etanol, además, de haber perdido genes relacionados con la capacidad de vida libre, por lo cual varias especies de este género son endófitos obligados de plantas (Li et al., 2023). El género *Pseudomonas* ha sido estudiado como endófito y se ha demostrado que algunas cepas promueven el crecimiento de la planta hospedera gracias a que cuentan con la capacidad de solubilizar fosfatos (Flores-Duarte et al., 2022). El género más activo de hongos fue *Schizosaccharomyces* (Figura 2C), las levaduras de este grupo han sido aisladas de suelos y

tejido vegetal (Brysch-Herzberg et al., 2022), lo cual puede explicar el por qué se encontraron tan activos en las raíces de *R. mangle*, sin embargo, su función como endófitos no ha sido estudiada.

La diversidad alfa mostró que existe una mayor riqueza y abundancia de transcritos en las raíces, en comparación con las hojas (Figura 3A), mientras que la diversidad beta evidenció que tanto la especie de planta hospedera como el tejido del que proviene la muestra, son factores significativos que modulan la composición taxonómica del metatranscriptoma endófito (Figura 3B). Diversos estudios de composición taxonómica del microbioma de las plantas han demostrado que, a mayor distancia filogenética de los hospederos, mayor será la diferencia en la composición taxonómica de la microbiota (Bouffaud et al., 2014; Samad et al., 2017). Teniendo en cuenta esta información y sabiendo que *A. germinans* y *R. mangle* pertenecen a órdenes diferentes, Lamiales y Malpighiales, respectivamente, es de esperar que la taxonomía de los microorganismos endófitos de estas dos especies de mangle se vea influenciada por la distancia filogenética de sus hospederos.

Por otro lado, se sabe que los tejidos de una planta actúan como compartimientos que presentan características fisiológicas distintas, y que estos tejidos se ven sometidos a presiones climáticas diferentes. Es así como los microorganismos de la raíz se enfrentan a ambientes distintos a los que enfrentan los endófitos de las hojas (Dastogeer et al., 2020). Específicamente, en el ecosistema de manglar, las raíces de estos árboles se exponen a la acción de las mareas, las cuales suben y bajan constantemente, lo que somete a los microorganismos de las raíces a cambios de salinidad y pH y presión de oxígeno, a lo largo del día, mientras que los microrganismos de las hojas tienen otros retos como la acción de los rayos del sol, lo cual genera altas temperaturas constantes (Ellison, 2021). Estas variaciones ambientales son un factor importante a la hora de que un microorganismo sea capaz de colonizar un tejido especifico, ya que debe poner en movimiento, a través de su genoma y transcriptoma diversos mecanismos moleculares para lidiar con todas las condiciones adversas (Coleman-Derr et al., 2017). Lo que convierte al ambiente en un factor que genera variación en la composición, tanto taxonómica como funcional, del metatranscriptoma endófito en las plantas de mangle.

Anotación funcional, expresión diferencial y enriquecimiento funcional

El PCA de las anotaciones funcionales mostró un comportamiento igual al del PCoA de las anotaciones taxonómicas (Figura 4), arrojando como resultado que tanto la especie de planta hospedera como el tejido, del que proviene la muestra, son factores estadísticamente significativos que modulan el metatranscriptoma endófito en los mangles de este estudio. Como ya se dijo anteriormente, se ha demostrado que la distancia filogenética y las condiciones ambientales y fisiológicas son factores muy importantes para modular la

composición del microbioma asociado a las plantas (Coleman-Derr et al., 2017; Samad et al., 2017). La respuesta transcripcional de un microorganismo le permite enfrentarse a ambientes cambiantes y, es lo que define la capacidad de un individuo para establecerse y proliferar en un ambiente con condiciones adversas o estresantes (Hechler et al., 2023; Jiao et al., 2024). En el ecosistema de manglar, los microorganismos endófitos asociados a las raíces pasan una parte del día sumergidos y otra parte en contacto con el aire, por lo cual, deben ser capaces de adaptarse a estos cambios en la salinidad y la disponibilidad de oxígeno. Por ejemplo, en el metatranscriptoma de raíces se encontraron muy activos los genes que codifican para las subunidades de la NADH deshidrogenasa (Anexo 4), una enzima que hace parte de las rutas de obtención de energía y que, en algunas bacterias, sirve como única entrada de los electrones a la cadena respiratoria (Sellamuthu et al., 2017; Lencina et al., 2018). Teniendo en cuenta que las muestras fueron tomadas en marea baja, es probable que los microorganismos se encontraran en ese momento en una fase de obtención de energía aeróbica, siendo capaces de aprovechar la disponibilidad de oxígeno que genera la ausencia de inundación.

Los análisis de expresión diferencial mostraron que existen más genes con diferencias significativas al comparar el mismo tejido entre diferentes especies que tejidos diferentes de la misma especie (Figura 5 y Figura 8). Este resultado, junto con la mayor significancia del factor especie (Valor-p: 0.0001) que el factor tejido (Valor-p: 0.0032) en el PERMANOVA de funciones, sugiere que, a pesar de que ambos factores son importantes, la distancia filogenética de las plantas hospederas juega un papel más grande en la modulación de la expresión génica de la comunidad de endófitos, que el tipo de tejido del que proviene la muestra. Otros estudios metatranscriptómicos han demostrado que la expresión génica de los microorganismos se ve influenciada por la taxonomía de la planta hospedera, y que incluso especies de plantas hospederas del mismo género tienen metatranscriptomas diferentes (Liao et al., 2016). No se encontraron ejemplos, en la literatura consultada en los que se analice el nivel de expresión génica de los endófitos de las plantas en un gradiente espacial. Sin embargo, para muestras metagenómicas, Cardenas y colaboradores encontraron que las funciones putativas en la comunidad de endófitos de *R. mangle* y *A. germinans* se ven influenciadas por el tejido en el cual se encuentra la comunidad de microorganismos (Resultados no publicados).

Comparaciones intraespecíficas

Los análisis de expresión diferencial dentro de la misma especie de planta hospedera mostraron resultados similares. Se encontró que, en las hojas, tanto de *A. germinans* como de *R. mangle*, se sobreexpresa la glutamina sintetasa, una enzima que puede ser producida tanto por la planta como por los endófitos de ésta, y que hace parte del ciclo del nitrógeno, permitiendo la producción de glutamina a partir de glutamato y amonio (Cipriano et al., 2021). Este resultado sugiere que los microorganismos de las hojas de las plantas de mangle

pueden estar involucrados en el metabolismo del nitrógeno. Un ejemplo de esta actividad se ha reportado en la especie *Camellia sinensis*, en la cual, se ha demostrado que la glutamina sintetasa de los endófitos de las hojas contribuye al metabolismo de la glutamina y posterior producción de teanina, el cual es un aminoácido que sirve como reserva de nitrógeno para la planta (Sun et al., 2019; Chang et al., 2023). Las plántulas de caña de azúcar son otro caso documentado, en el cual, los endófitos de las hojas colaboran en el metabolismo del nitrógeno a través de la expresión de la glutamina sintetasa, e incluso pueden influenciar la producción de esta enzima por parte de la planta (Cipriano et al., 2021). Un mecanismo similar puede estar ocurriendo en las hojas de *A. germinans* y *R. mangle*, en donde los microorganismos endófitos contribuyen a la asimilación y almacenamiento de nitrógeno en forma de aminoácidos. Esta hipótesis también se ve apoyada por el hecho de que la categoría con mayor enriquecimiento funcional en las hojas de ambos mangles fue el transporte y metabolismo de aminoácidos (Figura 6B y 7B).

Para el caso de las raíces, los resultados evidencian que la microbiota, tanto de *A. germinans* como de *R. mangle*, presentan una expresión diferencial de genes relacionados con la obtención de energía aeróbica, entre ellos se encuentran varias subunidades de la NADH deshidrogenasa y diferentes tipos de citocromos (Figura 6A y 7A). Así mismo, los resultados del enriquecimiento mostraron a la producción y obtención de energía como la categoría más expresada (Figura 6C y 7C). El haber tomado las muestras de raíz en marea baja, estaría facilitando la toma de oxígeno por las lenticelas de la raíz en *R. mangle* y a través de los neumatóforos en el caso de *A. germinans*, proporcionando un ambiente adecuado para la producción de energía aeróbica por parte de los microorganismos asociados. Adicionalmente, otros de los genes sobreexpresados en las raíces de *R. mangle* fueron la celobiohidrolasa II y la decarboxilasa de oxalato. La enzima celobiohidrolasa II es una proteína ampliamente estudiada a nivel biotecnológico ya que permite la degradación de celulosa (Dai et al., 2021; Pramanik et al., 2021; Niu et al., 2024), el haber encontrado esta enzima sobreexpresada puede sugerir la presencia de un hongo endofítico patogénico que se encuentra degradando la celulosa de las raíces de *R. mangle* (Chen et al., 2024). Por otro lado, la decarboxilasa de oxalato es una enzima encargada del metabolismo del oxalato, este compuesto puede ser producido por bacterias, hongos y plantas y se ha determinado que es una molécula importante en procesos de biorremediación (Prasad & Shivay, 2017; Graz, 2024). Sin embargo, los investigadores han encontrado que las altas concentraciones de oxalato pueden resultar tóxicas para las plantas (Li et al., 2022), por lo que se puede hipotetizar que la sobreexpresión de la enzima oxalato decarboxilasa permita controlar los niveles de oxalato en la planta y así evitar que resulte dañino para las raíces.

Comparaciones interespecíficas

La comparación entre los metatranscriptomas de las hojas de ambas especies reflejó que, los microorganismos endófitos presentan activas varias proteínas relacionadas con el ciclo del

carbono. En las hojas de *A. germinans* se encontró a la enzima málica dependiente de NAD y la sintetasa de glucógeno sobreexpresadas. Aunque las funciones de estas proteínas no se han estudiado en endófitos, se sabe que la enzima málica es parte importante del desarrollo vegetativo de las plantas (Li et al., 2024), ya que permite la captación de dióxido de carbono. Por otro lado, en las hojas de *R. mangle* se encontraron sobreexpresadas diferentes enzimas relacionadas con el ciclo de la glucólisis, el cual hace parte de los ciclos básicos de obtención de energía de los microorganismos, bajo condiciones de estrés, los genes relacionados con la glucólisis y la gluconeogénesis se han encontrado sobreexpresado en endófitos de raíz del arroz (Sun et al., 2024), lo que podría significar que los microorganismos endófitos de *R. mangle* aumenta la producción de energía a partir de carbono como respuesta al estrés generado por el ecosistema. Diferentes tipos de glutamato y glutamina sintetasa se observaron sobreexpresadas en las hojas de ambas especies (Figura 9A), como ya se dijo anteriormente, es posible que los microorganismos de las hojas de estos mangles estén colaborando con la fijación y almacenamiento de nitrógeno del ambiente, sin embargo, teniendo en cuenta que son diferentes tipos de sintetasas las que se encuentran en el metatranscriptoma de cada especie de mangle y que los análisis estadísticos muestran diferencias, tanto taxonómicas como funcionales, es probable que el proceso de fijación de nitrógeno se esté llevando a cabo por diferentes especies de microorganismos, dependiendo de la planta hospedera. El enriquecimiento funcional mostró un patrón muy similar en los genes con expresión diferencial significativa, independientemente de la especie de planta hospedera (Figura 9B, 9C). Sin embargo, los genes expresados y relacionados con el metabolismo de aminoácidos en las hojas de *R. mangle,* son casi el doble que en *A. germinans*, lo que también apoya la hipótesis de que la colaboración en la fijación de nitrógeno por parte de la microbiota se hace de forma diferente dependiendo de la planta hospedera.

Cuando se hace la comparación entre raíces se observa más del doble de genes con expresión diferencial significativa en el metatranscriptoma de *R. mangle* en comparación con el de *A. germinans* (Figura 8B). Al igual que en las hojas, varios de los genes sobreexpresados en la microbiota de la raíz de *R. mangle*, están involucrados en el metabolismo del carbono, por ejemplo, la enzima málica dependiente de NAD, la cual cataliza la descarboxilación oxidativa del malato a piruvato, la sintetasa de glucógeno y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa son enzimas que hacen parte del ciclo de la glucólisis. En plantas de caña de azúcar se ha evidenciado que algunas especies de hongos endófitos de las raíces aumentan la producción de enzimas del ciclo de la glucólisis en respuesta a la producción de glucosa y otros carbohidratos por parte de la planta (De Rocchis et al., 2022). Un mecanismo similar podría explicar la sobreexpresión de las enzimas relacionadas con el ciclo del carbono, ya que, la raíz de *R. mangle* es un órgano de la planta con alta cantidad de carbohidratos, mientras que en el caso de *A. germinans, los* neumatóforos, son estructuras de la raíz con

tejido esponjoso, especializadas en el intercambio gaseoso. También, como se planteó anteriormente, el aumento de las enzimas relacionadas con la obtención de energía puede ser una respuesta de los microorganismos al estrés ambiental.

Potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos de *A. germinans* y *R. mangle*

La comparación de la actividad transcripcional de los microorganismos, en los tejidos analizados, mostró que en el tejido radicular se presentó una mayor actividad de los genes relacionados con la interacción microorganismo-hospedero, en comparación con las hojas (Figura 11). Una de las categorías funcionales con mayor actividad transcripcional, en las raíces, fue la tolerancia a las altas temperaturas. En otros estudios se han reportado que, en los manglares de la región ecuatorial, como lo es el manglar de Buenaventura, hay una alta actividad transcripcional relacionada con la resistencia a la radiación UV y a las altas temperaturas (Bajay et al., 2018). Nuestros resultados sugieren que, los microorganismos asociados a las raíces de *A. germinans* y *R. mangle* aportan a la capacidad de estos mangles de resistir las altas temperaturas, esta hipótesis ya se ha comprobado en plantas de *Glycine max* y *Serendipita indica* (Bilal et al., 2020; Tyagi et al., 2022), en las que sus endófitos actúan en conjunto con las plantas para aclimatarse a los aumentos de temperatura. En nuestro caso, se detectó una alta expresión génica de varias proteínas de choque térmico, especialmente chaperonas como la familia HSP20, estas proteínas se encuentran presentes tanto en microorganismos como en plantas y, en otros estudios, se ha demostrado su importancia en la respuesta al estrés por altas temperaturas (Bhowmick et al., 2024; Liu et al., 2024). Otra chaperona importante en el proceso de respuesta al estrés por altas temperaturas fue la DnaK, se ha documentado que esta proteína les confiere a las bacterias resistencia, no solo al calor sino también a compuestos dañinos como los antibióticos, generando proteínas mutantes que les proporcionan a los microorganismos resistencia antimicrobiana (Fay et al., 2021).

Los microorganismos también colaboran en el metabolismo de fosfato y azufre, adquisición de nitrógeno y, especialmente, en la adquisición y homeóstasis del hierro (Figura 11). En diversos estudios de interacción planta-hospedero se ha demostrado que los microorganismos juegan un papel importante en la adquisición de nutrientes necesarios para la planta (Compant et al., 2019; Compant et al., 2021). Teniendo en cuenta la alta actividad transcripcional en categorías metabólicas y que el suelo del manglar de Buenaventura es rico en diversos nutrientes (Anexo 1), se plantea que, los microorganismos de las raíces de *A. germinans* y *R. mangle* colaboran con sus huéspedes para metabolizar los diversos nutrientes presentes en el suelo como el azufre, el fósforo, el carbono, el nitrógeno y el hierro.

Así mismo, los resultados demuestran que los microorganismos endófitos de ambas plantas tienen activos genes de resistencia a metales pesados y xenobióticos (Figura 11). Principalmente, se encontraron altamente expresados genes de transportadores de cobre y

níquel (Figura 12). Este tipo de proteínas, capaces de eliminar metales pesado del citoplasma de los microorganismos, les confieren una gran capacidad para poder desarrollarse en ambientes contaminados, sin embargo, estas mismas proteínas les pueden proveer de la capacidad de eliminar otro tipo de moléculas como los antibióticos (Muteeb, 2023; Brown et al., 2024;). Por el lado de los xenobióticos, se observó una alta expresión de enzimas relacionadas con la degradación de petróleo y naftaleno, muchas de ellas involucradas en las rutas metabólicas de degradación de cloroalcanos y cloroalquenos en procariotas (Figura 12). Las bacterias con capacidad de degradación de petróleo han sido muy estudiadas en los últimos años, ya que estos organismos resultan ser los más eficientes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Chunyan et al., 2023). Este hallazgo demuestra el potencial biotecnológico de las bacterias endofíticas de la raíz de *R. mangle* y *A. germinans* para ser utilizadas en biorremediación de suelos contaminados con petróleo. El haber encontrado todas estas proteínas relacionadas con la degradación y eliminación de moléculas dañinas se puede explicar por la ubicación del manglar, el cual se encuentra en contacto con la zona urbana de Buenaventura, por su alta actividad antrópica y por ser el puerto más grande de Colombia, se generan gran cantidad de desechos que se vierten a las aguas, convirtiendo al manglar en una zona de alta intervención (Duque et al., 2020; Erazo-Enriquez, 2022). Los desechos antrópicos exponen, tanto a las plantas como a los microorganismos, a moléculas que pueden resultar tóxicas, por lo cual se activan diferentes rutas metabólicas para evitar los efectos adversos que estas moléculas podrían causar, como ocurre en otros casos de interacción planta-microorganismos (Shahzad et al., 2019; Datta et al., 2020; Husna et al., 2021). Cabe resaltar que, el exponer a las bacterias a un estrés constante causado por moléculas dañinas, puede generar un procesos adaptativo por parte de los microorganismos, que desencadene nuevas formas de resistencia antimicrobiana (Muteeb, 2023). Por lo cual, se sugiere tener especial cuidado sobre la posibilidad de que la microbiota de la bahía de Buenaventura desarrolle estrategias que las puedan convertir en un problema para la salud humana.

La neutralización del estrés salino es una de las dos categorías que presenta un patrón de expresión alto independientemente del tejido de la planta (Figura 11). Este resultado es interesante teniendo en cuenta que el estudio se realiza en plantas de manglar, un ecosistema en donde la alta salinidad es constante y que la resistencia a este factor es clave para lograr sobrevivir. Al momento del muestreo, la salinidad registrada en el agua fue de 18.5 PSU (Anexo 1), para la bahía de Buenaventura, Mondragón-Díaz y colegas (2022) registraron la variación en la salinidad a lo largo de dos temporadas, y encontraron que esta fluctúa entre 15.8 y 22.2 PSU, lo que representa un estrés salino constante tanto para las plantas como para los microorganismos que viven en este manglar. A pesar de que las plantas de mangle estudiadas cuentan con sus propias adaptaciones para combatir el estrés salino, por ejemplo, *A. germinans* presenta glándulas excretoras de sales en sus hojas (Lonard et al., 2017) y *R.*

mangle presenta células especializadas que retienen grandes cantidades de agua para mantener el equilibrio osmótico (Nasker et al., 2021), la alta actividad transcripcional relacionada con la neutralización del estrés salino sugiere que, los microorganismos endófitos de *A. germinas* y *R. mangle* colaboran con su maquinaria molecular, para proveer a sus plantas hospederas de una mejor respuesta a la salinidad constante del ambiente. Este tipo de interacciones ya se han reportado anteriormente, Vaishnav y colegas (2019) demostraron que las bacterias endófitas pueden disminuir la presión osmótica mediante la producción de fihohormonas, antioxidantes y osmolitos, así mismo, Subedi y colegas (2022) encontraron que la tolerancia de plántulas de *R. mangle* a la salinidad puede incrementar gracias a la inoculación con ciertos endófitos. Dentro de las proteínas de resistencia a la salinidad se encontraron diferentes transportadores de iones, resultando especialmente activas la bomba ATPasa de H+ y el antiportador H+/Na+ (Figura 13). Si bien estas dos proteínas de membrana no se encuentran asociadas a una ruta metabólica específica de resistencia a la salinidad en bacterias, sí pueden estar cumpliendo esta función en sinergia con su hospedero. En plantas existe una ruta metabólica llamada SOS (Salt Overly Sensitive), que se encarga de la resistencia a la salinidad, el mecanismos de acción consiste en censar la presencia de iones Na+ y, a través de un antiportador H+/Na+, expulsar los iones de sodio del citoplasma celular (Zhou et al., 2022). Teniendo en cuenta la alta expresión de la bomba de protones y del antiportador H+/Na+, es posible plantear que las bacterias que hacen parte del microbioma endófito de hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*, colaboran a la resistencia a la salinidad con un mecanismos similar al sistema SOS que ocurre en plantas, generando así una adaptación en conjunto entre planta-microorganismos y aumentando la capacidad de los mangles de resistir a la salinidad del ambiente.

En conjunto, todas estas funciones desempeñadas por los microorganismos resultan beneficiosas para las plantas de *A. germinans* y *R. mangle*, ya sea para la adquisición de nutrientes importantes en su desarrollo, para la tolerancia a compuestos que puedan resultar dañinos o para lograr sobrevivir y desarrollarse en un ambiente con presiones constantes por estrés ambiental. Se resalta que, al analizar las enzimas relacionadas con la interacción planta-microorganismos, se observó un patrón de expresión diferente entre plantas de mangle (Figura 12 y Figura 13). El encontrar más proteínas con alta expresión en los neumatóforos de *A. germinans*, en comparación con las raíces de *R. mangle*, sugiere que, en términos de bioprospección, el microbioma endófito de los neumatóforos de *A. germinans* puede ser más interesante de investigar en futuros estudios.

Conclusiones

En síntesis, este estudio presenta un análisis taxonómico y funcional del metatranscriptoma de endófitos de *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*. Los resultados evidenciaron que, tanto la especie de planta hospedera como el tejido del que proviene la muestra son factores determinantes en la taxonomía y expresión génica de la comunidad de microorganismos.

Además, se resalta la importancia de estos microorganismos en la adaptación de las plantas de mangle al ambiente extremo del ecosistema, ya que ayudan en la resistencia a las altas temperaturas, los metales pesados, los xenobióticos y especialmente en la resistencia a la salinidad. Se destaca la posible acción de los microorganismos, de las hojas de ambas especies, en la fijación y almacenamiento de nitrógeno a través de la glutamina y glutamato sintetasa, la degradación de hidrocarburos, eliminación de metales pesados y la producción de chaperonas para resistir las altas temperaturas en las raíces, y la eliminación de iones Na+, en ambos tejidos de la plantas hospederas. Toda esta evidencia junta demuestra el alto potencial que presentan los microorganismos endófitos de *A. germinans* y *R. mangle* para aumentar la capacidad de las plantas de tolerar condiciones adversas, y convierte a la microbiota endofítica de los mangles estudiados en buenos candidatos para futuros estudios de bioprospección, especialmente los microorganismos asociados a los neumatóforos de *A. germinans*. Futuras investigaciones podrían incluir estudios para confirmar la capacidad de estos microorganismos de degradar moléculas dañinas, ayudar a las plantas en la fijación y metabolismo de nutrientes, aumentar la resistencia de su hospedero a la salinidad del ambiente, y explorar la viabilidad de utilizar estos microorganismos a nivel agrícola. Se sugiera además realizar un seguimiento en el tiempo ya que los factores climáticos estacionales también pueden modular la comunidad de microorganismos, por lo cual resulta interesante determinar cuáles especies de endófitos y qué funciones génicas cambian a largo de un gradiente de tiempo y cuales se mantienen estables.

Literatura citada

Acuña, J. J., Hu, J., Inostroza, N. G., Valenzuela, T., Perez, P., Epstein, S., ... & Jorquera, M. A. (2023). Endophytic bacterial communities in ungerminated and germinated seeds of commercial vegetables. *Scientific Reports*, *13*(1), 19829.

Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2010). FastQC. *A quality control tool for high throughput sequence data*, *370*.

Atwood, T. B., Connolly, R. M., Almahasheer, H., Carnell, P. E., Duarte, C. M., Ewers Lewis, C. J., ... & Lovelock, C. E. (2017). Global patterns in mangrove soil carbon stocks and losses. *Nature Climate Change*, *7*(7), 523-528.

Bajay, S. K., Cruz, M. V., Da Silva, C. C., Murad, N. F., Brandão, M. M., & De Souza, A. P. (2018). Extremophiles as a model of a natural ecosystem: transcriptional coordination of genes reveals distinct selective responses of plants under climate change scenarios. Frontiers in Plant Science, 9, 1376.

Bashiardes, S., Zilberman-Schapira, G., & Elinav, E. (2016). Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and biology insights*, *10*, BBI-S34610.

Bilal, S., Shahzad, R., Imran, M., Jan, R., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020). Synergistic association of endophytic fungi enhances *Glycine max* L. resilience to combined abiotic

stresses: Heavy metals, high temperature and drought stress. *Industrial Crops and Products*, *143*, 111931

Blanco-Libreros, J. F., & Álvarez-León, R. (2019). Mangroves of Colombia revisited in an era of open data, global changes, and socio-political transition: Homage to Heliodoro Sánchez-Páez. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *43*(166), 84-97.

Blighe K, Rana S, Lewis M (2024). *EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling*. doi:10.18129/B9.bioc.EnhancedVolcano, R package version 1.25.0, https://bioconductor.org/packages/EnhancedVolcano.

Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, *34*(5), 525-527.

Brysch-Herzberg, M., Jia, G. S., Seidel, M., Assali, I., & Du, L. L. (2022). Insights into the ecology of Schizosaccharomyces species in natural and artificial habitats. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *115*(5), 661-695.

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

Bohra, V., Tam, N. F. Y., Chen, L., Lai, K. K. Y., Lam, W., Xu, S. J. L., ... & Lee, F. W. F. (2024). Untangling Structural and Functional Diversity of Prokaryotic Microbial Assemblage on Mangrove Pneumatophores. *Journal of Marine Science and Engineering*, *12*(5), 802.

Bouffaud, M. L., Poirier, M. A., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2014). Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. *Environmental microbiology*, *16*(9), 2804-2814.

Bhowmick, A., Bhakta, K., Roy, M., Gupta, S., Das, J., Samanta, S., ... & Ghosh, A. (2023). Heat shock response in Sulfolobus acidocaldarius and first implications for cross-stress adaptation. *Research in Microbiology*, *174*(8), 104106.

Brown, N. L., Lee, B. T., & Silver, S. (2024). Bacterial transport of and resistance to copper. In *Metal ions in biological systems* (pp. 405-434). CRC Press.

Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, *12*(1), 59-60.

Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., Suvorov, V., & Prjibelski, A. D. (2016). rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies. *Bioinformatics*, *32*(14), 2210-2212.

Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., & Prjibelski, A. D. (2019). rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, *8*(9), giz100.

Cabral, L., de Sousa, S. T. P., Júnior, G. V. L., Hawley, E., Andreote, F. D., Hess, M., & de Oliveira, V. M. (2018). Microbial functional responses to long-term anthropogenic impact in mangrove soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *160*, 231-239.

Cantera, J. R., & Blanco, J. F. (2001). The estuary ecosystem of Buenaventura Bay, Colombia. In *Coastal marine ecosystems of Latin America* (pp. 265-280). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Chang, M, Ma, J, Sun, Y, Fu, M, Liu, L, Chen, Q, et al. 2023. Role of endophytic bacteria in the remobilization of leaf nitrogen mediated by CsEGGT in tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71(13):5208–5218.

Chen, W., J. Simpson, and C. A. Levesque. 2015. Package "RAM" Type Package Title R for Amplicon-Sequencing-Based Microbial-Ecology

Chen, Y., Ding, Y., Zhao, S., Yang, N., Wu, Z., Zhang, P., ... & Qian, W. (2024). SsdchA is a novel secretory cellobiohydrolase driving pathogenicity in Sclerotinia sclerotiorum. *The Crop Journal*, *12*(2), 493-502.

Chunyan, X., Qaria, M. A., Qi, X., & Daochen, Z. (2023). The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. *Science of the Total Environment*, *865*, 161112.

Cipriano, M. A. P., Freitas-Iorio, R. D. P., Dimitrov, M. R., de Andrade, S. A. L., Kuramae, E. E., & Silveira, A. P. D. D. (2021). Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar N-metabolites in sugarcane seedlings. *Microorganisms*, *9*(3), 479.

Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... & Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, *209*(2), 798-811.

Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, *19*, 29-37.

Compant, S., Cambon, M. C., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A., & Sessitsch, A. (2021). The plant endosphere world–bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*, *23*(4), 1812-1829.

Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, *2008*.

Dai, L., Qu, Y., Huang, J. W., Hu, Y., Hu, H., Li, S., ... & Guo, R. T. (2021). Enhancing PET hydrolytic enzyme activity by fusion of the cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology, 334*, 47-50.

Datta, S., Singh, S., Kumar, V., Dhanjal, D. S., Sidhu, G. K., Amin, D. S., ... & Singh, J. (2020). Endophytic bacteria in xenobiotic degradation. In *Microbial endophytes* (pp. 125-156). Woodhead Publishing.

D'alessandro, M. A. R. C. O., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J., & Turlings, T. C. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, cell & environment*, *37*(4), 813826.

Dastogeer, K. M., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A., & Chakraborty, A. (2020). Plant microbiome–an account of the factors that shape community composition and diversity. *Current Plant Biology*, *23*, 100161.

De Rocchis, V., Roitsch, T., & Franken, P. (2022). Extracellular glycolytic activities in root endophytic Serendipitaceae and their regulation by plant sugars. *Microorganisms*, *10*(2), 320.

Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of vegetation science*, *14*(6), 927-930.

Duque, G., Gamboa-García, D. E., Molina, A., & Cogua, P. (2020). Effect of water quality variation on fish assemblages in an anthropogenically impacted tropical estuary, Colombian Pacific. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(20), 25740-25753.

Duke, N. C., & Allen, J. A. (2006). *Rhizophora mangle, R. samoensis, R. racemosa, R.*× harrisonii (Atlantic–East Pacific red mangrove). *Species profiles for pacific island agroforestry*, *10*, 1-18.

Ellison, J. C. (2021). Factors influencing mangrove ecosystems. Mangroves: Ecology, Biodiversity and Management, 97-115.

Erazo Enriquez, K. L. (2022), "Influencia de la variación espaciotemporal de los factores ambientales en la acumulación de metales pesados en macroinvertebrados de la bahía de Buenaventura" (Master dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira).

Enriquez, O., Guzmán, A., & Narváez, G. (2014). Análise do comportamento da precipitação no município de Buenaventura (Valle del Cauca, Colômbia) em condições de desenvolvimento dos fenômenos El Niño e La Niña. *Cuadernos de Geografía: Revista Colombiana de Geografía*, *23*(1), 165-178.

Fay, A., Philip, J., Saha, P., Hendrickson, R. C., Glickman, M. S., & Burns-Huang, K. (2021). The DnaK chaperone system buffers the fitness cost of antibiotic resistance mutations in mycobacteria. *MBio*, *12*(2), 10-1128.

Flores-Duarte, N. J., Caballero-Delgado, S., Pajuelo, E., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Navarro-Torre, S., & Rodríguez-Llorente, I. D. (2022). Enhanced legume growth

and adaptation to degraded estuarine soils using *Pseudomonas* sp. nodule endophytes. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1005458.

Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, *28*(23), 3150-3152.

Gilbert, J. A., & Hughes, M. (2011). Gene expression profiling: metatranscriptomics. *HighThroughput Next Generation Sequencing: Methods and Applications*, 195-205.

González-Hernández, L., Sol-Sánchez, Á., Pérez-Vázquez, A., & Obrador-Olan, J. J. (2016). Sobrevivencia y crecimiento de mangle negro (*Avicennia germinans* L.) en plantaciones reforestadas y regeneración natural. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *7*(SPE14), 2769-2782.

Hechler, R. M., Yates, M. C., Chain, F. J., & Cristescu, M. E. (2023). Environmental transcriptomics under heat stress: Can environmental RNA reveal changes in gene expression of aquatic organisms?. *Molecular Ecology*.

Husna, Hussain, A., Shah, M., Hamayun, M., Qadir, M., & Iqbal, A. (2021). Heavy metal tolerant endophytic fungi *Aspergillus welwitschiae* improves growth, ceasing metal uptake and strengthening antioxidant system in Glycine max L. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.

Isaza, J. P., Sandoval-Figueredo, V., Rodelo, M. C., Muñoz-García, A., Figueroa-Galvis, I., & Vanegas, J. (2021). Metatranscriptomic characterization of the bacterial community of a contaminated mangrove from the Caribbean. *Regional Studies in Marine Science*, *44*, 101724.

Jiao, J., Lv, X., Shen, C., & Morigen, M. (2024). Genome and transcriptomic analysis of the adaptation of *Escherichia coli* to environmental stresses. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.

Kathiresan, K. (2012). Importance of mangrove ecosystem. *International journal of marine science*, *2*(10).

Koh, H. L., Teh, S. Y., Kh'Ng, X. Y., & Raja Barizan, R. S. (2018). Mangrove forests: protection against and resilience to coastal disturbances. *Journal of Tropical Forest Science*, *30*(5), 446-460.

Kolde, R., & Kolde, M. R. (2015). Package 'pheatmap'. *R package*, *1*(7), 790.

Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, *28*(24), 3211-3217.

Koskimäki, J. J., Hankala, E., Suorsa, M., Nylund, S., & Pirttilä, A. M. (2010). Mycobacteria are hidden endophytes in the shoots of rock plant [*Pogonatherum paniceum* (Lam.) Hack.](Poaceae). *Environmental microbiology reports*, *2*(4), 619-624.

Kumar, A., & Yadav, A. (2024). Next generation sequencing in Metagenomics and Metatranscriptomics. In *Multi-omics Analysis of the human microbiome: from technology to clinical applications* (pp. 49-75). Singapore: Springer Nature Singapore.

Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, *2014*.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, *9*(4), 357-359.

Lau, J. A., & Lennon, J. T. (2012). Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(35), 14058-14062.

Lencina, A. M., Franza, T., Sullivan, M. J., Ulett, G. C., Ipe, D. S., Gaudu, P., ... & Schurig-Briccio, L. A. (2018). Type 2 NADH dehydrogenase is the only point of entry for electrons into the *Streptococcus agalactiae* respiratory chain and is a potential drug target. *MBio*, *9*(4), 10-1128.

Li, B., Zhou, X., Yao, W., Lin, J., Ding, X., Chen, Q., ... & Liu, J. (2024). NADP-malic enzyme OsNADP-ME2 modulates plant height involving in gibberellin signaling in rice. *Rice*, *17*(1), 52.

Li, C. J., Zhang, Z., Zhan, P. C., Lv, A. P., Li, P., Liu, L., ... & Zhi, X. Y. (2023). Comparative genomic analysis and proposal of *Clostridium yunnanense* sp. nov., *Clostridium rhizosphaerae* sp. nov., and *Clostridium paridis* sp. nov., three novel *Clostridium* sensu stricto endophytes with diverse capabilities of acetic acid and ethanol production. *Anaerobe*, *79*, 102686.

Li, H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics*, *37*(23), 4572-4574.

Liao, H. L., Chen, Y., & Vilgalys, R. (2016). Metatranscriptomic study of common and host-specific patterns of gene expression between pines and their symbiotic ectomycorrhizal fungi in the genus Suillus. *Plos genetics*, *12*(10), e1006348.

Liu, A. R., Wu, X. P., & Xu, T. (2007). Research advances in endophytic fungi of mangrove. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, *18*(4), 912-918.

Liu, S., Wu, Y., Li, Y., Zhang, Z., He, D., Yan, J., ... & Liu, Y. (2024). Genome-Wide Identification and Expression Analysis of Heat Shock Protein 20 (HSP20) Gene Family in

Response to High-Temperature Stress in Chickpeas (Cicer arietinum L.). *Agronomy*, *14*(8), 1696.

Lonard, R. I., Judd, F. W., Summy, K. R., DeYoe, H., & Stalter, R. (2017). The Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: Avicennia germinans (L.) L. *Journal of Coastal Research*, *33*(1), 191-207.

Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15: 1–21.

Lukina, F. A., Nikolaeva, F. V., Fedorov, V. I., Vasilyeva, M. N., & Pinigina, N. M. (2024, October). Species diversity of potato endophytic bacteria in Yakutia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1405, No. 1, p. 012016). IOP Publishing.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one*, *8*(4), e61217.

Mondragón-Díaz, L. F., Molina, A., & Duque, G. (2022). Influence of environmental variables on the spatiotemporal dynamics of water quality in Buenaventura Bay, Colombian Pacific. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(10), 720.

Muteeb, G. (2023). Nanotechnology—A light of hope for combating antibiotic resistance. *Microorganisms*, *11*(6), 1489.

Naskar, S., Mondal, S., & Ankure, S. (2021). Leaf anatomical adaptations of mangroves. *Handbook of halophytes: From molecules to ecosystems towards biosaline agriculture*, 1063-1077.

Niu, K., Ni, Z., Wang, Z., Han, L., Liu, L., Ma, W., ... & Fang, X. (2024). Engineering region flexibility of cellobiohydrolase I for efficient hydrolysis of cellulose based on molecular dynamics simulation. *Industrial Crops and Products, 222*, 119707.

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, *27*(5), 824-834.

O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufo, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, *44*(D1), D733D745.

Ottman, N., Smidt, H., De Vos, W. M., & Belzer, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? Frontiers in cellular and infection microbiology, 2, 104. (2012).

Palit, K., Rath, S., Chatterjee, S., & Das, S. (2022). Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: Threats, vulnerability, and adaptations. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(22), 32467-32512.

Pan, L., Chen, J., Ren, S., Shen, H., Rong, B., Liu, W., & Yang, Z. (2020). Complete genome sequence of *Mycobacterium* Mya-zh01, an endophytic bacterium, promotes plant growth and seed germination isolated from the flower stalk of Doritaenopsis. *Archives of Microbiology*, *202*(7), 1965-1976.

Pérez-Valbuena, G. J. (2007). Historia, geografía y puerto como determinantes de la situación social de Buenaventura. *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional y Urbana; No. 91*.

Prakash, O., Sharma, R., Rahi, P., & Karthikeyan, N. (2015). Role of microorganisms in plant nutrition and health. *Nutrient use efficiency: from basics to advances*, 125-161.

Pramanik, S., Semenova, M. V., M. Rozhkova, A., Zorov, I. N., Korotkova, O., Sinitsyn, A. P., & Davari, M. D. (2021). Engineered cellobiohydrolase I for sustainable degradation of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering, 118*(10), 4014-4027.

Primavera, J. H., Friess, D. A., Van Lavieren, H., & Lee, S. Y. (2019). The mangrove ecosystem. *World seas: an environmental evaluation*, 1-34.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL http://www.rstudio.com/.

Raimi, A., & Adeleke, R. (2021). Bioprospecting of endophytic microorganisms for bioactive compounds of therapeutic importance. *Archives of Microbiology*, *203*(5), 19171942.

Rampadarath, S., Bandhoa, K., Puchooa, D., Jeewon, R., & Bal, S. Metatranscriptomics analysis of mangroves habitats around Mauritius. (2018). Metatranscriptomics analysis of mangroves habitats around Mauritius. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34(4), 1-11.

Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G. R., Rajasabapathy, R., & Meena, R. M. (2012). Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. *Botanica Marina*, *55*(3), 269-279.

Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., Deb, S., Giagnoni, L., Tondello, A., Stevanato, P., ... & Rivas, R. (2024). Metataxonomic analysis of endophytic bacteria of blackberry (Rubus ulmifolius Schott) across tissues and environmental conditions. *Scientific Reports*, *14*(1), 13388.

Salas-Leiva, D. E., Mayor-Durán, V. M., & Toro-Perea, N. (2009). Genetic diversity of the black mangrove (Avicennia germinans L.) in Colombia. *Aquatic botany*, *91*(3), 187-193.

Salazar Arellano, D., Ospina Serna, L. M., & Cultid Padilla, J. J. (2019). La educación ambiental como estrategia de uso, manejo y conservación del ecosistema de manglar en el Distrito Especial Industrial, Portuario, Biodiverso y Ecoturístico de Buenaventura.

Samad, A., Trognitz, F., Compant, S., Antonielli, L., & Sessitsch, A. (2017). Shared and host-specific microbiome diversity and functioning of grapevine and accompanying weed plants. *Environmental Microbiology*, *19*(4), 1407-1424.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, *183*, 92-99.

Santoyo, G. (2022). How do plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of advanced research*, *40*, 45-58.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 20682069.

Sellamuthu, S., Singh, M., Kumar, A., & Singh, S. K. (2017). Type-II NADH Dehydrogenase (NDH-2): a promising therapeutic target for antitubercular and antibacterial drug discovery. *Expert opinion on therapeutic targets*, *21*(6), 559-570.

Shahzad, R., Bilal, S., Imran, M., Khan, A. L., Alosaimi, A. A., Al-Shwyeh, H. A., ... & Lee, I. J. (2019). Amelioration of heavy metal stress by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 in rice by regulating metabolic changes: potential for bacterial bioremediation. *Biochemical Journal*, *476*(21), 3385-3400.

Soldan, R., Mapelli, F., Crotti, E., Schnell, S., Daffonchio, D., Marasco, R., ... & Cardinale, M. (2019). Bacterial endophytes of mangrove propagules elicit early establishment of the natural host and promote growth of cereal crops under salt stress. *Microbiological research*, *223*, 33-43.

Subedi, S. C., Allen, P., Vidales, R., Sternberg, L., Ross, M., & Afkhami, M. E. (2022). Salinity legacy: Foliar microbiome's history affects mutualist-conferred salinity tolerance. *Ecology*, *103*(6), e3679.

Sun, H. F., Wang, X. N., Wang, L. L., LI, Y., Ma, L. J., & Li, X. M. (2024). TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF RESPONSE TO Pb STRESS IN ENDOPHYTE INFECTED RICE ROOT TISSUE. *Applied Ecology & Environmental Research*, *22*(1).

Sun, J., Chang, M., Li, H., Zhang, Z., Chen, Q., Chen, Y., ... & Wan, X. (2019). Endophytic bacteria as contributors to theanine production in *Camellia sinensis*. *Journal of agricultural and food chemistry, 67*(38), 10685-10693.

Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., & Dutta, S. K., Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. Annals of Microbiology, 63(1), 1-19. (2013).

Tyagi, J., Chaudhary, P., Mishra, A., Khatwani, M., Dey, S., & Varma, A. (2022). Role of endophytes in abiotic stress tolerance: with special emphasis on *Serendipita indica*. *International Journal of Environmental Research*, *16*(4), 62.

Vaishnav, A., Shukla, A. K., Sharma, A., Kumar, R., & Choudhary, D. K. (2019). Endophytic bacteria in plant salt stress tolerance: current and future prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*, 650-668.

Vidal, L., Molina, A., & Duque, G. (2021). Incremento de la contaminación por microplásticos en aguas superficiales de la bahía de Buenaventura, Pacífico colombiano.

Wang, S., Jiang, L., Zhao, Z., Chen, Z., Wang, J., Alain, K., ... & Shao, Z. (2024). Chemolithoautotrophic diazotrophs dominate dark nitrogen fixation in mangrove sediments. *The ISME Journal*, *18*(1), wrae119.

Warnecke & Hess, 2009. A perspective: metatranscriptomics as a tool for the discovery of novel biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, *142*(1), 91-95.

Westreich, S. T., Treiber, M. L., Mills, D. A., Korf, I., & Lemay, D. G. (2018). SAMSA2: a standalone metatranscriptome analysis pipeline. *BMC bioinformatics*, *19*(1), 1-11.

White, E. J., Venter, M., Hiten, N. F., & Burger, J. T. (2008). *Modified cetyltrimethylammonium bromide method improves robustness and versatility: the benchmark for plant RNA extraction* (Vol. 3, No. 11, pp. 1424-1428). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Yao, H., Sun, X., He, C., Maitra, P., Li, X. C., & Guo, L. D. (2019). Phyllosphere epiphytic and endophytic fungal community and network structures differ in a tropical mangrove ecosystem. *Microbiome*, *7*, 1-15.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina PairedEnd reAd mergeR. *Bioinformatics*, *30*(5), 614-620.

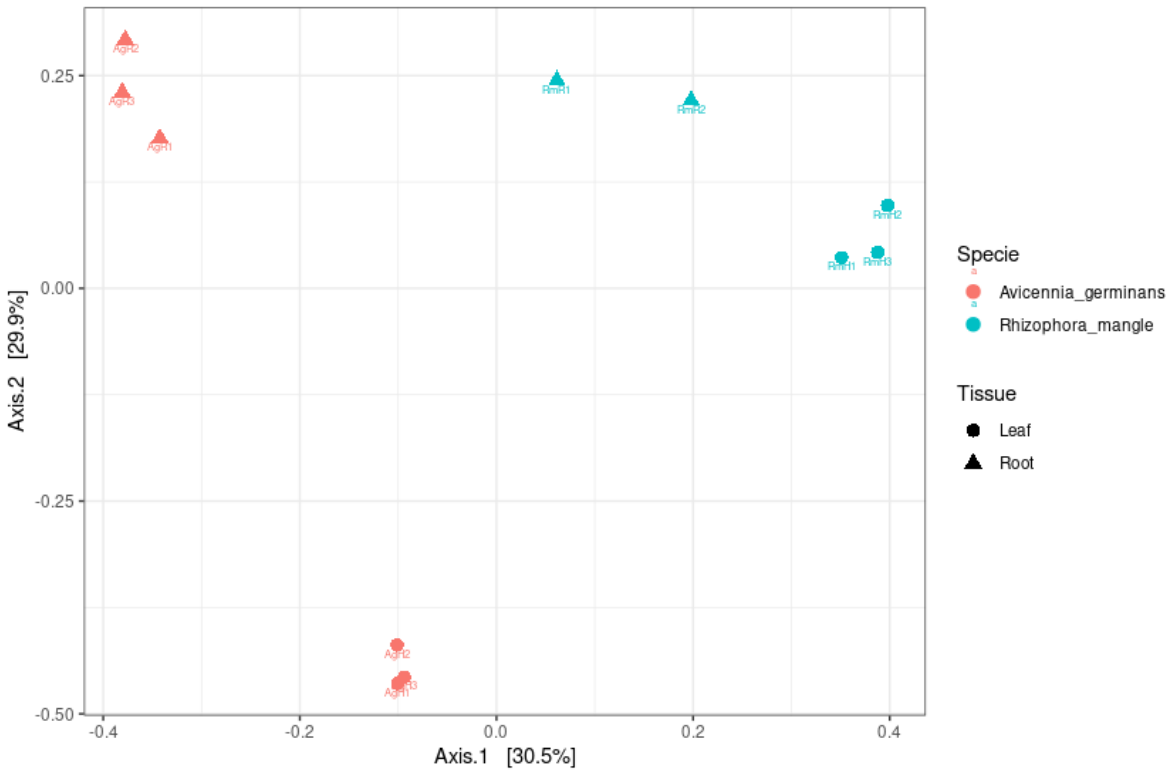
Zhou, X., Li, J., Wang, Y., Liang, X., Zhang, M., Lu, M., ... & Jiang, C. (2022). The classical SOS pathway confers natural variation of salt tolerance in maize. *New Phytologist*, *236*(2), 479-494.

Anexos

Anexo 1. Parámetros fisicoquímicos tomados en el suelo y el agua de la zona de muestreo

Parámetros fisicoquímicos del suelo			**Parámetros fisicoquímicos del agua**		
Parámetro	**Resultado**	**Unidad**	**Parámetro**	**Resultado**	**Unidad**
pH	5.91	pH	**pH**	7.42	pH

Conductividad eléctrica	30.2	dS/m	**Potencial redox**	119.4	mV
Carbono orgánico oxidable	1.78	%	**Saturación de oxígeno**	81.3	%
Materia orgánica	3.07	%	**Oxígeno disuelto**	5.14	ppm
Nitrógeno total	0.148	%	**Conductividad**	41.4	mS/cm
Potasio intercambiable	642	mg/kg	**Conductividad**	71.7	mS/cmA
Calcio intercambiable	792	mg/kg	**Resistividad**	0.8	Ω-cm
Magnesio intercambiable	994	mg/kg	**Sólidos disueltos totales**	24.14	ppm
Sodio intercambiable	4480	mg/kg	**Salinidad**	18.5	σT
Fósforo	20.5	mg/kg	**Turbiedad**	38.4	cm
Azufre	489	mg/kg	**Temperatura**	30.4	°C



Anexo 2. Análisis de coordenadas principales basado en la anotación taxonómica de las muestras, construido mediante el método de distancias de Jaccard.

Anexo 3. Parámetros de los ensamblajes de los metatranscriptomas.

Parámetros de los ensamblajes	***Avicennia germinans***	***Rhizophora mangle***
Número de contigs	17052	7513
Contig más largo (pb)	9636	5658
Longitud total (pb)	7825734	2430642
N50	876	711
N90	549	525
L50	1599	324
L90	4277	808