

UNIVERSIDAD DEL VALLE



Microbiota y microbioma endófito del tejido foliar y radicular de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) y *Avicennia germinans* L. (Acanthaceae) en la Bahía de Buenaventura, Colombia

Valentina Cárdenas Hernández

Director: Nelson Toro Perea, PhD

Maestría en Ciencias - Biología

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Marzo 25 de 2025

Tabla de contenido

Microbiota y microbioma endófito del tejido foliar y radicular de <i>Rhizophora mangle</i> L. Colombia	1
Resumen general:	4
General abstract:	5
Introducción general:	5
Métodos generales:	8
Toma de las muestras	8
Extracción de ADN e identificación molecular de los individuos	9
Secuenciación de los metagenomas	9
Análisis bioinformático de los metagenomas	9
Capítulo 1. Diversidad de la microbiota endófito del tejido foliar y radicular de <i>R. mangle</i> y <i>A. germinans</i>	10
Introducción:	10
Métodos:	12
Procesamiento de las lecturas crudas:	12
Caracterización taxonómica de la microbiota endófito:	13
Resultados:	13
Perfil taxonómico de la microbiota endofítica de hojas y raíces de <i>R. mangle</i> y <i>A. germinans</i>	14
Diversidad de la comunidad de endófitos del tejido foliar y radicular de <i>R. mangle</i> y <i>A. germinans</i> .	16
Discusión:	17
Capítulo 2. Perfil funcional del microbioma endófito del tejido foliar y radicular de <i>R. mangle</i> y <i>A. germinans</i>	22
Introducción:	22
Métodos:	23
Ensamblaje de los metagenomas	24
Caracterización del potencial funcional de la comunidad de endófitos: Anotación funcional de los metagenomas	24
Aporte de la comunidad microbiana en la interacción mangle-endófito: anotación funcional de los metagenomas	24
Resultados:	25
Ensamblaje de los metagenomas	25
Caracterización del potencial funcional de la comunidad de endófitos: Anotación funcional de los metagenomas	26
Aporte de la comunidad microbiana en la interacción mangle-endófito: Anotación funcional específica de los metagenomas	28
Discusión:	30
Capítulo 3. Caracterización de los MAG de microorganismos endófitos del tejido foliar y radicular de <i>R. mangle</i> y <i>A. germinans</i>: Taxonomía y potencial metabólico	34
Introducción:	34

Métodos:.....36

Binning metagenómico: Recuperación de genomas microbianos 36

Identificación taxonómica de los genomas microbianos..... 37

Caracterización del potencial funcional de algunas especies de endófitos: Anotación funcional de 37

los MAG..... 37

Aporte de algunas especies de endófitos en la interacción mangle-endófito: Anotación funcional de los MAG 38

Resultados:.....38

Binning metagenómico: Recuperación de genomas microbianos 38

Relación filogenética de los MAG de las nuevas especies de bacterias 43

Anotación funcional de los MAG : caracterización del potencial funcional de algunas especies de 47

endófitos..... 47

Anotación funcional de los MAG: aporte de algunas especies de endófitos en la interacción mangle-endófito: 50

Discusión:52

Discusión general:55

Conclusiones generales:58

Agradecimientos:58

Literatura citada:.....59

Anexos:..... 77

Microbiota y microbioma endófito del tejido foliar y radicular de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) y *Avicennia germinans* L. (Acanthaceae) en la Bahía de Buenaventura, Colombia

Resumen general:

En los ecosistemas de manglar, la comunidad vegetal presenta diferentes adaptaciones que le permiten afrontar las condiciones ambientales estresantes de la zona intermareal. La interacción de las plantas de mangle con sus microorganismos endófitos se suma a estas adaptaciones para contribuir en el desarrollo exitoso de las plantas de mangle. En la interacción planta-endófito, los microorganismos confieren diversas ventajas a las plantas, como el incremento de la resistencia a condiciones extremas y, además, la producción de diversos compuestos bioactivos que pueden ser importantes en aplicaciones biotecnológicas. El objetivo de esta investigación fue caracterizar a nivel taxonómico y funcional la comunidad de endófitos asociados al tejido foliar y radicular de las especies *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) y *Avicennia germinans* L. (Acanthaceae) presentes en la bahía de Buenaventura, Colombia. Para responder a este objetivo se empleó la secuenciación de metagenomas completos (WMS, por sus siglas en inglés: Whole Metagenome Sequencing), que permitió secuenciar todo el ADN genómico presente en las muestras de tejido foliar y radicular. Posteriormente, mediante herramientas bioinformáticas, se realizó el análisis taxonómico y funcional de la comunidad de endófitos. Se identificó que la microbiota endófitas se constituye principalmente de bacterias, y, en menor proporción, eucariotas, arqueas y virus. También, se determinó que la estructura de la comunidad no se ve influenciada por la planta hospedera, sino por el tipo de tejido, siendo más diversa la comunidad asociada a las raíces. En cuanto al microbioma, se identificaron secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés: Coding DNA Sequences) asociadas a funciones relevantes en la adaptación a un bosque de manglar con un alto nivel de intervención humana. Estas categorías funcionales fueron: Tolerancia a la salinidad, desintoxicación por metales pesados y compuestos xenobióticos, y resistencia al estrés por factores bióticos y abióticos. Asimismo, fue posible ensamblar a partir de los metagenomas 24 genomas bacterianos que corresponderían a especies nuevas. En conclusión, nuestros resultados sugieren que los microorganismos endófitos de *R. mangle* y *A. germinans* actúan en sinergia con las adaptaciones intrínsecas de los árboles de mangle, permitiendo afrontar los retos que implica establecerse en los bosques de manglar.

Palabras clave: Anotación funcional, Bosques de manglar, Caracterización taxonómica, Interacción planta-endófito, MAG, Shotgun sequencing, WMS.

General abstract:

In mangrove ecosystems, the plant community displays several adaptations that allow it to cope with the stressful environmental conditions of the intertidal zone. The interaction of mangrove plants with their endophytic microorganisms adds to these adaptations and contributes to the successful development of mangrove plants. In the plant-endophyte interaction, the microorganisms provide several benefits to the plants, such as increased resistance to extreme conditions and, in addition, the production of several bioactive compounds that may be important in biotechnological applications. The objective of this research was to characterize, at the taxonomic and functional levels, the endophyte community associated with leaf and root tissues of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), and *Avicennia germinans* L. (Acanthaceae) species present in the Bay of Buenaventura, Colombia. To achieve this objective, whole metagenome sequencing (WMS) was used to sequence all the genomic DNA present in the leaf and root tissue samples. Subsequently, taxonomic and functional analysis of the endophyte community was performed using bioinformatics tools. It was found that the endophytic microbiota consists mainly of bacteria and to a lesser extent of eukaryotes, archaea and viruses. It was also found that the structure of the community is not influenced by the host plant, but by the tissue type, with the community associated with roots being more diverse. Regarding the microbiome, coding sequences (CDS) were identified associated with relevant functions in adaptation to a mangrove forest with an elevated level of human intervention. These functional categories were tolerance to salinity, detoxification of heavy metals and xenobiotic compounds, and resistance to biotic and abiotic stress. Likewise, it was possible to assemble from the metagenomes 24 bacterial genomes that would correspond to new species. In conclusion, our results suggest that the endophytic microorganisms of *R. mangle* and *A. germinans* act in synergy with the intrinsic adaptations of mangrove trees, allowing them to face the challenges of establishment in mangrove forests.

Key words: Functional annotation, MAG, Mangrove forests, Plant-Endophyte interaction, Shotgun sequencing, Taxonomic characterization, WMS.

Introducción general:

Los manglares son ecosistemas característicos de la zona intermareal en los trópicos y subtrópicos (Kathiresan & Bingham, 2001). En estos ecosistemas, la comunidad vegetal presenta adaptaciones morfológicas y fisiológicas a condiciones de alta salinidad, alta temperatura, suelos anóxicos, sustratos inestables, inundaciones y vientos fuertes (Naskar & Palit, 2015; Srikanth et al., 2015). Los bosques de manglar brindan diferentes servicios ecosistémicos, por lo cual son de gran relevancia para las comunidades locales y a nivel global (Bimrah et al., 2022). Dentro de los servicios que proveen se encuentran los de abastecimiento como fuente de alimento y materia prima, los de regulación como polinización y

purificación del agua, los culturales como la recreación y el turismo y los de apoyo como mantenimiento de la biodiversidad (Barbier et al., 2011; Primavera et al., 2019; Mitra, 2020).

La biodiversidad en los bosques de manglar incluye invertebrados como crustáceos, moluscos, poliquetos, oligoquetos e insectos. Asimismo, vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Robertson, 1991; Sandilyan & Kathiresan, 2012; Rog et al., 2017). Respecto a la comunidad vegetal, se han reportado 70 especies de mangle que pertenecen a diferentes familias (Polidoro et al., 2010). Además de presentar una gran diversidad de animales y plantas, los ecosistemas de manglar cuentan con una alta diversidad de microorganismos asociados (Thatoi et al., 2013; Lai et al., 2022; Palit et al., 2022). Los microorganismos del manglar participan en diferentes procesos dentro del ecosistema, como lo son la fijación de carbono, la fijación de nitrógeno, el reciclaje de nutrientes, la desnitrificación, la degradación de compuestos tóxicos y el consumo de gases de efecto invernadero (Singh et al., 2020; Lai et al., 2022). Adicional a su importancia en el ecosistema, estos microorganismos cuentan con un alto potencial biotecnológico debido a los metabolitos secundarios que sintetizan (Thatoi et al., 2013; Bolívar-Anillo et al., 2020). Por lo cual, pueden ser empleados en la producción de enzimas, polímeros, combustibles, fármacos y productos agrícolas (Ancheeva et al., 2018; Bolívar-Anillo et al., 2020; Singh et al., 2020).

Dentro de la microbiota del manglar, un grupo de interés biotecnológico son los microorganismos endófitos (Bolívar-Anillo et al., 2020; Chatterjee & Abraham, 2020). Los endófitos se caracterizan por establecer asociaciones dentro de los tejidos vegetales como las hojas y la raíz (Patra et al., 2020). Estos microorganismos son benéficos para la planta hospedera, ya que mejoran su fisiología incrementando la absorción de nutrientes (Patra et al., 2020) y brindan protección contra patógenos, herbívoros y condiciones ambientales adversas debido a la secreción de compuestos biológicamente activos (Chatterjee & Abraham, 2020). La interacción con estos microorganismos contribuye en el establecimiento exitoso de las plantas de mangle en las condiciones ambientales estresantes de la región intermareal (Subedi et al., 2022; Deepika et al., 2023). Los endófitos de las plantas de mangle producen metabolitos secundarios como fenoles, alcaloides, quinonas, esteroides y terpenoides. Además, producen macromoléculas como polisacáridos, proteínas y enzimas (lipasas, amilasas, celulasas, agarasas y proteasas), compuestos que son de gran relevancia en procesos de biorremediación y a nivel industrial (Bibi et al., 2017; Bolívar-Anillo et al., 2020; Chatterjee & Abraham, 2020).

Una estrategia para caracterizar la microbiota y el microbioma asociado al tejido foliar y radicular de plantas de mangle es la metagenómica o genómica ambiental. La secuenciación de metagenomas completos (WMS, por sus siglas en inglés: Whole Metagenome Sequencing) permite secuenciar todo el ADN presente en una

muestra, siendo de utilidad para identificar especies y funciones potenciales, además de ensamblar genomas completos de microorganismos no cultivables (Pérez-Cobas et al., 2020). Para aplicar esta metodología, se fragmenta el ADN total de forma aleatoria y se realiza la secuenciación de los diferentes fragmentos. Este tipo de secuenciación de nueva generación se conoce como “secuenciación Shotgun” (Ranjan et al., 2016). Posterior a la secuenciación se requiere de diversos algoritmos y bases de datos metagenómicos para realizar el perfil taxonómico de la comunidad y para realizar la anotación funcional de los genes microbianos (Liu et al., 2021). La metagenómica se ha convertido en una de las principales herramientas para comprender la participación de los microorganismos endófitos en el desarrollo de las plantas (Fadiji & Babalola, 2020) y, se ha aplicado en diferentes investigaciones, que buscan caracterizar la microbiota asociada al ecosistema de manglar y a las plantas de mangle (Andreote et al., 2012; Simões et al., 2015; Imchen et al., 2018).

Rhizophora mangle L. y *Avicennia germinans* L. son dos de las siete especies de mangle que se encuentran en la bahía de Buenaventura, y a lo largo del pacífico colombiano (Palacios & Cantera, 2017). *R. mangle* es una de las principales especies que constituyen los ecosistemas de manglar en Colombia y es de importancia económica para las comunidades de esta región (Arbeláez-Cortes et al., 2007). Por otra parte, *A. germinans* es empleada por los habitantes de la costa para construcción, alimentación y como planta medicinal (Palacios & Cantera, 2017). Debido a la relevancia ecológica y económica de estas dos especies, es importante caracterizar la microbiota y el microbioma asociados. En el caso de *R. mangle*, se ha reportado que los grupos microbianos asociados pertenecen a los Phyla Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi y Pseudomonadota (Bezerra et al., 2022). Para *A. germinans*, se han identificado endófitos de los géneros *Bacillus*, *Halococcus*, *Halobacillus* y *Staphylococcus* (Figuroa-Negrón, 2018). Sin embargo, estos estudios se han realizado en Brasil y Puerto Rico, y hasta el momento no hay información disponible, basada en datos metagenómicos, sobre los endófitos asociados a especies de mangle en el Pacífico colombiano.

Debido a la falta de información sobre los endófitos asociados con *R. mangle* y *A. germinans* en el Pacífico colombiano, y dada la importancia de estos microorganismos en posibles aplicaciones biotecnológicas, surgen las siguientes preguntas de investigación: 1. ¿Varía la composición taxonómica de la comunidad microbiana según la especie de mangle o el tejido?, 2. ¿La comunidad de endófitos contribuye a la adaptación de las plantas hospederas a las condiciones ambientales de los bosques de manglar?, 3. ¿El potencial metabólico del microbioma podría ser aprovechado en futuras aplicaciones biológicas? y, 4. ¿Es posible caracterizar taxonómica y funcionalmente especies microbianas, no descritas previamente, como endófitas de *R. mangle* y *A. germinans*? Para responder a estas preguntas, este estudio propone realizar la caracterización taxonómica y funcional de los endófitos asociados al tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans* mediante una estrategia metagenómica. Con ello, se espera contribuir al conocimiento sobre

los endófitos de manglar en el Pacífico colombiano y evaluar su potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas.

Métodos generales:

Toma de las muestras

La zona donde se realizó la toma de las muestras corresponde al bosque de manglar ubicado en la bahía de Buenaventura, en el sur occidente colombiano (Anexo 1). Este bosque cuenta con una extensión de 1984.5 Ha y se caracteriza por un alto nivel de intervención humana y contaminación por basura y metales pesados (SIDAP, 2011; Gamboa-García et al., 2020; Bolívar-Anillo et al., 2023). La toma de las muestras se realizó el 14 de junio de 2023 entre las 8:00 y las 11:00 de la mañana, coincidiendo con el nivel más bajo de la marea (Anexo 2). Las condiciones meteorológicas del día del muestreo se encuentran registradas en el Anexo 3. El punto específico de donde se tomaron las muestras corresponde a la desembocadura del río Dagua en el océano Pacífico (3°52'44.887''N, 77°3'44.577''W).

En esta ubicación se recolectó tejido foliar y radicular de tres individuos de *R. mangle* y de tres individuos de *A. germinans*. Los individuos de ambas especies de mangle se encontraban en simpatria con una distancia aproximada de 10 metros entre sí. Previo al proceso de colecta, se realizó un protocolo de desinfección con el objetivo de eliminar los microorganismos de la epífera. En primer lugar, se aplicó hipoclorito de sodio al 2% durante 10 minutos, después etanol al 75% por 5 minutos y, por último, se realizó un lavado con agua destilada durante 3 minutos. Para coleccionar las muestras de tejido foliar, se buscaron hojas que no presentaran signos de enfermedad o daño mecánico y se tomaron directamente del árbol. Para el tejido radicular de *R. mangle* se seleccionó un fragmento de raíz que se encontrara expuesta a la acción de las mareas y mediante un taladro con brocas estériles se extrajo el tejido del interior de la raíz. Para el tejido radicular de *A. germinans*, se tomaron los neumatóforos y mediante tijeras de jardinería se realizaron cortes transversales para obtener el tejido interno. Todas las muestras de tejido se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se transportaron al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad del Valle, donde se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento. Además de las muestras de tejido, se tomó una muestra de suelo para realizar la caracterización de los parámetros fisicoquímicos. Los parámetros fueron analizados en el laboratorio AGRILAB (Bogotá, Colombia). También, mediante una sonda multiparamétrica HANNA HI9892 se determinaron los parámetros fisicoquímicos del agua estuarina del área de muestreo. Las mediciones de los parámetros fisicoquímicos del suelo y del agua se encuentran registradas en el Anexo 4.

Extracción de ADN e identificación molecular de los individuos

Todo el tejido colectado fue macerado con nitrógeno líquido. Posteriormente, se emplearon 100 mg del tejido macerado para realizar la extracción de ADN mediante el kit “InviSorb® Spin Plant Mini Kit” (Invitex), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Al protocolo de extracción se le adicionó una segunda maceración empleando un pistilo esterilizado acoplado a un Dremel, después de agregar el buffer de lisis. Para la evaluación cuantitativa del ADN extraído se empleó el kit “dsDNA BR Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific) y las mediciones se realizaron en el Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific). El ADN, también se evaluó cualitativamente a través de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

A partir del ADN genómico obtenido, se realizó la amplificación y secuenciación de los sistemas *atpI-atpH* y *psbJ-petA*, que corresponden a regiones no codificantes del cloroplasto. Los cebadores empleados y las condiciones para la PCR fueron las descritas por Cerón-Souza et al., (2012). Los amplicones fueron enviados a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) donde se realizó la secuenciación Sanger. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas contra la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés: National Center for Biotechnology Information), para confirmar que el tejido colectado perteneciera a las especies *R. mangle* y *A. germinans*.

Secuenciación de los metagenomas

Una vez se confirmó que el tejido colectado pertenecía a las especies *R. mangle* y *A. germinans*, se envió al menos 1.0 ug de ADN por muestra a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur), para realizar la secuenciación Shotgun. En total, se enviaron tres muestras de tejido foliar y tres muestras de tejido radicular de cada una de las especies de mangle. Para la construcción de las librerías se empleó el kit “TruSeq DNA nano kit”. Después, mediante la plataforma NovaSeq6000 (Illumina) se realizó la secuenciación paired-end de fragmentos de 150 pb, generando 20 GB de información para cada una de las muestras. El ADN total secuenciado correspondía, entonces, al ADN de cada una de las especies de mangle, *R. mangle* y *A. germinans* y al de los microorganismos endófitos asociados al tejido foliar y radicular.

Análisis bioinformático de los metagenomas

En el Capítulo 1, de este documento, se describirá el flujo de trabajo bioinformático empleado para caracterizar la diversidad microbiana asociada a las hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*. En el Capítulo 2, se presentarán los análisis realizados para explorar el potencial funcional a nivel comunitario del metagenoma endófito de estos árboles de mangle. Finalmente, en el capítulo 3, se explicará el enfoque computacional utilizado para la caracterización taxonómica y funcional de los genomas ensamblados a partir de los metagenomas (MAG, por sus siglas en inglés: Metagenome-Assembled Genomes).

Capítulo 1. Diversidad de la microbiota endófito del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*

Introducción:

La diversidad de microorganismos en los bosques de manglar se constituye principalmente de bacterias, hongos y algas, y en menor abundancia arqueas y virus (Thatoi et al., 2013; Ramesh et al., 2024). Esto se debe a la gran cantidad de materia orgánica que se encuentra en este ecosistema y que puede ser aprovechada por los diversos grupos microbianos (Holguin et al., 2001). Dentro de las bacterias se han reportado diferentes grupos con roles ecológicos específicos, como las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Aphanocapsa*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Phyllobacterium*, *Nodularia*, *Rhizobium* y *Trichodesmium* (Holguin et al., 2001; Thatoi et al., 2013), así como bacterias solubilizadoras de fosfato de los géneros *Bacillus*, *Chryseomonas*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Xanthobacter* (Thatoi et al., 2013; Ramesh et al., 2024). En cuanto a los hongos, los principales géneros reportados son *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Halophytophthora*, *Massarina*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Holguin et al., 2001;

Thatoi et al., 2013; Ramesh et al., 2024). Además de los microorganismos presentes en el suelo y en el agua de este ecosistema, un grupo de gran interés en los bosques de manglar son aquellos que habitan dentro o entre las células de los árboles de mangle, conocidos como endófitos (Bolívar-Anillo et al., 2020; Chatterjee & Abraham, 2020).

El estudio de los microorganismos endófitos ha cobrado gran relevancia en los últimos años debido a los beneficios que confieren a sus plantas hospederas y a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas (Venugopalan & Srivastava, 2015; Rai et al., 2021; Negi et al., 2024). Estos microorganismos pueden incrementar la aptitud biológica de la planta hospedera a través de mecanismos directos o indirectos (Yadav & Yadav, 2017). Entre los mecanismos directos se encuentran la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales y la producción de fitohormonas y de sideróforos (Rho et al., 2018; Santos et al., 2018). Por otra parte, los mecanismos indirectos incluyen la degradación de compuestos xenobióticos y metales pesados, así como la producción de metabolitos con actividad antioxidante y antimicrobiana (Kaul et al., 2014). Gracias a su capacidad metabólica, los endófitos se consideran reservorios de compuestos bioactivos, como biofertilizantes, pigmentos, antimicrobianos y nanopartículas. Estos compuestos tienen aplicaciones en la producción de fármacos, la biorremediación, la agricultura sustentable y la generación de biocombustibles (Paul et al., 2020; Dwibedi et al., 2022; Watts et al., 2023).

En los ecosistemas de manglar, se ha identificado una alta diversidad de bacterias y hongos endófitos (Sebastianes et al., 2017). Sin embargo, en la actualidad los bosques de manglar, alrededor del mundo, se encuentran entre los ecosistemas menos caracterizados en términos de microbiomas endófitos (Harrison & Griffin, 2020), lo que resalta la necesidad de desarrollar estudios más exhaustivos aplicando metodologías robustas para su caracterización. Esto es particularmente relevante dado que los microorganismos endófitos desempeñan un papel crucial en la adaptación de la comunidad vegetal de la zona intermareal, aumentando su resistencia a condiciones ambientales extremas (Soldan et al., 2019; Quach et al., 2022). Un ejemplo de ello es la especie de mangle *Bruguiera gymnorhiza* L, en la que se ha identificado que la bacteria endófito *Streptomyces parvulus* VCCM 22513, presenta genes implicados en la tolerancia a la salinidad, las altas temperaturas y los compuestos oxidativos, factores clave en la adaptación a los ecosistemas de manglar (Quach et al., 2022). De manera similar, en *Avicennia marina* (Forssk.) se ha identificado que las cepas *Gordonia terrae* KMP456-M40 y *Bacillus pumilus* KMP123-MS contribuyen al establecimiento de los propágulos en las condiciones extremas de los bosques de manglar (Soldan et al., 2019).

En el caso de los endófitos asociados con *R. mangle* y *A. germinans* la mayoría de la investigación se ha enfocado en metodologías dependientes de cultivo *in vitro*, lo que ha restringido la caracterización de la

microbiota a un subconjunto reducido de microorganismos (Cadamuro et al., 2021; Abiye et al., 2022). Afortunadamente, con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación se ha podido disminuir este vacío de información. Por ejemplo, para *R. mangle*, se ha identificado, a través del metabarcoding, que la estructura de la comunidad bacteriana depende de la geografía y del tipo de tejido (Scherer et al., 2022). No obstante, en este trabajo no se realizó una distinción entre los microorganismos de la endosfera y de la epísfera. Además, al secuenciar exclusivamente el gen 16S se dejaron por fuera a los microorganismos eucariotas (Scherer et al., 2022). En el caso de *A. germinans*, la metodología aplicada, hasta el momento, ha sido la caracterización genómica de cepas que se aislaron del tejido foliar, lo que dejó sin explorar toda la diversidad de microorganismos endófitos no cultivables (Zayas-Rivera, 2018). Estas limitaciones resaltan la necesidad de estudios que empleen estrategias metagenómicas para obtener una visión más completa de la diversidad de la microbiota endófito en estas especies.

Dado el papel ecológico y económico de *R. mangle* y *A. germinans*, y la limitada información sobre su microbiota endófito, es fundamental caracterizar este grupo de microorganismos. Por ello, este capítulo tuvo como objetivo describir su diversidad mediante la identificación taxonómica de los endófitos presentes en hojas y raíces de ambas especies.

Métodos:

Los procedimientos de campo y de laboratorio utilizados para obtener los resultados descritos en este capítulo, ya han sido enumerados en detalle en la metodología general, por lo que en esta sección, solo se detallarán los aspectos bioinformáticos específicos para establecer la diversidad endófito del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*.

Procesamiento de las lecturas crudas:

Una vez obtenidas las secuencias de ADN se realizó el procesamiento de las lecturas crudas. En primer lugar, se empleó el programa FastQC v0.12.1 para evaluar la calidad de las secuencias obtenidas (Andrews, 2010). Después, mediante el programa Trimmomatic v0.39 se filtraron las secuencias de mala calidad, eliminando aquellas que presentaron un puntaje Phred menor a 20 (Bolger et al., 2014). Asimismo, se eliminaron las lecturas que correspondían al ADN de la planta hospedera (*R. mangle* o *A. germinans*), para lo cual, fue necesario ensamblar los genomas de las dos especies de árboles de mangle, ya que, al momento de realizar este análisis dichos genomas no se encontraban disponibles en las base de datos del NCBI (El ensamblaje de estos genomas a partir de las lecturas crudas se detalla en el Anexo 5). Cada una de las librerías se alineó contra el genoma de la especie de mangle correspondiente (*R. mangle* o *A. germinans*) para identificar y descartar las lecturas de origen vegetal. Esta sustracción se realizó utilizando los

programas Bowtie2 v2.5.4 y SamTools v1.21 (Li et al., 2009; Langmead & Salzberg, 2012). Al final del procesamiento se conservaron aquellas lecturas que no se alinearon con los genomas de los árboles de mangle, obteniendo, así, las secuencias de los microorganismos endófitos. Las lecturas limpias se encuentran depositadas en el NCBI bajo el BioProject ID: PRJNA1215819 (BioSamples: SAMN46420086, SAMN46420087, SAMN46420088, SAMN46420089, SAMN46420090, SAMN46420091, SAMN46420097, SAMN46420098, SAMN46420099, SAMN46420100, SAMN46420101, SAMN46420102).

Caracterización taxonómica de la microbiota endófitas:

Al obtener las lecturas limpias y exclusivas de los microorganismos, se realizó el análisis taxonómico. Para ello, se utilizó el software Kraken2 v2.1.3 (Wood et al., 2019), y se anotó cada una de las librerías contra las bases de datos de bacterias, hongos, protozoos, arqueas y virus del NCBI (Wood et al., 2019). Los archivos, resultantes de la anotación taxonómica realizada con Kraken2 v2.1.3, se transformaron en archivos “.biom” mediante el programa kraken-biom v1.0.1 (Dabdoud, 2016) y se importaron en Rstudio como un objeto del paquete Phyloseq v 3.20 (McMurdie et al., 2013; RStudio Team, 2020). Con el fin de evitar falsos positivos, se eliminaron aquellas asignaciones taxonómicas con una abundancia menor a 10 lecturas. Posteriormente, se estimó la diversidad alfa mediante el cálculo de la riqueza observada y los índices de Shannon, Simpson y Chao1 (McMurdie et al., 2013). En cuanto a la diversidad beta, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en matrices de distancia de Bray-Curtis y Jaccard (McMurdie et al., 2013). Además, se realizó una prueba PERMANOVA para evaluar si la composición de la microbiota endófitas dependía del tipo de tejido o de la especie de la planta hospedera (McMurdie et al., 2013).

Resultados:

La secuenciación shotgun de las seis muestras de ADN generó 949.368.409 lecturas crudas, de las cuales se conservaron 84.343.609 después del procesamiento (Anexo 6). En general, para ambas especies de mangle, las librerías correspondientes a las muestras de tejido radicular conservaron una mayor cantidad de lecturas en comparación a las muestras de tejido foliar (Figura 1).

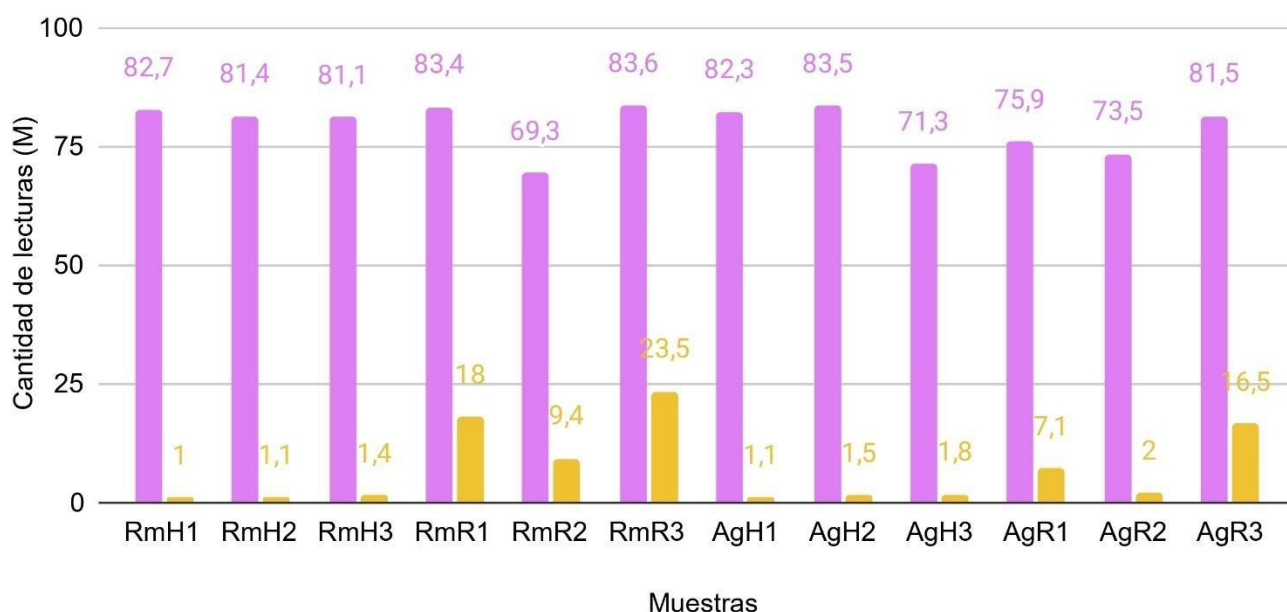


Figura 1. Cantidad de lecturas antes y después de la eliminación del genoma de la planta hospedera (*R. mangle* o *A. germinans*). Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular. Las barras rosadas representan las lecturas crudas y las barras amarillas las lecturas procesadas.

Perfil taxonómico de la microbiota endofítica de hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*.

El análisis taxonómico de las 12 librerías de ADN permitió clasificar entre el 8,19 % y el 24,7 % de las lecturas en las librerías de *R. mangle*, y entre el 6,01 % y el 46,5 % en las de *A. germinans*. La cantidad de lecturas identificadas fue suficiente para caracterizar adecuadamente la comunidad microbiana, ya que las curvas de rarefacción mostraron una tendencia a estabilizarse (Anexo 7).

Se observó que el microbioma endófito del tejido foliar y radicular se encontraba constituido principalmente por bacterias, seguido de eucariotas, y en menor abundancia arqueas y virus (Anexo 8). Dentro de las bacterias, el grupo más abundante fue el Phylum Pseudomonadota (antes Proteobacteria), (Anexo 9), y a su vez, dentro de este grupo los géneros con mayor cantidad de lecturas fueron *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (Figura 2A). Además, se identificaron los géneros *Alcaligenes*, *Xhantomonas* y *Yersinia* exclusivamente en las muestras de *R. mangle* (Figura 2A). En cuanto a los hongos, el Phylum Ascomycota fue el más abundante, y dentro del mismo los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Fusarium* fueron los más relevantes (Figura 2B). También, se encontró que el género *Tetrapisispora* fue específico del tejido foliar de *R. mangle* y que el género *Ascochyta* fue exclusivo del tejido radicular de *A. germinans* (Figura 2B). Con relación a las arqueas, el Phylum Euryarchaeota fue el más dominante y los géneros más representativos fueron *Halobaculum*, *Halorubrum*, *Methanobacterium*, *Methanolobus* y *Natrinema* (Figura

2C). Por último, de los virus, el Phylum de mayor abundancia fue Uroviricota, resaltando los géneros *Andrhavirus*, *Menderavirus* y *Roseblumvirus*. Además, el género *Thornevirus* fue específico del tejido foliar de *A. germinans* (Figura 2D).

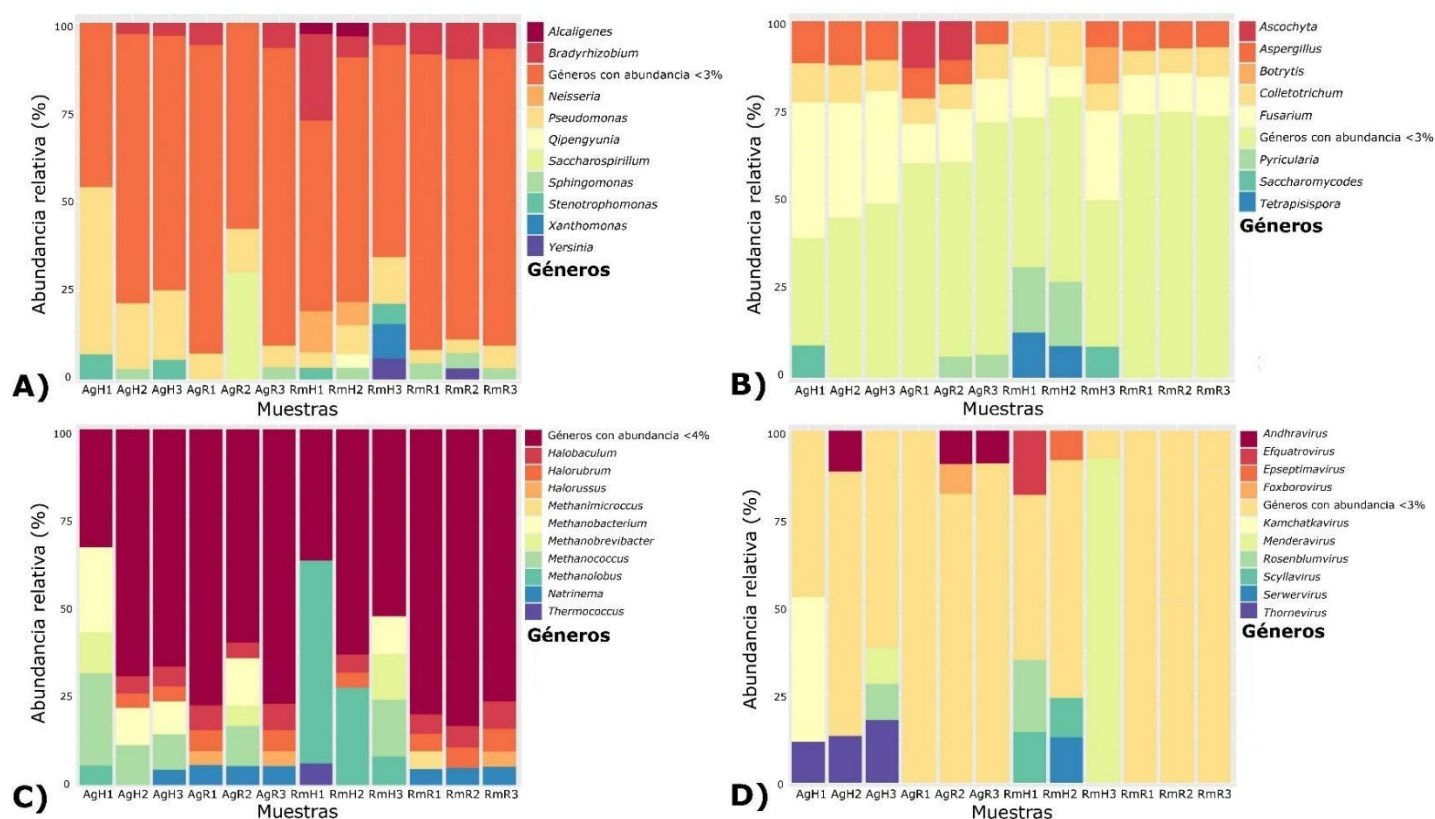


Figura 2. Géneros dominantes dentro de los Phyla más abundantes asociados con el tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. A) Phylum Pseudomonadota. B) Phylum Ascomycota. C) Phylum Euryarchaeota. D) Phylum Uroviricota. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.

Diversidad de la comunidad de endófitos del tejido foliar y radicular de R. mangle y A. germinans.

Los índices de diversidad alfa mostraron que la comunidad de endófitos del tejido radicular es más diversa que la del tejido foliar (Figura 3). La riqueza observada fue mayor en las muestras de raíces y neumatóforos, en comparación con las muestras de hojas (Figura 3). Este patrón también se evidenció en los índices de Shannon y Chao1, siendo las muestras de tejido radicular las que presentaron valores más altos (Figura 3). Para el índice de Simpson, todas las muestras tomaron un valor de aproximadamente 0.99 a excepción de la segunda muestra de tejido foliar de *R. mangle* (RmH2), la cual presentó un índice de 0.80 y la tercera muestra de tejido foliar de *A. germinans* (AgH3), que tuvo un valor de 0.55 (Figura 3).

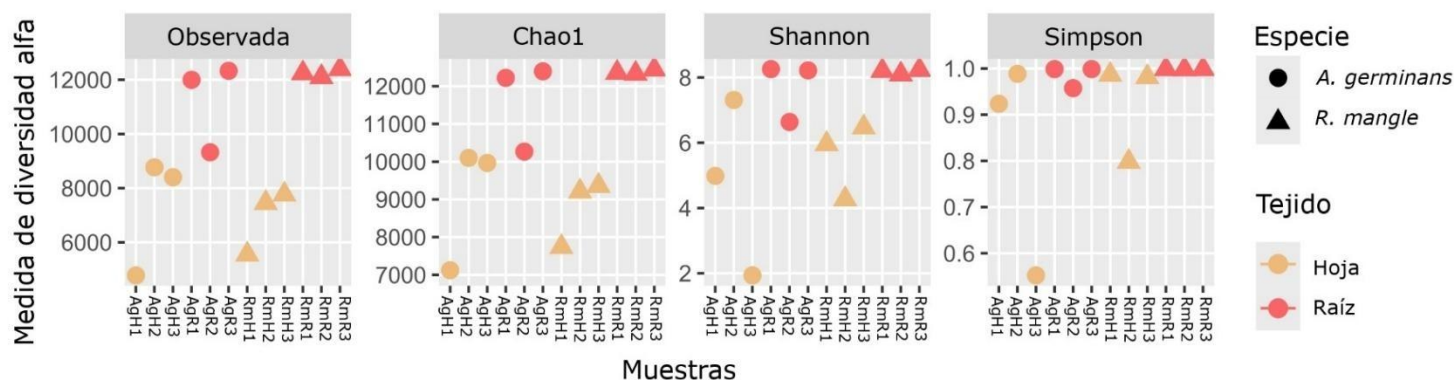


Figura 3. Índices de diversidad alfa de la microbiota asociada al tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.

Por otra parte, se determinó que la estructura de la comunidad de endófitos de *R. mangle* y *A. germinans*, depende del tipo de tejido y no de la especie de la planta hospedera. Esto se pudo evidenciar en el PCoA, ya que hubo una tendencia a formar dos agrupaciones separando las muestras de hojas y de raíces (Figura 4). Adicionalmente, el PERMANOVA mostró que existen diferencias significativas entre la comunidad de

endófitos de las hojas y las raíces para ambas especies ($F=5.7377$, valor- $p=0.007$). Sin embargo, esta misma prueba estadística no detectó diferencias entre las comunidades de microorganismos endófitos de *R. mangle* y *A. germinans* ($F=1.4538$, valor- $p=0.212$).

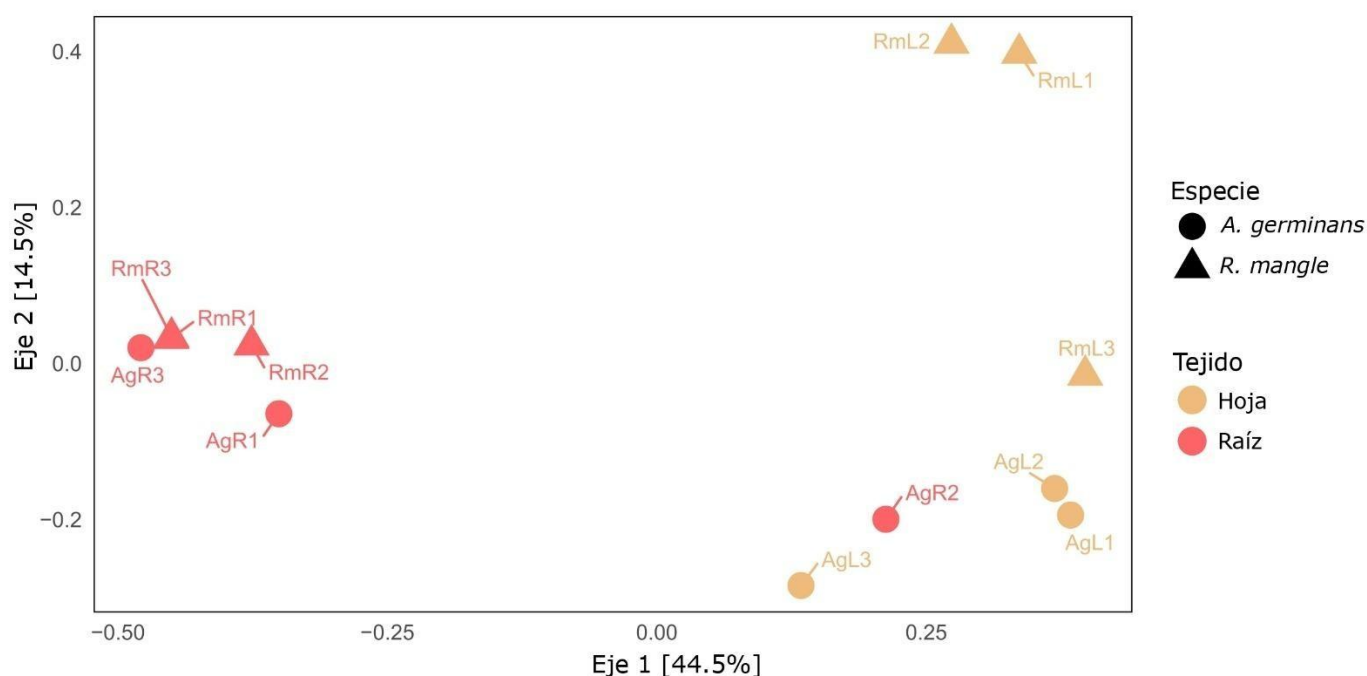


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA). Influencia de la especie de planta hospedera y el tipo de tejido sobre la composición taxonómica de la microbiota de *R. mangle* y *A. germinans*. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.

Discusión:

En este capítulo se realizó una caracterización detallada de la microbiota endófitas asociada al tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Para ello, se empleó la metodología WMS, que permitió secuenciar diversas regiones genómicas de las especies que conforman estas comunidades. Se encontró que la microbiota endofítica de ambas especies estaba compuesta principalmente por bacterias, seguida de hongos,

con una menor proporción de arqueas y virus. Además, se identificó que la estructura de la comunidad microbiana depende del tipo de tejido (foliar o radicular) y no de la especie de planta hospedera. Estos resultados sugieren que, las condiciones ambientales del manglar ejercen presiones de selección sobre los microorganismos del entorno y que, aquellos capaces de establecerse como endófitos, enfrentan nuevas presiones selectivas según el tipo de tejido.

El grupo bacteriano más abundante correspondió al Phylum Pseudomonadota (Figura 2A, Anexo 9). Esto se puede atribuir a que este grupo de bacterias se adapta a condiciones ambientales fluctuantes (Tong et al., 2019), como es el caso de los bosques de manglar donde los diferentes niveles de la marea a lo largo del día influyen sobre la disponibilidad de nutrientes y oxígeno (Laux et al., 2024). Por ejemplo, el día que se tomaron las muestras, la altura de la marea varió desde 1.19 a 4.34 m (Anexo 2), lo que evidencia las condiciones ambientales estresantes que enfrentan los microorganismos del Phylum Pseudomonadota. Este resultado es coherente con lo que se ha encontrado en otras investigaciones, donde se ha postulado al Phylum Pseudomonadota como parte del microbioma esencial de los ecosistemas de manglar (Zhang et al., 2022; Costa et al., 2023). Este grupo de bacterias es dominante tanto en muestras de sedimento, como de rizosfera y del interior de los tejidos (Muwawa et al., 2021; Costa et al., 2023; Sui et al., 2023), lo que indica que cuentan con adaptaciones para la vida libre y para interactuar en la superficie y dentro de los tejidos de plantas hospederas.

Dentro del Phylum Pseudomonadota resaltaron por su alta dominancia diversos géneros de bacterias (Figura 2A, Anexo 9). En el género *Bradyrhizobium* se encuentran especies diazótrofes que promueven el crecimiento vegetal de la planta hospedera (Avontuur et al., 2019). La presencia de este grupo se puede atribuir a que los ecosistemas de manglar se caracterizan por tener bajos niveles de nitrógeno en el suelo, debido a que la acción de las mareas remueve los detritos que contienen este elemento (Inoue et al., 2019). En el sitio de muestreo, el nitrógeno total fue del 0.148% (Anexo 4), un valor considerado bajo, ya que se encuentra en el rango de 0.075–0.150% (Ministerio de Agroindustria, s.f.). Sin embargo, solo entre el 1.5 y 3% del nitrógeno total corresponde a formas inorgánicas asimilables por las plantas de mangle (Agrolab, s.f.). Por este motivo, se plantea que los individuos del género *Bradyrhizobium* podrían estar supliendo las deficiencias de nitrógeno en *R. mangle* y *A. germinans*.

En cuanto al género *Pseudomonas*, se plantea que la razón por la cual se encontró en gran abundancia es por la alta cantidad de materia orgánica disponible en los manglares (Mondragón-Díaz et al., 2022), ya que, estas bacterias participan en la etapa final de descomposición de los residuos vegetales (Palit et al., 2022). Según Julca-Otiniano et al., (2006), son pocos los casos dónde la materia orgánica en los suelos supera el

2%, no obstante, en la zona de muestreo la materia orgánica presentó una magnitud de 3.07% (Anexo 4), lo que soporta la hipótesis de que las bacterias del género *Pseudomonas* se encuentran aprovechando este recurso. A partir de muestras de suelo del manglar se ha identificado que la especie *Pseudomonas aeruginosa* es halotolerante y presenta características de promoción de crecimiento vegetal (Saha & Sen, 2024). Además, diferentes especies de *Pseudomonas* se han reportado como endófitos de árboles de mangle. De los neumatóforos de *Avicennia officinalis* L. se ha aislado la especie *Pseudomonas medocina*, la cual tiene la capacidad de degradar compuestos xenobióticos (Devi & Sugunan, 2020). También, a partir de tejido radicular de mangle se ha aislado la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, la cual ha despertado interés biotecnológico por la producción de un compuesto biosurfactante con actividad antimicrobiana (Irfan et al., 2024). Estos estudios destacan la presencia de diversas especies de *Pseudomonas* en ambientes hipersalinos. La alta abundancia observada para este género bacteriano respalda su posible rol en la descomposición de materia orgánica.

Con relación al género *Sphingomonas* planteamos que su presencia en las hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans* se debe a que las bacterias de este grupo cuentan con diferentes mecanismos para afrontar el estrés salino. Si bien, la salinidad registrada al momento de tomar las muestras fue de 18.5 PSU (Anexo 4), Mondragón-Díaz et al., (2022) han reportado que en la bahía de Buenaventura este parámetro presenta una variación temporal que depende de las lluvias y que fluctúa entre 15.8 Y 22.2 PSU, lo que representa un estrés salino constante para la comunidad vegetal del bosque de manglar y sus microorganismos asociados. En la especie halófila *Suaeda salsa* L. se ha identificado que la bacteria *Sphingomonas prati* contribuye en la resistencia al estrés salino al aumentar la producción de azúcares solubles que actúan como osmoprotectores y potenciando la respuesta antioxidante de la planta (Guo et al., 2021). También, se ha reportado que este género de bacterias promueve el crecimiento vegetal en condiciones de estrés por salinidad y metales pesados (Asaf et al., 2020), como lo son las condiciones de la zona de muestreo (Gamboa-García et al., 2020; Bolívar-Anillo et al., 2023). Por ejemplo, en plántulas de *Avicennia marina* se ha demostrado que la cepa *Sphingomonas* sp.-LK11 tiene la capacidad de degradar compuestos xenobióticos como el diésel (Khan et al., 2022).

Adicional a los grupos dominantes de bacterias, se identificaron diferentes géneros del grupo Ascomycota como parte relevante de la microbiota (Figura 2B). Para los ecosistemas de manglar se ha determinado que la diversidad de hongos depende de parámetros como la temperatura, la salinidad, el pH, la presencia de contaminantes, entre otros (Devadatha et al., 2021). Además, son comunes los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* y *Fusarium*, lo que concuerda con los resultados obtenidos (Devadatha et al., 2021). Se ha reportado que estos taxa contribuyen al reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de materia

orgánica (de Souza et al., 2013), función que posiblemente se encuentran desempeñando dentro del ecosistema de manglar y que contribuye en la interacción planta-microorganismo. Con relación al género *Tetrapisispora*, este se encontró en las hojas de *R. mangle*, pero no en las de *A. germinans* (Figura 2B). Proponemos que esto se asocia con las diferentes estrategias que emplean ambos árboles de mangle para tolerar la sal. Al acumular la sal en las hojas o excretarla mediante glándulas de sal se genera una regulación diferencial de la colonización fúngica (Gilbert et al., 2022), lo que posiblemente explicaría por qué algunos grupos se asocian con el tejido de una de las dos especies.

Con respecto al componente de la microbiota que se identificó en menor abundancia se encontraban las arqueas y los virus (Figura 2C y 2D). Diferentes investigaciones han reportado que las arqueas desempeñan funciones relevantes dentro de los ecosistemas de manglar (Zhang et al., 2021). Por ejemplo, las arqueas del Phylum Euryarchaeota cumplen funciones relacionadas con la producción y oxidación de metano y los procesos de nitrificación (Zhang et al., 2021a; Zhang et al., 2021b; Meng et al., 2022). Por otra parte, la presencia de individuos del Phylum Euryarchaeota se ha asociado a manglares contaminados por hidrocarburos (Zhang et al., 2021a). En la desembocadura del río Dagua, donde se hizo el muestreo, Rosero *et al.*, (2008) reportaron la presencia de estos compuestos en los sedimentos, lo que podría explicar la presencia de este grupo de microorganismos. Hasta el momento la caracterización de las arqueas se ha enfocado en los microorganismos del suelo y de la rizosfera (Mendes et al., 2012; Maysaroh et al., 2024), por lo que la identificación de endófitos de los géneros como *Halobaculum*, *Halorubrum*, *Methanobacterium*, *Methanolobus* y *Natrinema* representa un gran aporte en esta línea de investigación. Con relación a la fracción viral de la microbiota, ésta ha sido la que ha recibido menos atención de todos los grupos. Sin embargo, se conoce que influye en los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas de manglar y que se estructura principalmente por el agua marina que llega a los estuarios (Jin et al., 2019; Zhu et al., 2024). Como parte de esta investigación se reporta que los géneros *Andrhavirus*, *Menderavirus*, *Roseblumvirus* y *Thornevirus* tienen el potencial de actuar como endófitos.

La caracterización taxonómica de la microbiota asociada al tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans* mostró que, en ambas especies, el tejido, determina la estructura de la comunidad de endófitos, siendo más diversas la microbiota de las raíces (Figuras 3 y 4). La gran diversidad de endófitos en las raíces puede atribuirse a que este tejido se encuentra en contacto directo con el suelo, zona de alta actividad microbiana (Glick, 2020). Sumado a esto, en las hojas la diversidad de endófitos puede ser menor debido a que las condiciones ambientales, como temperatura, radiación UV y humedad, son menos estables, en comparación con las raíces, lo que limita el establecimiento y la proliferación de los endófitos (Peng et al., 2022). Por otra parte, Harrison & Griffin (2020) han reportado que el tipo de tejido es uno de los factores

principales que determinan la composición de la comunidad de endófitos asociados dentro de una misma planta. Este patrón ha sido observado, previamente, en diferentes investigaciones, donde los endófitos del tejido foliar son diferentes a los del tejido radicular (Cregger et al., 2018; Peng et al., 2022). En árboles de mangle también se ha evidenciado esta estructura de la microbiota, por ejemplo, para la especie *R. mangle* se ha identificado, mediante metabarcoding, que los endófitos bacterianos difieren entre la rizosfera y los diferentes tejidos de la planta (tallos, hojas, flores y frutos), (Scherer et al., 2022).

En síntesis, esta investigación proporciona una caracterización detallada de la microbiota endófito de *R. mangle* y *A. germinans*, revelando que la composición de estas comunidades está determinada por el tipo de tejido y no por la especie hospedera. Se identificó una alta diversidad de bacterias, hongos, arqueas y virus, con una notable dominancia del Phylum Pseudomonadota, cuyas especies cuentan con adaptaciones claves para afrontar las condiciones fluctuantes del ecosistema de manglar. Destacaron los géneros *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, que posiblemente se encuentren contribuyendo en la fijación de nitrógeno, la descomposición de materia orgánica y la tolerancia al estrés salino, respectivamente. Además, se reportó por primera vez la presencia de arqueas y virus endófitos en estos árboles de mangle. Los hallazgos de este capítulo amplían el conocimiento sobre la ecología de los endófitos en ambientes extremos y su posible rol en la interacción mangle-endófito.

Capítulo 2. Perfil funcional del microbioma endófito del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*

Introducción:

En el estudio de la interacción planta-endófito, las herramientas ómicas se han incorporado gradualmente a las técnicas convencionales, que incluyen métodos de observación directa y enfoques dependientes de cultivo (Subudhi et al., 2018). Estrategias como los microarreglos, la secuenciación de genomas completos, la metagenómica y la metatranscriptómica se han consolidado como herramientas fundamentales para comprender el papel de los microorganismos endófitos en su interacción con las plantas hospederas (Kaul et al., 2016; Mukherjee et al., 2025). Debido al papel fundamental de los endófitos en la adaptación de la comunidad vegetal a las condiciones extremas del ecosistema de manglar, como la salinidad y la variabilidad en la disponibilidad de oxígeno (Soldan et al., 2019; Quach et al., 2022), es relevante desarrollar investigaciones que empleen metodologías ómicas para caracterizar su función en este ambiente.

Además de permitir caracterizar los diferentes grupos de microorganismos endófitos no cultivables, la metagenómica contribuye en la identificación del potencial metabólico de los microbiomas (Kaul et al., 2016; Mukherjee et al., 2025). Aunque en los bosques de manglar las estrategias metagenómicas se han empleado principalmente para caracterizar la microbiota de los sedimentos y el agua estuarina (Ghosh et al., 2022; Zhang et al., 2023), el estudio de los microorganismos endófitos sigue siendo limitado. Estas investigaciones han encontrado que las capacidades metabólicas del microbioma responden a las condiciones fluctuantes de este ecosistema, ya que el cambio constante en los niveles de la marea afecta la disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Laux et al., 2024). Por ejemplo, se han identificado funciones relacionadas con el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del azufre y del hidrógeno (Zhang et al., 2023; Laux et al., 2024; Yan et al., 2024). Además, de las funciones del metabolismo primario como las mencionadas anteriormente, la metagenómica ha permitido explorar funciones del metabolismo secundario en los sedimentos de manglar, como la producción de fitohormonas y compuestos con actividad antimicrobiana, actividades de gran interés para las aplicaciones biotecnológicas (Marfil-Santana et al., 2021).

El estudio de la capacidad funcional de los endófitos asociados a los árboles de mangle es fundamental para comprender los mecanismos de adaptación de sus plantas hospederas a este ecosistema (Soldan et al., 2019; Quach et al., 2022). Con relación a la tolerancia a la salinidad, mediante la combinación de enfoques dependientes de cultivo y de metabarcoding se pudo establecer que la presencia de glándulas de sal en las hojas influye en la taxonomía y función de los microorganismos asociados a la filosfera, resaltando géneros como *Bacillus*, *Fulvimarina*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y *Salinisphaera* (Yang et al., 2024). También, se

han reportado microorganismos asociados a la rizosfera de *Acanthus ilicifolius* L., *Avicennia marina* y *Sonneratia alba* Sm., capaces de promover el crecimiento vegetal en presencia de metales pesados (Fátima et al., 2024). Además, mediante metabarcoding y metagenómica se ha identificado que los microorganismos del sedimento tienen la capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos (Haldar & Nazareth, 2018; Luo et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento se ha explorado poco sobre cómo los microorganismos no cultivables de la endosfera participan en los procesos adaptativos antes mencionados. El uso de enfoques como la metagenómica de genomas completos permitiría comprender mejor estas interacciones microbianas, las cuales siguen siendo poco exploradas (Fadiji & Babalola, 2020).

En los últimos años, la metagenómica se ha situado como una herramienta esencial en la caracterización taxonómica, funcional e identificación del potencial biotecnológico de los microorganismos endófitos (Adeleke et al., 2023). En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas, la metagenómica ha sido empleada para identificar especies que presentan genes relacionados con diversas funciones. Por ejemplo, aquellas especies microbianas, que cuentan con la capacidad de degradar compuestos xenobióticos como metales pesados y contaminantes, son de gran interés para aplicaciones en procesos de biorremediación (Kumar et al., 2022). Las especies de microorganismos que presentan genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, la protección ante patógenos y condiciones ambientales estresantes tienen potencial para ser utilizadas en el desarrollo de estrategias para la agricultura sostenible (Kuźniar et al., 2019; de Medeiros Azevedo et al., 2021). Los endófitos son un grupo de interés biotecnológico debido a que producen compuestos bioactivos que pueden ser empleados en la fabricación de fármacos, biocombustibles, biofertilizantes, biopesticidas, entre otros (Kaul et al., 2016; Paul et al., 2020; Dwibedi et al., 2022; Watts et al., 2023).

Teniendo en cuenta la importancia de las capacidades metabólicas de los endófitos asociados con los árboles de mangle, es relevante emplear estrategias como la metagenómica para contribuir en el entendimiento de la interacción mangle-endófito e identificar funciones de interés biotecnológico. Como respuesta a los vacíos de conocimiento en esta área, el objetivo específico de este capítulo fue asociar funciones putativas a las secuencias codificantes (CDS, por sus siglas en inglés: Coding DNA Sequences) que se encuentran en los metagenomas de cada tejido, con énfasis en funciones vinculadas a la adaptación al ecosistema de manglar y su posible relevancia con aplicaciones en biotecnología.

Métodos:

Dado que la metodología general ya describe las actividades de campo y laboratorio, y el Capítulo 1 detalla el procesamiento de las lecturas crudas, en este capítulo se presentan únicamente los análisis

bioinformáticos para la caracterización funcional del microbioma endófito en hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*, a partir de las lecturas filtradas correspondientes exclusivamente a microorganismos endófitos.

Ensamblaje de los metagenomas

A partir de las lecturas limpias se realizó el ensamblaje de los metagenomas endofíticos de *R. mangle* y *A. germinans* mediante el programa MetaSPAdes v4.0.0 (Nurk et al., 2017). Se ensamblaron los metagenomas endofíticos de cada tejido, raíces y hojas, por separado, generando un metagenoma para estos tejidos, de cada especie de mangle. Los parámetros de la calidad del ensamblaje fueron evaluados con el programa MetaQuast v5.3 (Mikheenko et al., 2016). Además, a través de BUSCO v5.8.2, se revisó que en los metagenomas no hubiese contaminación con lecturas de la planta hospedera (Simão et al., 2015). Por último, la calidad de los ensamblajes se mejoró mediante la eliminación de las secuencias redundantes, para lo cual se utilizó el software CD-Hit v4.8.1 con un umbral de similitud del 95% (Fu et al., 2012).

Caracterización del potencial funcional de la comunidad de endófitos: Anotación funcional de los metagenomas

Para realizar la caracterización de los metagenomas se empleó el programa Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014), para extraer los CDS de los ensamblajes. Posteriormente, mediante el software eggNOG-mapper v2.1.12 (Cantalapiedra et al., 2021) se anotaron los CDS obtenidos contra las bases de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG, por sus siglas en inglés: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y la base de datos de Grupos de Ortólogos (COG, por sus siglas en inglés: Clusters of Orthologous Groups), (Kanehisa, 2002; Tatusov et al., 2003). A partir del archivo que se generó de la anotación se extrajeron los conteos para cada una de las categorías metabólicas del KEGG y del COG. Estos resultados fueron analizados a través del paquete MicrobiomeProfiler de R (RStudio Team, 2020; Chen & Yu, 2022). Este análisis tuvo como objetivo identificar a qué categorías metabólicas se asignan los CDS de los metagenomas y por consiguiente el potencial funcional de la comunidad de microorganismos endófitos.

Aporte de la comunidad microbiana en la interacción mangle-endófito: anotación funcional de los metagenomas

Se empleó el flujo de trabajo PGPg_finder v1.1.0 (Pellegrinetti et al., 2024), ya que está diseñado específicamente para la identificación de genes involucrados en la interacción planta-microorganismo, a diferencia de otros enfoques de anotación funcional más generales. Este flujo de trabajo utiliza la base de datos PLaBAs (Patz et al., 2021), que contiene exclusivamente información sobre genes con funciones relevantes en esta interacción. La anotación se realizó para cada metagenoma, lo que permitió analizar el

aporte de la comunidad de endófitos en el metabolismo de la planta, la degradación de compuestos xenobióticos, la tolerancia a la salinidad y la resistencia al estrés biótico, abiótico y a los metales pesados, funciones clave desde el punto de vista adaptativo y con posibles aplicaciones biotecnológicas.

Resultados:

Ensamblaje de los metagenomas

Los metagenomas ensamblados mostraron diferencias en sus parámetros de calidad (Tabla 1). El metagenoma de las raíces de *R. mangle* fue el más grande, con una longitud total de 915 millones de pares de bases (M pb), seguido del metagenoma de los neumatóforos de *A. germinans*, con 426 M pb. En contraste, los metagenomas del tejido foliar fueron considerablemente más pequeños, con longitudes de 7 M pb en *A. germinans* y 6.5 M pb en *R. mangle* (Tabla 1). Además, el valor de N50 fue mayor en los metagenomas foliares que en los metagenomas radiculares (Tabla 1), lo que indica que las secuencias ensambladas en las hojas presentan mayor continuidad. Por otro lado, el análisis de genes ortólogos reveló que la contaminación por ADN de la planta hospedera en los metagenomas fue mínima (Anexo 10).

Tabla 1. Parámetros de calidad de los ensamblajes de los metagenomas del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*.

Parámetros del ensamblaje	Metagenomas de <i>R. mangle</i>		Metagenomas de <i>A. germinans</i>	
	<i>Tejido foliar</i>	<i>Tejido radicular</i>	<i>Tejido foliar</i>	<i>Tejido radicular</i>
Número de contigs	3362	717990	3796	321025
Número de contigs(≥ 1000 bp)	1127	238749	835	94161
Contig más largo (bp)	220657	239813	292591	149821
Longitud total (bp)	6566090	915928441	7077142	426965925
N50	6552	1473	18483	1602
N90	659	594	619	591
L50	72	127705	54	45008
L90	2215	549490	2494	242410

Caracterización del potencial funcional de la comunidad de endófitos: Anotación funcional de los metagenomas

La anotación de los metagenomas, contra la base de datos de EggNOG mostró que la mayoría de los CDS tienen una función putativa desconocida (Figura 5). En cuanto a los CDS asignados a una categoría funcional, se encontró que, tanto para los metagenomas de *R. mangle* como para los de *A. germinans* son relevantes las siguientes categorías. Con relación al almacenamiento y procesamiento de la información, se identificaron como dominantes los CDS relacionados con replicación, recombinación y reparación; transcripción y traducción, estructura ribosomal y biogénesis (Figura 5). En cuanto a procesos celulares y señalización, las categorías con mayor abundancia de CDS fueron los mecanismos de transducción de señales y pared celular, membrana y biogénesis de la envoltura celular (Figura 5). Por último, en cuanto al metabolismo celular, la categoría más relevante fue el transporte y metabolismo de aminoácidos (Figura 5).

Sumado a lo anterior, para ambas especies de mangle se observó que había diferencias en los conteos de CDS entre los metagenomas de los tejidos. Las raíces y los neumatóforos presentaron los conteos más elevados, con una diferencia de aproximadamente 100 veces con relación al tejido foliar (Figura 5). Si bien, la abundancia de CDS fue mayor en el tejido radicular, en las hojas resaltaron los CDS relacionados con el transporte y metabolismo de carbohidratos (Figura 5B y 5D), y en las raíces se destacaron las funciones de producción y conversión de energía y biosíntesis, catabolismo y transporte de metabolitos secundarios (Figura 5A y 5C).

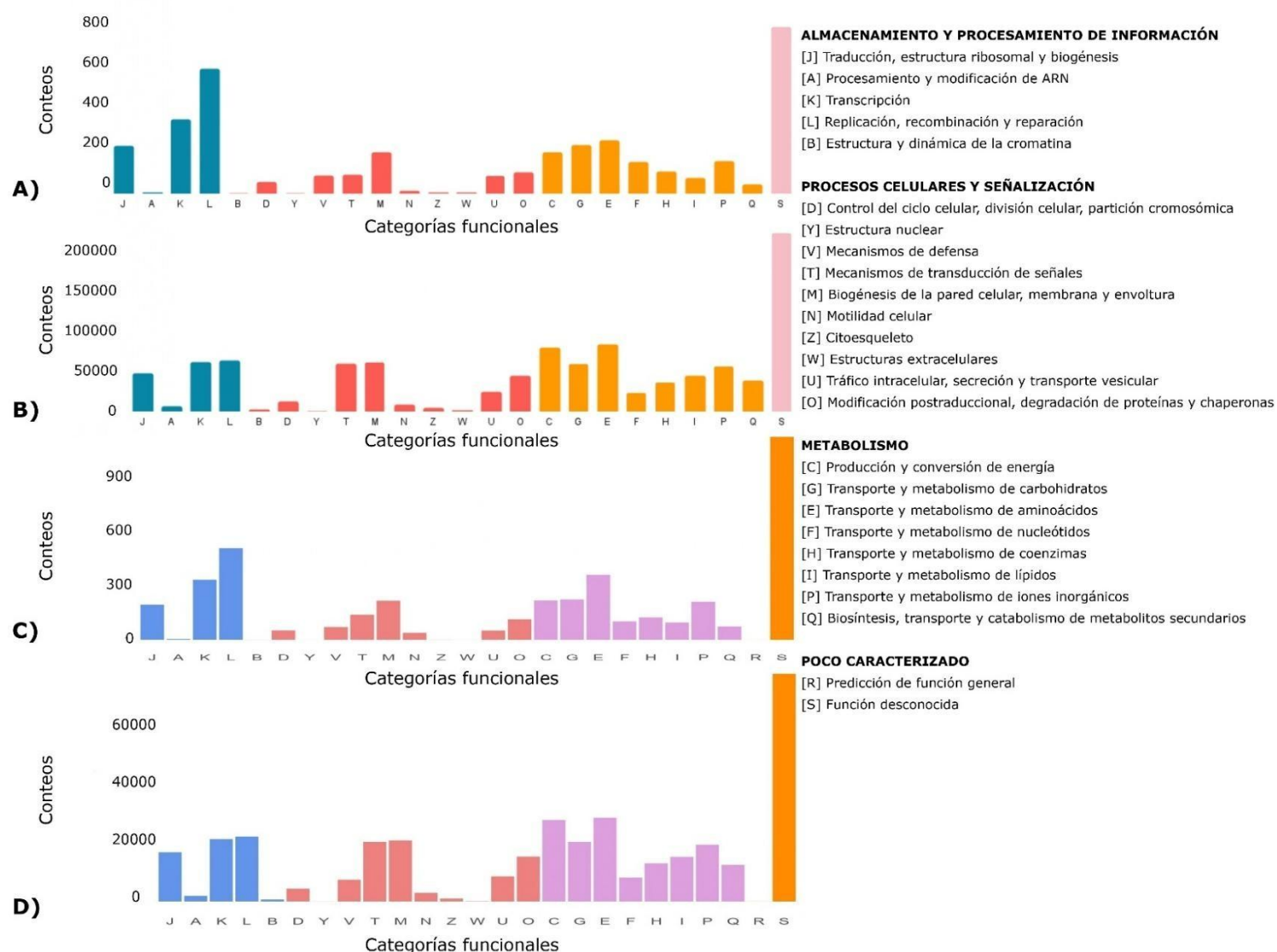


Figura 5. Análisis del potencial metabólico de la comunidad de endófitos asociados con el tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Abundancia de los CDS dentro de las diferentes categorías de la base de datos del EggNOG. A) Metagenoma del tejido foliar de *R. mangle*. B) Metagenoma del tejido radicular de *R. mangle*. C) Metagenoma del tejido foliar de *A. germinans*. D) Metagenoma del tejido radicular de *A. germinans*.

Con respecto a la anotación de los metagenomas contra la base de datos del KEGG, se identificaron las rutas metabólicas más significativamente enriquecidas (Figura 6). Para la especie *R. mangle* se determinó que tanto en el tejido foliar como en el radicular hubo un enriquecimiento en funciones como la biosíntesis de aminoácidos y de cofactores (Figura 6A y 6B). Además, en las raíces de esta especie se detectó que las rutas de fosforilación oxidativa y del metabolismo de amino azúcares y amino nucleótidos fueron significativas (Figura 6B). Para la especie *A. germinans* la biosíntesis de aminoácidos se encontró

enriquecida en el tejido foliar (Figura 6C), y, rutas metabólicas como la biosíntesis de cofactores y el metabolismo de carbono fueron relevantes tanto en las hojas como en los neumatóforos (Figura 6C y 6D).

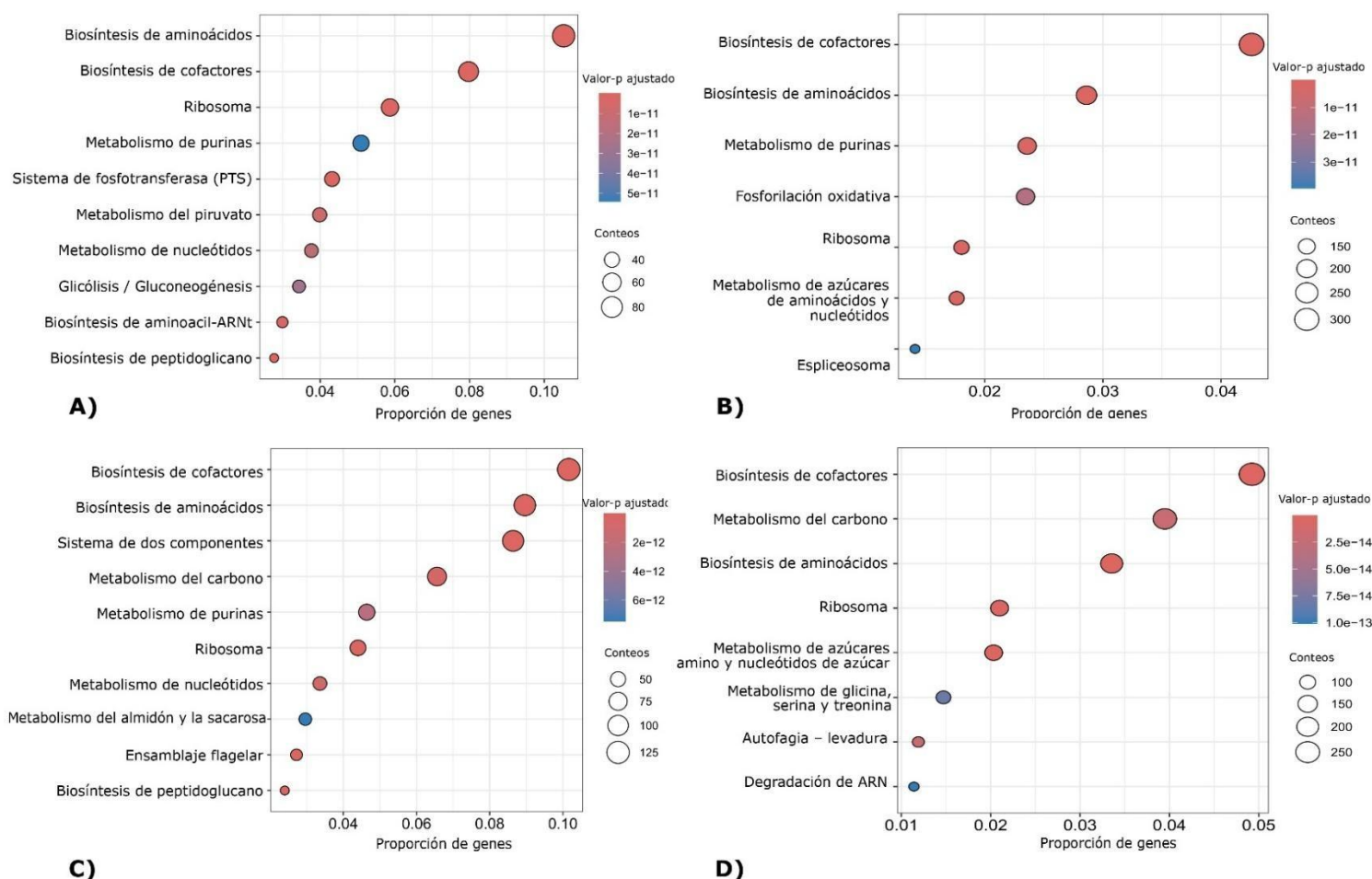


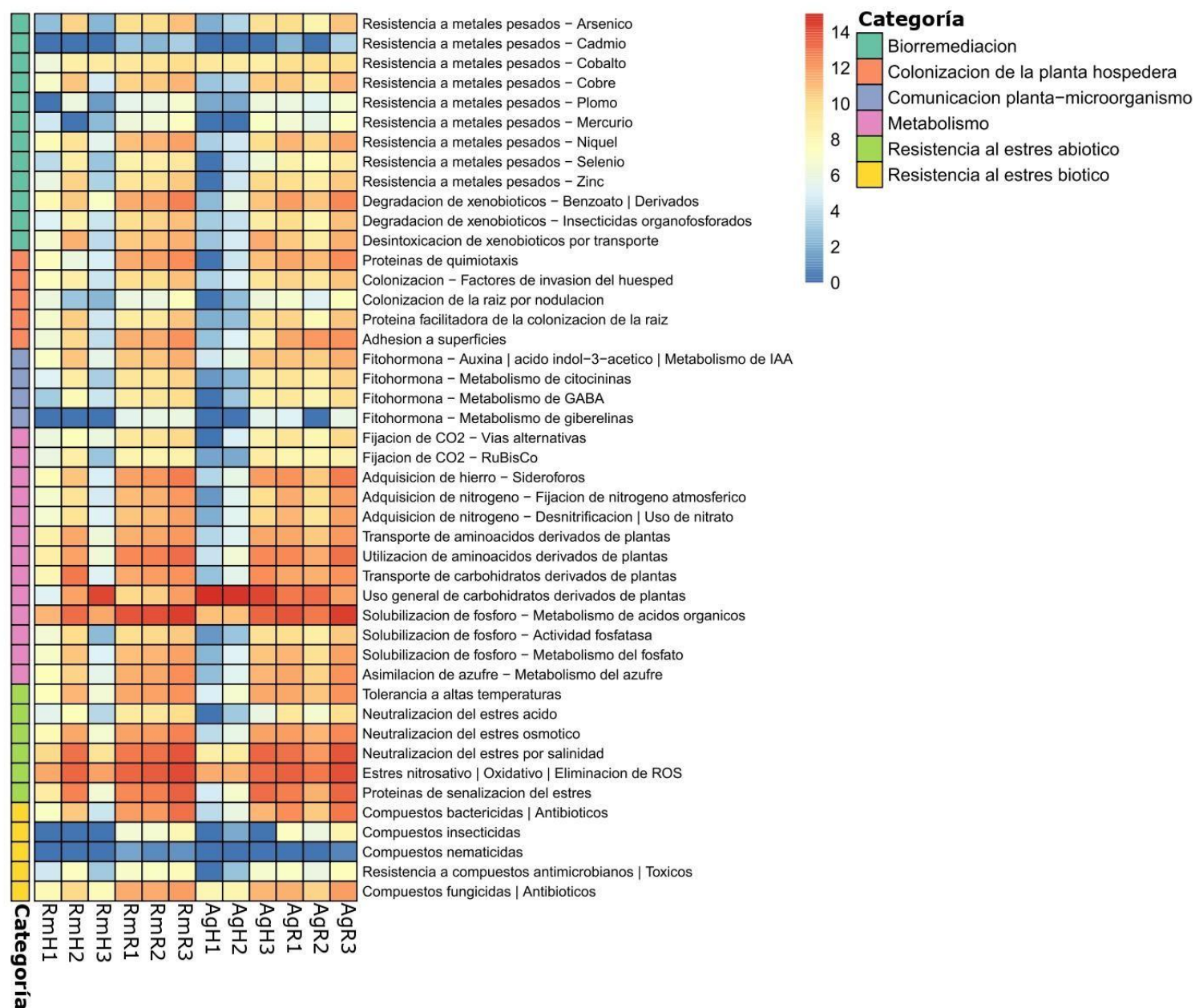
Figura 6. Análisis del potencial metabólico de la comunidad de endófitos asociados con el tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Abundancia de los CDS dentro de las diferentes categorías de la base de datos del KEGG. A) Metagenoma del tejido foliar de *R. mangle*. B) Metagenoma del tejido radicular de *R. mangle*. C) Metagenoma del tejido foliar de *A. germinans*. D) Metagenoma del tejido radicular de *A. germinans*.

Aporte de la comunidad microbiana en la interacción mangle-endófito: Anotación funcional específica de los metagenomas

En cuanto a las funciones clave en la interacción planta-microorganismo, se encontró una alta abundancia de CDS en categorías como biorremediación, colonización de la planta hospedera, comunicación plantamicroorganismo, metabolismo y resistencia al estrés (biótico y abiótico). Sin embargo, al comparar entre tejidos, el microbioma de raíces y neumatóforos mostró una mayor contribución funcional en comparación con el microbioma del tejido foliar, donde la abundancia de CDS fue menor (Figura 7).

Dentro del potencial metabólico, en la categoría de biorremediación se destacaron funciones asociadas a la descomposición de compuestos xenobióticos y la resistencia a metales pesados como cobalto, arsénico, níquel, selenio y zinc (Figura 7). Además, funciones relacionadas con el endofitismo, como la capacidad de colonizar el tejido vegetal, comunicarse con la planta hospedera y la complementación metabólica, fueron relevantes en hojas y raíces de ambas especies de mangle (Figura 7). En cuanto a la resistencia, el microbioma endófito presentó funciones potenciales para la defensa contra otros microorganismos e insectos, aunque en menor abundancia frente a nemátodos (Figura 7). Finalmente, el análisis de anotación funcional específica reveló que, en todas las muestras, las categorías con mayor abundancia de CDS estuvieron relacionadas con la solubilización de fósforo, la neutralización del estrés salino y osmótico, así, como, la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) y de nitrógeno (RNS, por siglas en inglés: Reactive Nitrogen Species), (Figura 7).

Figura 7. Análisis del potencial metabólico de la comunidad de endófitos asociados con el tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Abundancia de los CDS relacionados con funciones relevantes en la interacción



planta-microorganismo. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular. En la escala del heatmap, el color rojo indica una alta abundancia de secuencias codificantes asociadas a las categorías de la base de datos PLaBAs, mientras que el color azul representa su ausencia.

Discusión:

En este capítulo se exploró el potencial funcional del microbioma endófito asociado al tejido foliar y radicular de *R. mangle* y de *A. germinans*, utilizando una abordaje metagenómico basado en secuenciación shotgun. A nivel comunitario, los endófitos tienen el potencial de contribuir al metabolismo de nutrientes esenciales como carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Además, se detectaron CDS asociadas a funciones clave para la adaptación de los árboles de mangle al ecosistema intermareal, incluyendo la resistencia a la

salinidad, la tolerancia al estrés biótico y abiótico, y la capacidad de degradar compuestos xenobióticos y metales pesados. Los hallazgos de este capítulo proporcionan una visión comunitaria del rol que se encuentran desempeñando los microorganismos endófitos en su interacción con *R. mangle* y *A. germinans*.

Para comprender mejor la composición y estructura del microbioma endófito analizado, se evaluaron las características de los metagenomas ensamblados. El proceso de ensamblaje indicó que los metagenomas del tejido radicular tenían mayor longitud y que, los metagenomas del tejido foliar presentaron una mejor continuidad (Tabla 1). Esto podría estar relacionado con el hecho de que la comunidad microbiana de las raíces fue más diversa que la de las hojas. Una comunidad microbiana compleja y altamente diversa, como lo es el tejido radicular (Hartman & Tringe, 2019), permitió obtener una mayor cantidad de secuencias de ADN (Anexo 6), lo que se reflejó en metagenomas de mayor longitud. La gran diversidad de los microorganismos asociados al tejido interno de la raíz se ha atribuido a factores intrínsecos del suelo, de la planta y de los microorganismos, que en conjunto potencian el reclutamiento y la colonización de los endófitos (Gaiero et al., 2013). Un ejemplo de esto es la secreción de exudados orgánicos en las raíces que estimula el crecimiento microbiano y modela la composición de la microbiota (Sasse et al., 2018; Kawasaki et al., 2021). Kuźniar et al., (2025), han reportado que las raíces son los órganos de las plantas con mayor abundancia de endófitos, mientras que, en los tejidos aéreos estos microorganismos se encuentran en baja abundancia, patrón que se evidenció en las muestras y en los metagenomas ensamblados. Con relación a la contaminación de los metagenomas por secuencias de los árboles de mangle (Anexo 10), la estrategia empleada permitió realizar un filtrado efectivo siguiendo las recomendaciones dadas por diversos autores para este tipo de análisis (Saheb Kashaf et al., 2021; Yeoh, 2021).

Además de evaluar la calidad y estructura de los metagenomas, se analizó su contenido funcional. En los metagenomas del tejido foliar y radicular de ambas especies hubo una gran cantidad de CDS sin función putativa conocida (Figura 5). Esto puede deberse a la limitada información en las bases de datos sobre la comunidad de endófitos en los bosques de manglar (Harrison & Griffin, 2020). Por otra parte, una de las funciones putativas que sobresale, dentro de los metagenomas, fue el transporte y metabolismo de aminoácidos (Figuras 5-7). Esto se podría atribuir a las respuestas de los endófitos a condiciones estresantes como la presencia de metales pesados (Khan et al., 2016). En la cepa *Sphingomonas* sp. LK11 se ha determinado que la regulación del metabolismo de aminoácidos y proteínas permite el crecimiento en altas concentraciones de cadmio (Khan et al., 2016). Este tipo de contaminantes se han reportado en la bahía de Buenaventura (Gamboa-García et al., 2020; Erazo-Enríquez et al., 2023), por lo que es necesario, a futuro, evaluar la respuesta de la comunidad de endófitos a estos compuestos. Yuan et al., (2023), han reportado que el metabolismo de aminoácidos es la categoría funcional más abundante en la endosfera y la epísfera

de las raíces de las especies *Acanthus ilicifolius*, *Aegicera corniculatum* L., *Avicennia marina*, *Bruguiera gymnorhiza* L. y *Kandelia candel* L., lo que concuerda con el patrón observado en esta investigación. Esta capacidad metabólica de la comunidad de endófitos podría atribuirse a que los ecosistemas de manglar son reservorios de aminoácidos, los cuales se obtienen de la descomposición de la hojarasca y la escorrentía terrestre (Chandramohanakumar, 2015). En los sedimentos de estos ecosistemas los aminoácidos, péptidos y proteínas representan hasta el 40% del nitrógeno total, lo que explicaría la abundancia de CDS en esta categoría (Chandramohanakumar, 2015).

Otra categoría metabólica relevante en el microbioma endófito de *R. mangle* y *A. germinans* fue el transporte y metabolismo de carbohidratos (Figuras 5-7). Esto se explica porque los bosques de manglar son uno de los ecosistemas más productivos con un alto nivel de procesamiento de carbono (Kristensen et al., 2008). Además, dentro de las diferentes formas de este elemento, los carbohidratos son la principal fuente de carbono orgánico, representando hasta el 65.5% del carbono de la madera de los árboles de mangle (Kristensen et al., 2008). En cuanto a los microorganismos, se ha determinado que en los sedimentos de manglar la estructura de la microbiota y el microbioma se ve influenciada por el carbono orgánico total (Qu et al., 2018; Zhao et al., 2019). Sumado a lo anterior, en la Bahía de Buenaventura se ha reportado una alta disponibilidad de este elemento en los sedimentos y la biomasa subterránea de los manglares (Peñaranda et al., 2019). Nuestros resultados sugieren que los endófitos contribuyen en la utilización de los carbohidratos en este ecosistema, posiblemente aprovechando los altos niveles de carbono disponibles en el entorno.

Además de las funciones de mantenimiento general, mencionadas anteriormente, se identificó el potencial metabólico para contribuir en procesos adaptativos específicos (Figura 7). En Buenaventura, se ha reportado contaminación por metales pesados y compuestos xenobióticos (Rosero et al., 2008; GamboaGarcía et al., 2020; Bolívar-Anillo et al., 2023), por lo cual se entiende la alta abundancia de CDS, relacionados con la eliminación de estos contaminantes, en los metagenomas de ambas especies de mangle.

Además, sitúa la comunidad endófito de estas especies de mangle como un reservorio de microorganismos que pueden llegar a ser de interés biotecnológico. Estos microorganismos cuentan con mecanismos de biosorción y bioacumulación que, recientemente, se han empleado para biorremediación (Sim et al., 2018; Tiwari & Bae, 2023). Otras funciones de interés son los procesos metabólicos que puedan llegar a promover el crecimiento vegetal, como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de ácido indolacético y la movilización de nutrientes (Lacava et al., 2022). Para todas estas funciones se encontraron diversos CDS dentro de los metagenomas analizados. De hecho, esta capacidad metabólica del microbioma responde a las condiciones ambientales de los bosques de manglar que limitan el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Dey et al., 2024). Estas funciones se han aprovechado en procesos de reforestación, por

ejemplo, la cepa endófitra de mangle MCR1.48 de *Enterobacter* sp., ha sido empleada para producción de plántulas de *Acacia polyphylla* DC., promoviendo su crecimiento (Castro et al., 2018).

Uno de los factores ambientales más característicos del ecosistema de manglar es la salinidad alta y fluctuante. En la bahía de Buenaventura, este parámetro cambia según la temporada de lluvias, oscilando entre 5.8 Y 22.2 PSU (Mondragón-Díaz et al., 2022), siendo un estresor constante para los organismos que habitan en este ecosistema. La comunidad vegetal de estas regiones cuenta con características anatómicas, bioquímicas, fisiológicas, moleculares y morfológicas para tolerar el estrés salino (Wang et al., 2011). Debido a las adaptaciones específicas de las plantas de mangle fue interesante encontrar que dentro del microbioma endófito de las hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans* eran abundantes CDS relacionadas con la neutralización del estrés osmótico y salino (Figura 7). Estos resultados se suman a la evidencia proporcionada por otros autores para establecer que los microorganismos endófitos complementan las adaptaciones intrínsecas de las plantas de mangle a la alta salinidad (Subedi et al., 2022; Yang et al., 2023). Además, funciones como la biosíntesis de fitohormonas, que también se encontró en los metagenomas (Figura 7), influyen en la tolerancia a la salinidad, junto con mecanismos como la acumulación de moléculas osmoprotectoras y el transporte de iones (Roy et al., 2021). A su vez, estos mecanismos de tolerancia a la salinidad se relacionan con la resistencia a antibióticos (Xu et al., 2023), función que presentó una mayor prevalencia en el metagenoma de las raíces y neumatóforos.

En conjunto, los estresores bióticos y abióticos de estos ecosistemas resultan en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que generan daño a nivel celular y bioquímico en las plantas (Das et al., 2016). Los resultados obtenidos mostraron que en los metagenomas analizados existe el potencial funcional para contribuir directa e indirectamente en la resistencia al estrés oxidativo y nitrosativo (Figura 7). Dentro de la contribución indirecta, los endófitos aportan en la resistencia al estrés biótico mediante la producción de compuestos con actividad insecticida, nematocida y antibiótica. Esto concuerda con los resultados reportados por otros investigadores donde hongos y bacterias protegen a las plantas hospederas contra diversos patógenos (Chadha et al., 2015; Panda & Das, 2024). Además, estos microorganismos proporcionan resistencia contra la salinidad, las altas temperaturas y compuestos contaminantes, como se mencionó anteriormente. Con relación a la contribución directa, diversas investigaciones han demostrado que los microorganismos producen compuestos que contrarrestan el efecto de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Dat et al., 2019; Zhang et al., 2021). Para las especies *Avicennia marina* y *Xylocarpus granatum* se ha comprobado la actividad antioxidante de metabolitos secundarios derivados de bacterias y hongos endófitos (Rahmawati et al., 2019).

En resumen, este capítulo ofrece una visión comunitaria del microbioma endófito de *R. mangle* y *A. germinans*, resaltando su papel en el mantenimiento de la planta y la comunidad microbiana, así como en la interacción planta-endófito. Estos microorganismos complementan las adaptaciones de las plantas al ecosistema de manglar, destacando funciones clave frente al estrés ambiental, como tolerancia a salinidad, temperatura, compuestos contaminantes y deficiencia de algunos nutrientes esenciales. La exploración metagenómica de este microbioma posiciona a los endófitos como una fuente prometedora de nuevas funciones metabólicas con potencial biotecnológico.

Capítulo 3. Caracterización de los MAG de microorganismos endófitos del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*: Taxonomía y potencial metabólico

Introducción:

Además de lograr la caracterización taxonómica y funcional de una comunidad microbiana, la metagenómica permite ensamblar genomas individuales a partir de los metagenomas (Mande et al., 2021). El proceso de recuperar genomas de especies puntuales a partir de un ensamblaje metagenómico se conoce como binning (Yue et al., 2020). El binning metagenómico, o agrupamiento de secuencias metagenómicas, requiere de una gran capacidad computacional, ya que consiste en la clasificación de los contigs que provienen de la misma especie a partir de la información genómica combinada de las diversas especies presentes dentro de una comunidad de microorganismos (Dröge & McHardy, 2012). Esta metodología permite superar la dependencia de los métodos de cultivo y obtener información genómica de microorganismos que no pueden aislarse en condiciones de laboratorio (Forbes et al., 2017). Como

resultado del proceso de binning se obtienen borradores de genomas microbianos conocidos como bins o contenedores genómicos.

La calidad de estos bins se evalúa con base en dos parámetros: la completación y la contaminación. La completación mide qué porcentaje de los genes esenciales esperados están presentes en un bin, mientras que la contaminación indica cuántos de estos genes aparecen duplicados dentro del mismo bin. Ambos parámetros se basan en los genes de copia única (SCG, por sus siglas en inglés: Single Copy Genes), (Goussarov et al., 2022). Cuando un bin presenta una buena calidad, se conoce como un genoma ensamblado a partir de un metagenoma (MAG, por sus siglas en inglés: Metagenome-Assembled Genome). Según el Consorcio de Normas Genómicas (GSC, por sus siglas en inglés: Genomic Standards Consortium), un MAG es de calidad media cuando la completación es mayor o igual al 50% y la contaminación es menor al 10%, y un MAG es de alta calidad cuando la completación es mayor o igual al 90% y la contaminación menor al 5% (Bowers et al., 2017; Zhou et al., 2022).

En ecosistemas de manglar, se han ensamblado diversos MAG a partir de metagenomas obtenidos de sedimentos y de la rizosfera de *Sonneratia apetala* (Buch. -Ham.) y *Kandelia obovata* L. (Zhang et al., 2020; Luo et al., 2021; Yu et al., 2023). Luo et al., (2021) reportaron tres MAG obtenidos a partir de sedimentos profundos de manglar, mediante los cuales se logró identificar funciones relacionadas con la fijación de carbono y nitrógeno. Zhang et al., (2020) ensamblaron 13 MAG de la clase Methanofastidiosa en los cuales identificaron funciones vinculadas con la metanogénesis. En cuanto a MAG de la rizosfera Yu et al., (2023), caracterizaron 41 MAG de alta calidad e identificaron funciones relacionadas con fijación de nitrógeno, desnitrificación y reducción de sulfatos. Aunque se han realizado esfuerzos para ensamblar genomas de microorganismos no cultivables en los ecosistemas de manglar, la comunidad endófito sigue siendo poco estudiada. Por lo tanto, es fundamental aplicar estudios metagenómicos a los tejidos de las distintas especies de árboles de mangle y recuperar los MAG de los endófitos que no se pueden aislar y, por consiguiente, no se han caracterizado a nivel genómico.

Actualmente, la capacidad de generar datos genómicos de microorganismos no cultivables ha incrementado a gran velocidad (New & Brito, 2020), pero no se ha avanzado significativamente en la estandarización para su clasificación taxonómica, ya que este proceso se encuentra limitado por pruebas que dependen de medios de cultivo (Konstantinidis et al., 2015, 2017, 2020). Por ello, es común que para los MAG que se derivan de análisis metagenómicos se reporten sus parámetros de calidad y se explore su potencial metabólico (Zhang et al., 2020; Luo et al., 2021; Yu et al., 2023), pero en muchas ocasiones no se esclarece su estatus taxonómico hasta el nivel de especie (Konstantinidis et al., 2015). Determinar si un MAG

corresponde a una especie nueva es un desafío debido a la heterogeneidad en las secuencias de ADN que lo constituyen (Setubal et al., 2021). Para abordar este reto, se emplean estrategias complementarias, como la estimación de porcentajes de similitud y su ubicación filogenética. Una de las métricas de similitud más utilizadas es la identidad promedio de nucleótidos (ANI, por sus siglas en inglés: Average Nucleotide Identity), que permite comparar genomas completos y establecer si pertenecen a especies diferentes (Lee et al., 2016; Barco et al., 2018). A pesar de estos avances, aún no existe un consenso sobre un sistema de nomenclatura válido para microorganismos no cultivables. Por el momento, el término *Candidatus* se ha propuesto como una solución temporal para la clasificación de taxa que no pueden ser aislados (Konstantinidis et al., 2015, 2020).

Dado que los manglares son reservorios de microorganismos no cultivables con alto potencial biotecnológico, es fundamental caracterizar genómicamente su comunidad endófito. Por ello, este capítulo se enfoca en la caracterización taxonómica y funcional de los genomas microbianos recuperados a partir de los metagenomas ensamblados (MAG). Este análisis contribuirá a la comprensión del papel funcional de especies microbianas no cultivables en la comunidad endófito de *R. mangle* y *A. germinans*, brindando información relevante para futuras investigaciones sobre su potencial ecológico y biotecnológico.

Métodos:

La metodología general, desde la toma de muestras hasta la secuenciación, se detalló en la sección correspondiente. Además, el procesamiento de las lecturas se explicó en el capítulo 1. En este capítulo se hará énfasis en los análisis computacionales desarrollados para la obtención y caracterización taxonómica y funcional de los MAG recuperados a partir de los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*.

Binning metagenómico: Recuperación de genomas microbianos

Una vez obtenidos los metagenomas por tejido, se empleó el pipeline MetaWrap v1.3.0 para realizar el proceso de binning metagenómico (Uritsky et al., 2018). En primer lugar, se utilizó el módulo “BINNING_module” del pipeline MetaWrap para ensamblar los posibles bins. Para esto, se emplearon los softwares: MaxBin2 v2.2.4-1, MetaBAT2 v2.17 y CONCOCT v1.1.0. Con cada uno de los programas mencionados se generó un conjunto de bins para cada metagenoma. Dentro de cada metagenoma se evitó la redundancia de los bins considerando un mismo bin a aquellos que presentaron un solapamiento de al menos el 80% de la longitud del genoma (Uritsky et al., 2018). Después, se utilizó el módulo “REFINEMENT_module” de MetaWrap v1.3.0 para mejorar los bins obtenidos previamente. A través de este módulo se combinaron los bins generados con los tres softwares de ensamblaje, generando un nuevo conjunto de bins híbridos (Uritsky et al., 2018). Posteriormente, se empleó el programa CheckM v1.2.3 para evaluar la calidad de los bins originales y los híbridos, mediante la estimación de los parámetros de

completación y la contaminación, conservando aquellos bin con una completación $\geq 50\%$ y una contaminación $\leq$ al 10%, considerándolos en adelante como MAG (Bowers et al., 2017; Uritsky et al., 2018). Por otra parte, se estimó la abundancia de cada MAG dentro de las diferentes muestras mediante el módulo “QUANT_module” de MetaWrap v1.3.0 (Uritsky et al., 2018).

Identificación taxonómica de los genomas microbianos

Con el objetivo de clasificar hasta el nivel de especie a los MAG ensamblados, se empleó el programa GTDB-Tk v2.4.0 (Chaumeil et al., 2020). En primer lugar, se evaluó si existía redundancia entre los genomas microbianos de *R. mangle* y los de *A. germinans* mediante el parámetro ANI, dado que los metagenomas fueron ensamblados por separado. Al realizar la comparación entre los MAG de *R. mangle* y los de *A. germinans* se consideraron redundantes aquellos genomas con un ANI $\geq$ al 95% (Zhang et al., 2014), es decir que ambos pertenecían a la misma especie de microorganismo y se ensamblaron independientemente a partir de los metagenomas de ambas plantas hospederas. De los MAG que se compartían entre ambas especies de mangle se seleccionó el que tuviese una mayor completación y una menor contaminación para realizar los análisis posteriores. Después, se empleó el pipeline “classify_wf” del programa GTDB-Tk v2.4.0 para estimar el ANI de cada MAG contra todos los genomas disponibles de las especies descritas en la base de datos “Genome Taxonomy Database”, con el objetivo de asignar un taxón a cada MAG y evaluar si alguno se correspondía con una nueva especie de microorganismo (Chaumeil et al., 2020). Para identificar las relaciones filogenéticas de los MAG confirmados como nuevas especies, se utilizó el pipeline “de_novo_wf” del programa GTDB-Tk v2.4.0. Este análisis permitió construir, para cada uno de los MAG, árboles filogenéticos al nivel taxonómico más específico posible y proponer una nueva asignación taxonómica (Chaumeil et al., 2020).

Caracterización del potencial funcional de algunas especies de endófitos: Anotación funcional de los MAG

Con relación a la caracterización funcional de los MAG, se empleó el módulo “ANNOTATE_BINS” del flujo de trabajo MetaWrap v1.3.0 (Uritsky et al., 2018). Dentro de este módulo se empleó el software Prokka v1.14.5 (Seemann, 2014), para obtener un archivo “.gff” con las características de los CDS y dos archivos “.fasta”, uno con las secuencias de nucleótidos (“.faa”) y otro con su respectiva traducción a aminoácidos (“.fna”). Para categorizar los CDS de cada MAG, se realizó una anotación de los archivos “.fna” contra la base de datos de subsistemas del SEED usando el flujo de trabajo SAMSA2 v2.2.01 (Overbeek et al., 2014; Westreich et al., 2018). Las anotaciones resultantes se convirtieron en tablas de

conteos a través del script “DIAMOND analysis counter” del flujo de trabajo SAMSA2 v2.2.01 (Westreich et al., 2018). Por último, se empleó el paquete pheatmap v1.0.12 del software R studio para generar heatmaps y representar la abundancia de regiones codificantes en las diferentes categorías metabólicas (Kolde, 2018; RStudio Team, 2020).

Aporte de algunas especies de endófitos en la interacción mangle-endófito: Anotación funcional de los MAG

Si bien, en el capítulo 2 se analizó la contribución global de la comunidad endófito, en este capítulo se buscó determinar qué especies en particular desempeñan un papel clave en estas funciones. Para ello, el flujo de trabajo PGPg_finder v1.1.0 se utilizó para anotar cada uno de los MAG contra la base de datos PLaBAs (Patz et al., 2021; Pellegrinetti et al., 2024). Se empleó este pipeline debido a que se enfoca específicamente en genes relevantes en la interacción planta-microorganismo. Este análisis permitió identificar qué especies particulares de endófitos contribuyen a la interacción con las plantas de mangle, incluyendo funciones como el metabolismo vegetal, la degradación de contaminantes, la tolerancia a la salinidad y la resistencia a distintos tipos de estrés (biótico, abiótico).

Resultados:

Binning metagenómico: Recuperación de genomas microbianos

Como resultado del proceso de binning metagenómico se obtuvo un total de 40 genomas microbianos de buena calidad (completación mayor al 50% y contaminación menor al 10%). De estos 40 genomas, 23 se derivaron del metagenoma de *R. mangle* y 17 del genoma de *A. germinans* (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de calidad de los genomas microbianos obtenidos a partir de los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*. En rojo se encuentran los MAG de alta calidad y en negro los de media calidad. En negrilla se encuentran resaltados aquellos genomas microbianos que son exclusivos de una de las especies de mangle. Los genomas que no están en negrilla se comparten entre ambas plantas hospedadoras (Consultar la tabla 3 para ver los datos de redundancia de los MAG).

<i>Genomas microbianos recuperados a partir del metagenoma de A. germinans</i>			<i>Genomas microbianos recuperados a partir del metagenoma de R. mangle</i>		
<i>Genoma</i>	<i>Completación</i>	<i>Contaminación</i>	<i>Genoma</i>	<i>Completación</i>	<i>Contaminación</i>
Bin 1	90.84	0.20	Bin 18	72.46	0.75
Bin 2	55.32	3.84	Bin 19	74.84	1.93
Bin 3	99.25	0.32	Bin 20	99.38	2.78
Bin 4	82.78	1.63	Bin 21	88.12	3.94
Bin 5	96.00	2.14	Bin 22	96.89	1.15
Bin 6	85.29	3.44	Bin 23	99.14	1.12
Bin 7	93.64	1.68	Bin 24	67.22	0.10
Bin 8	58.85	1.73	Bin 25	79.90	4.34
Bin 9	88.92	2.04	Bin 26	93.23	2.11
Bin10	90.88	2.23	Bin 27	93.18	2.17
Bin 11	99.14	0.74	Bin 28	91.88	0.61
Bin 12	66.19	3.20	Bin 29	95.63	0.86
Bin 13	99.41	0.55	Bin 30	93.49	2.86
Bin 14	97.71	0.89	Bin 31	54.92	3.35
Bin 15	94.39	0.99	Bin 32	94.50	2.56
Bin 16	87.07	1.80	Bin 33	60.41	0.43
Bin 17	94.86	1.74	Bin 34	88.19	4.00
			Bin 35	79.66	1.24
			Bin 36	64.32	3.30
			Bin 37	93.64	6.42
			Bin 38	91.99	1.00
			Bin 39	52.23	4.53
			Bin 40	52.45	4.26

Al estimar el ANI entre los genomas obtenidos para ambas especies de mangle, se encontró que, de los 40 genomas de los microorganismos endófitos, 14 genomas se compartían entre *R. mangle* y *A. germinans*, con valores de ANI

entre 98.77 y 99.94 (Tabla 3). Es decir, que para las dos especies de mangle fue posible ensamblar en total 26 genomas microbianos diferentes de media y alta calidad (Tablas 2 y 3).

Tabla 3. Redundancia entre los genomas ensamblados a partir de los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*.

Cada fila muestra dos contenedores que se obtuvieron de diferentes metagenomas, pero al tener un ANI $\geq 95\%$ corresponden al genoma de la misma especie de microorganismo.

Metagenoma de <i>A. germinans</i>	Metagenoma de <i>R. mangle</i>	Identidad promedio de nucleótidos (ANI)
Bin 1	Bin 24	99.77
Bin 2	Bin 34	99.57
Bin 4	Bin 21	99.83
Bin 6	Bin 36	99.73
Bin 7	Bin 27	99.88
Bin 8	Bin 25	98.99
Bin 9	Bin 18	98.78
Bin 10	Bin 33	99.34
Bin 11	Bin 23	99.77
Bin 12	Bin 37	98.77
Bin 14	Bin 26	99.47
Bin 15	Bin 38	99.55
Bin 16	Bin 35	98.93
Bin 17	Bin 28	99.94

En cuanto a la asignación taxonómica de los 26 MAG, estos se clasificaron en los Phyla Actinomycetota, Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota y Myxococcota. Puntualmente, dos de los genomas pertenecían a las especies *Bacillus subtilis* y *Lactiplantibacillus plantarum*, mientras que los otros 24 correspondían a especies nuevas de bacterias que no habían sido reportadas previamente (Tabla 4). Todos los MAG obtenidos presentaron una calidad media y alta del ensamblaje según los parámetros de completación, contaminación y heterogeneidad de cepas (Anexo 11).

Tabla 4. Asignación taxonómica de los MAG ensamblados a partir de los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*. La asignación se realizó mediante la estimación del ANI entre cada MAG y los genomas de referencia de todas las especies reportadas en la base de datos GTDB. En los casos en que la asignación taxonómica resultó en un código en lugar de un nombre específico, se reportó la categoría taxonómica inmediatamente superior (orden o familia). La numeración de los MAG presenta discontinuidades debido a la eliminación de códigos redundantes entre ambas especies de mangle, conservándose únicamente el MAG de mejor calidad.

Genoma	Asignación taxonómica	Genoma	Asignación taxonómica
Bin 3	<i>Bacillus subtilis</i>	Bin 20	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Bin 5	Rhodobactereaceae (Género: JALEGB01)	Bin 21	<i>Povalibacter</i>
Bin 6	Polyangiales (Género: JAPPOR01)	Bin 22	<i>Croceibacterium</i>
Bin 7	Polyangiales (Género: JAPPOR01)	Bin 24	Rickettsiales (Género: JAHFPR01)
Bin 9	<i>Parasphingopyxis</i>	Bin 25	Steroidobacteraceae (Género: ZC4RG30)
Bin 11	Acidimicrobiales (Género: JALOLF01)	Bin 29	<i>Nocardioides</i>
Bin 12	Steroidobacteraceae (JADGHX01)	Bin 30	<i>Illumatobacter</i>
Bin 13	<i>Saccharospirillum</i>	Bin 31	Rhodomicrobiaceae (Género: R-RK-3)
Bin 14	Afifellaceae (Género: CAMYKZ01)	Bin 32	Acidimicrobiales (Género: CADEDH01)
Bin 15	Cellvibrionaceae (Género: WACF01)	Bin 33	Acidimicrobiales (Género: CADEDH01)
Bin 16	Maricaulaceae (Género: JAJFFL01)	Bin 34	Polyangiaceae
Bin 17	Cyclobacteriaceae	Bin 39	Pseudomonadales (Familia: DMS-21967)
Bin 19	Polyangiaceae (Género: SZUA-265)	Bin 40	Cyclobacteriaceae (Género: ZC4RG29)

Con relación a la abundancia de los MAG en cada una de las muestras, se identificó que, tanto para *R. mangle* como para *A. germinans*, la abundancia fue mayor en las muestras de tejido radicular en comparación con las muestras de tejido foliar (Figura 8). Puntualmente, en las muestras de *A. germinans*

los MAG más abundantes correspondían a la especie *Bacillus subtilis* y al género CAMYKZ01 (Familia Afifellaceae) para las muestras de raíz, y *Saccharospirillum* sp., en las muestras de hojas (Figura 8A). En cuanto a *R. mangle*, el MAG que correspondía a la especie *Lactiplantibacillus plantarum* fue abundante en el tejido foliar y el MAG de *Croceibacterium* sp., presentó una alta abundancia tanto en hojas como en neumatóforos (Figura 8B).

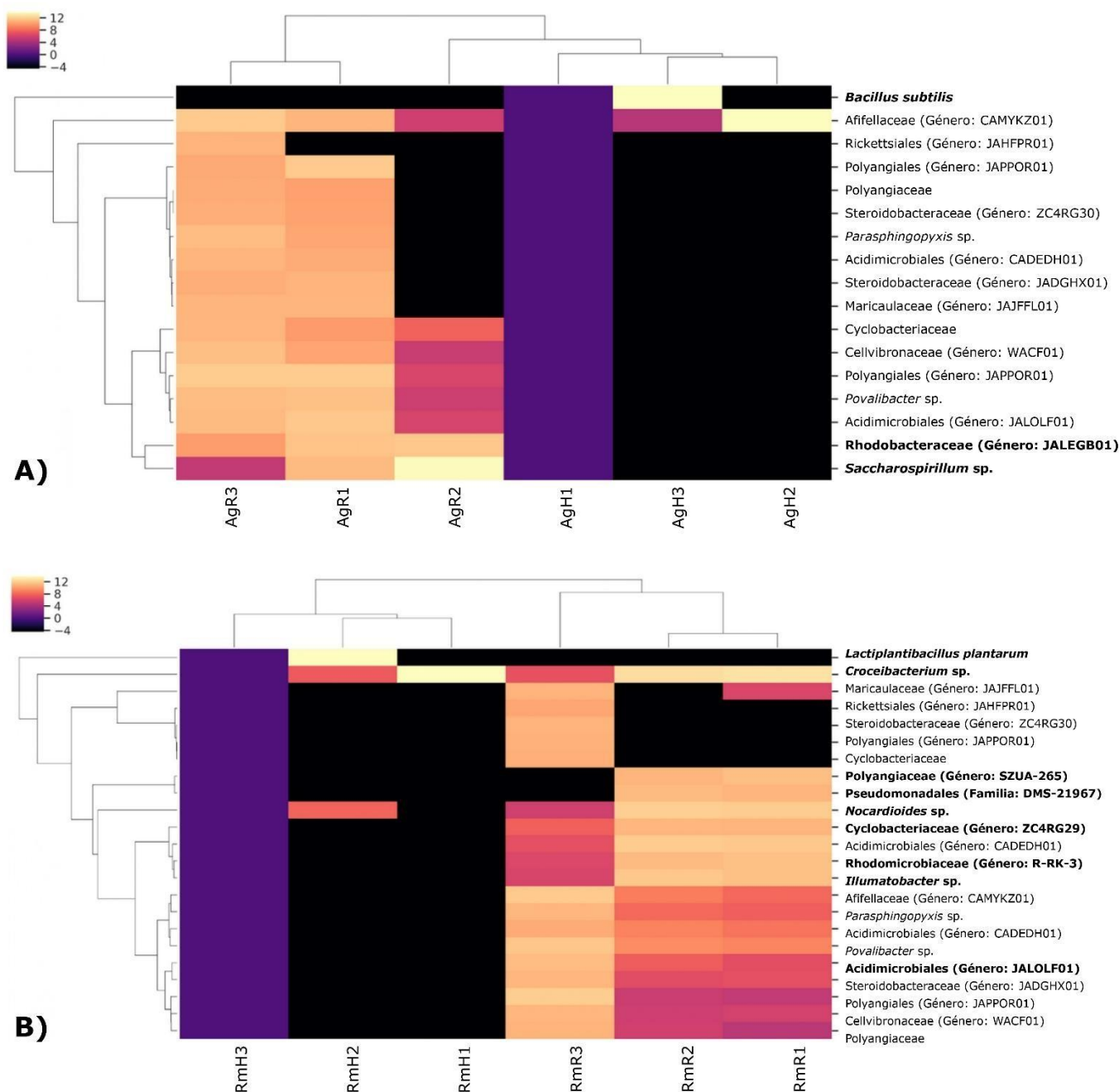


Figura 8. Abundancia de cada MAG en cada una de las muestras. A) Metagenoma del tejido foliar y radicular de

A. germinans B) Metagenoma del tejido foliar y radicular de *R. mangle*. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular. Los genomas microbianos exclusivos de una de las especies de mangle están resaltados en negrilla, mientras que los no resaltados corresponden a genomas compartidos entre ambas plantas hospederas. En la escala de colores del heatmap, el amarillo indica una alta abundancia de lecturas del MAG en las muestras, mientras que el negro representa su ausencia.

Relación filogenética de los MAG de las nuevas especies de bacterias

Para los 24 MAG de las especies nuevas, no reportadas, se estableció su relación filogenética con otras bacterias mediante la distancia evolutiva basada en el ANI (Figura 9; Anexo 12). De estos genomas, seis pudieron ser identificados hasta nivel de género, permitiendo su comparación con especies previamente reportadas dentro de sus respectivos taxones y proponiendo un estatus taxonómico provisional.

Uno de los MAG que se identificó hasta género correspondía al taxón *Parasphingopyxis* (Bin 9: completación: 88.92% y contaminación: 2.04%, Tablas 2 y 4). Con base en la distancia evolutiva basada en el ANI se logró establecer la relación entre esta nueva especie y las 11 especies reportadas hasta el momento para este género (Figura 9A). También, se determinó que la especie con la que se encontraba más estrechamente relacionada es *Parasphingopyxis marina* y, se propuso el nombre *Candidatus Parasphingopyxis mangicola* como estatus taxonómico provisional para esta nueva especie (Figura 9A). Esta especie se encontró principalmente en el tejido radicular de *R. mangle* y *A. germinans* (Figura 8).

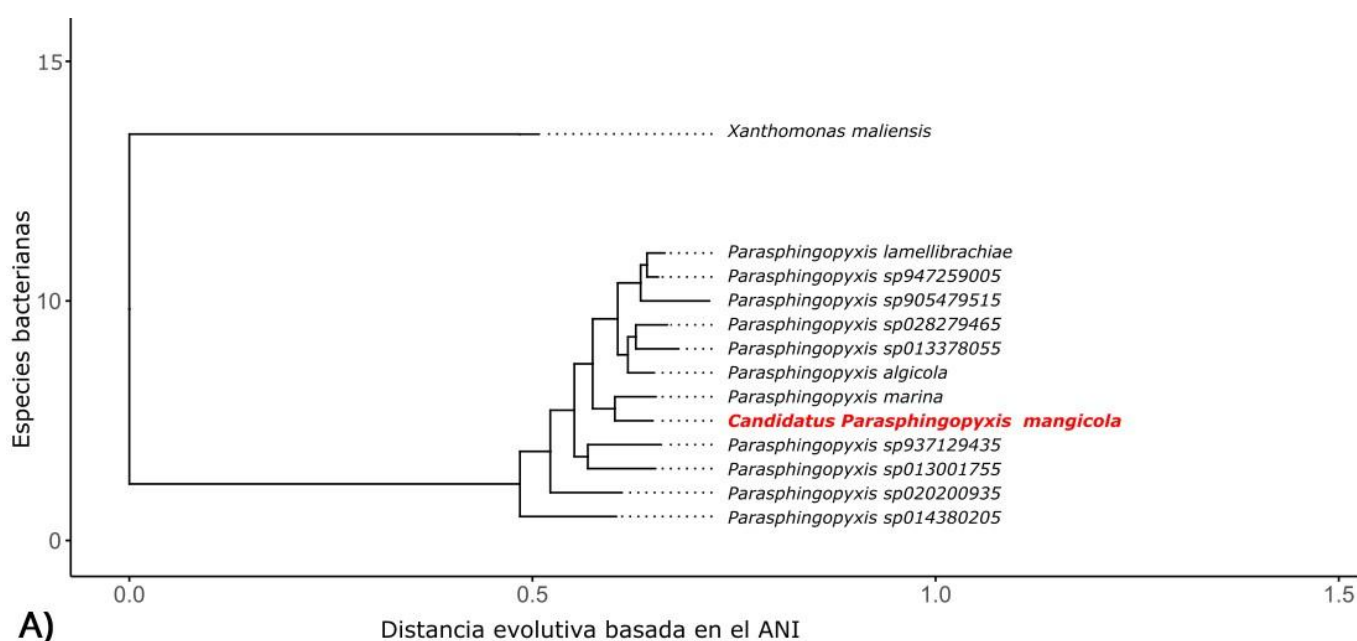
Para el MAG del género *Saccharospirillum* (Bin 13: completación: 99.41% y contaminación: 0.55%, Tablas 2 y 4), se estableció su relación filogenética con las 7 especies que se han reportado dentro de este grupo (Figura 9B). Para esta nueva especie se propuso como estatus taxonómico provisional el nombre de *Candidatus Saccharospirillum buenaventurensis* y se encontró que se relaciona estrechamente con la especie *Saccharospirillum* sp003054965 (Figura 9B). Además, esta especie se encontró exclusivamente en los neumatóforos de *A. germinans* (Figura 8).

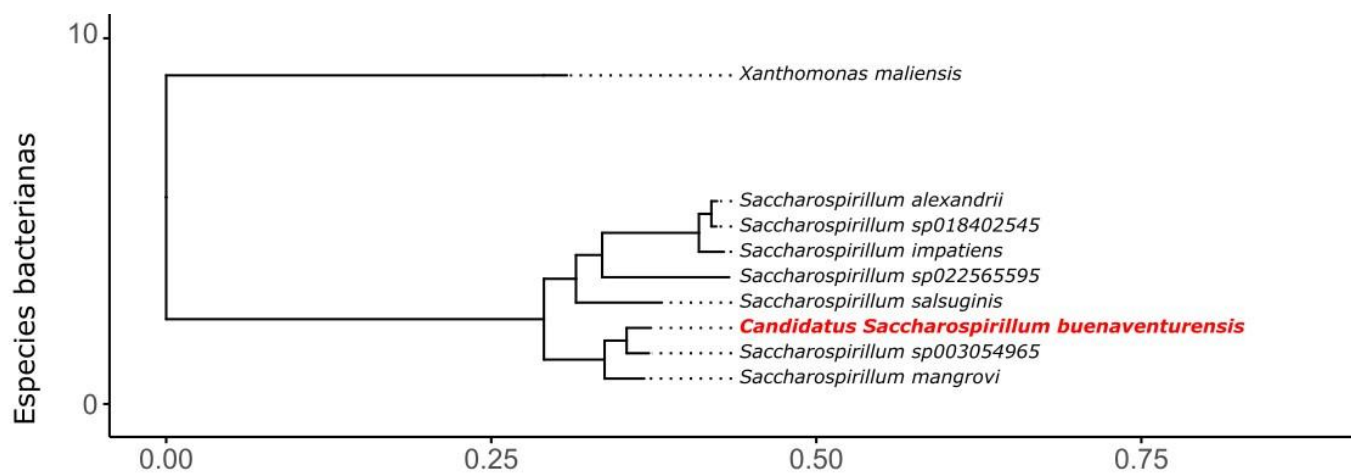
Por otra parte, para el MAG del género *Poalibacter* (Bin 21: completación: 88.12% y contaminación: 3.94%, Tablas 2 y 4), fue posible resolver su relación evolutiva con las tres especies que se han descrito dentro de este grupo (Figura 9C). Esta especie se encontró tanto en las raíces de *R. mangle* como en los neumatóforos de *A. germinans* (Figura 8). Se propuso como estatus taxonómico provisional el nombre de *Candidatus Poalibacter estuarensis* (Figura 9C).

En cuanto al MAG del género *Croceibacterium* (Bin 22: completación: 96.89% y contaminación: 1.15%, Tablas 2 y 4), se determinó su relación evolutiva con las 21 especies que se han reportado hasta el momento dentro de este género (Figura 9D). Además, se identificó que esta nueva especie se encuentra relacionada con el grupo que conforman las especies *Croceibacterium salegens* y *Croceibacterium sp030657335*. Se propuso como estatus taxonómico temporal el nombre de *Candidatus Croceibacterium rhizophorae* para esta nueva especie (Figura 9D). Esta especie se encontró en el tejido foliar y radicular de *R. mangle* (Figura 8).

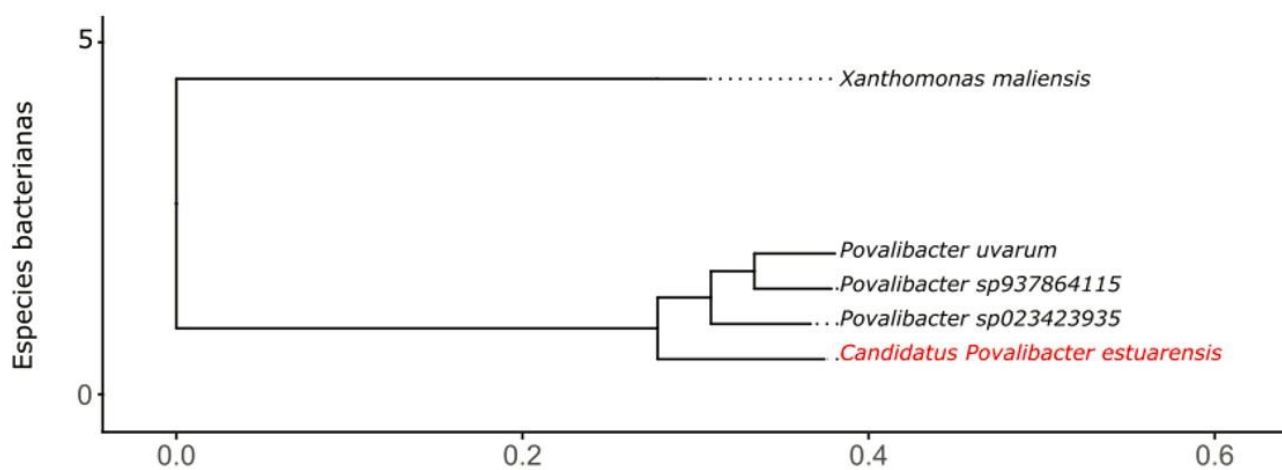
Respecto al MAG del género *Norcardioides* (Bin 29: completación: 95.63% y contaminación: 0.86%, Tablas 2 y 4). Se determinó su relación evolutiva con las otras especies que se han reportado dentro del género (Figura 9E). Esta especie se encuentra relacionada con un clado de diversas especies dentro de las cuales resaltan *Norcardioides gansuensis*, *Norcardioides seonyunsis* y *Norcardioides furvisabuli* (Figura 9E). Se postuló como estatus taxonómico temporal el nombre *Candidatus Norcardioides radicola* y resalta el hecho de que se encontró en las hojas y raíces de *R. mangle* (Figura 8).

Por último, para el MAG del género *Illumatobacter* (Bin 30: completación: 93.49% y contaminación: 2.86%, Tablas 2 y 4) se estableció su relación filogenética con las 10 especies que pertenecen a este grupo. Como estatus taxonómico provisional se propuso el nombre *Candidatus Illumatobacter rhizomanglaris* (Figura 9F). Esta especie de bacteria se encontró de forma exclusiva asociada con las raíces de *R. mangle* (Figura 8).

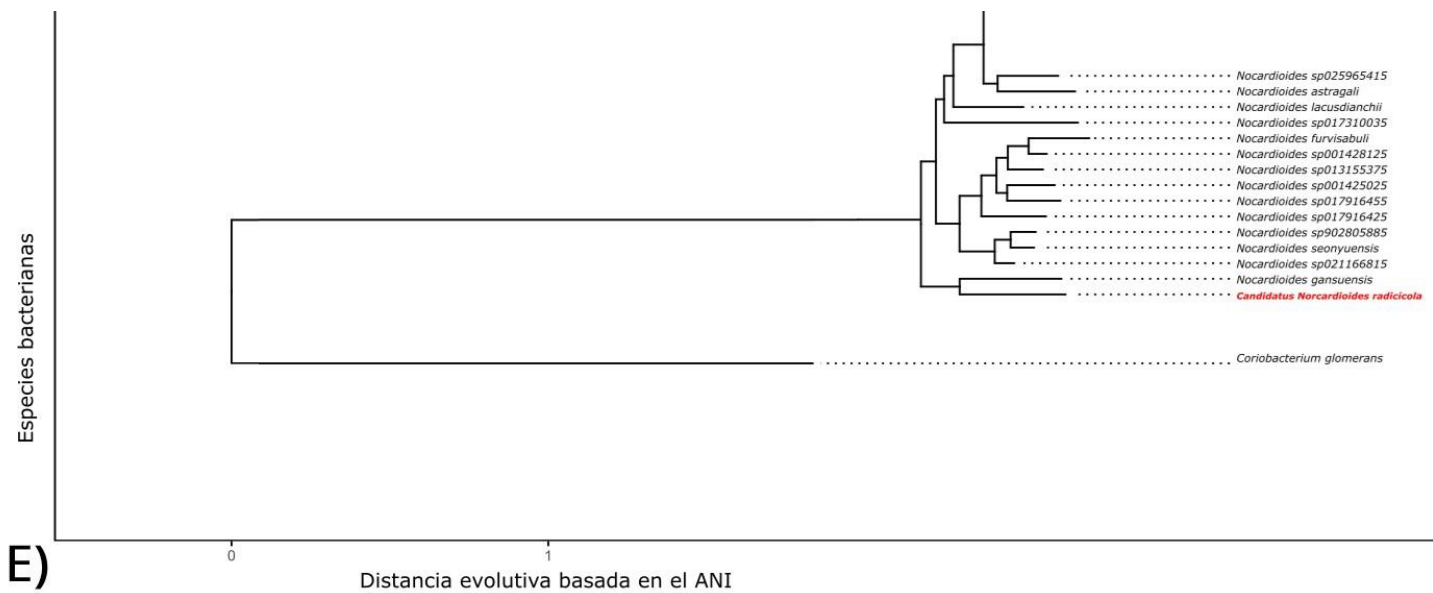
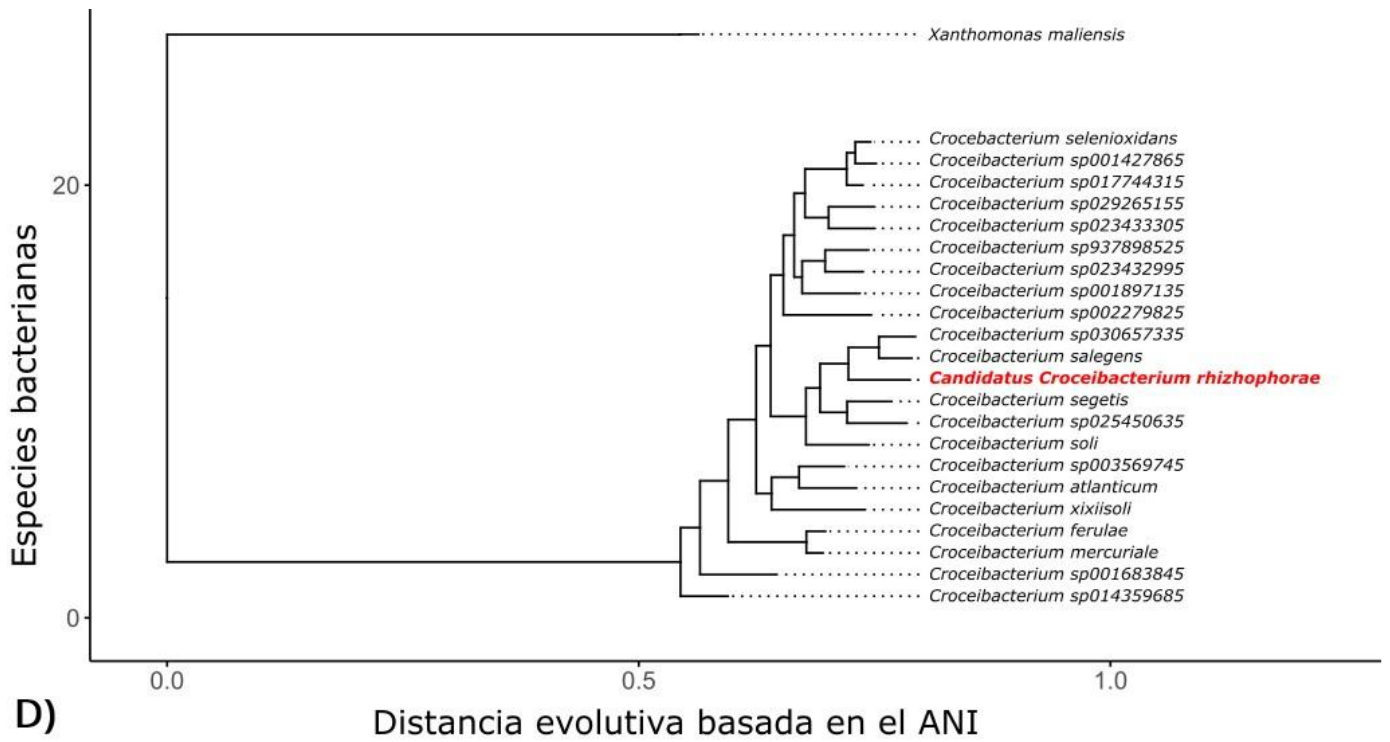




B) Distancia evolutiva basada en el ANI



C) Distancia evolutiva basada en el ANI



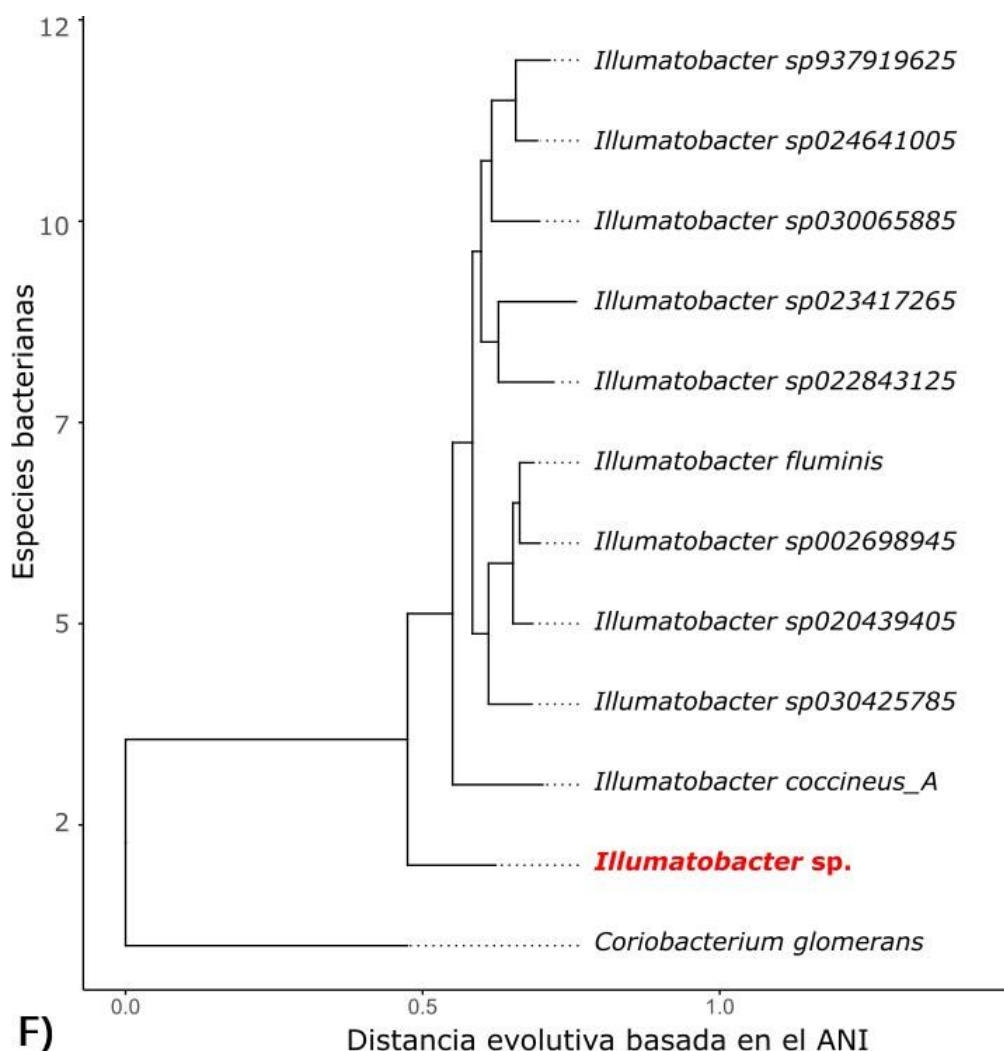


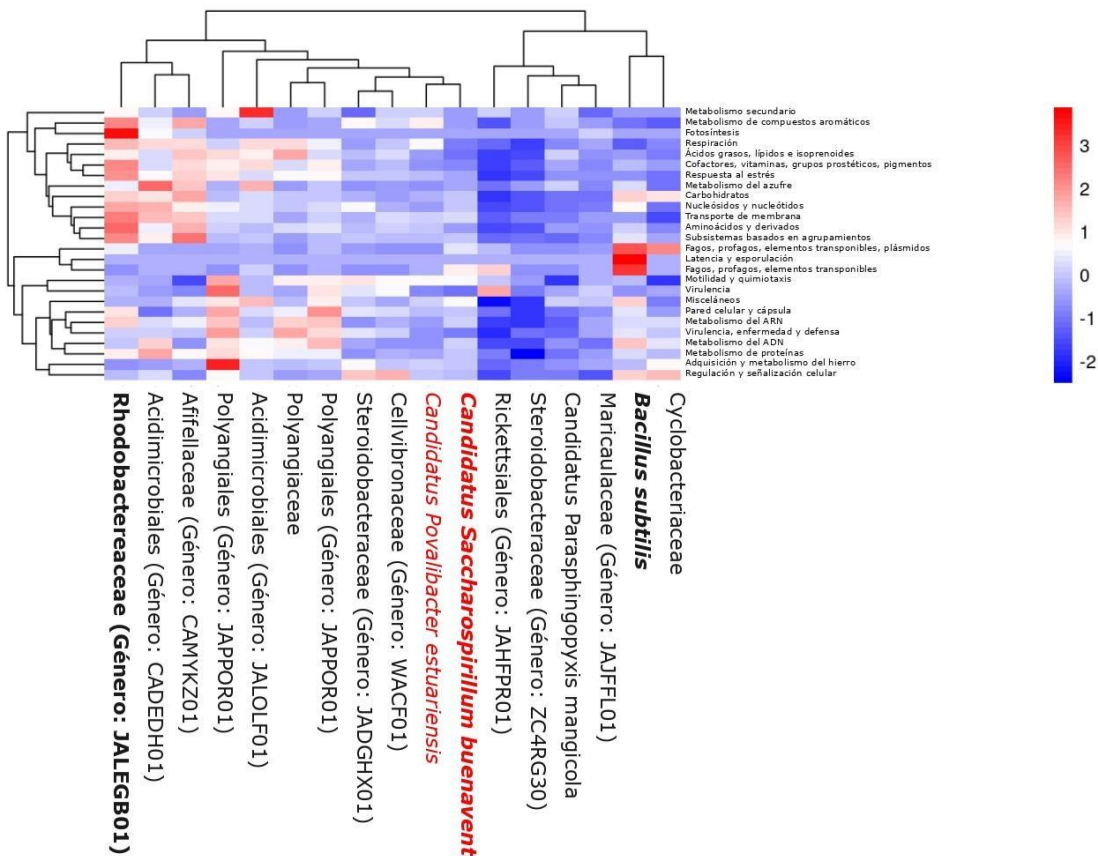
Figura 9. Árboles filogenéticos basados en el ANI, que muestran la relación de los MAG de las nuevas especies (en rojo) con las otras especies reportadas dentro de los respectivos géneros. A) *Parasphingopyxis*. B) *Saccharospirillum*. C) *Povalibacter*. D) *Croceibacterium*. E) *Norcardioides*. F) *Illumatobacter*. (Las filogenias se presentaron de forma parcial para mejorar la visualización. Consultar el Anexo 12 para ver la versión completa).

Anotación funcional de los MAG : caracterización del potencial funcional de algunas especies de endófitos

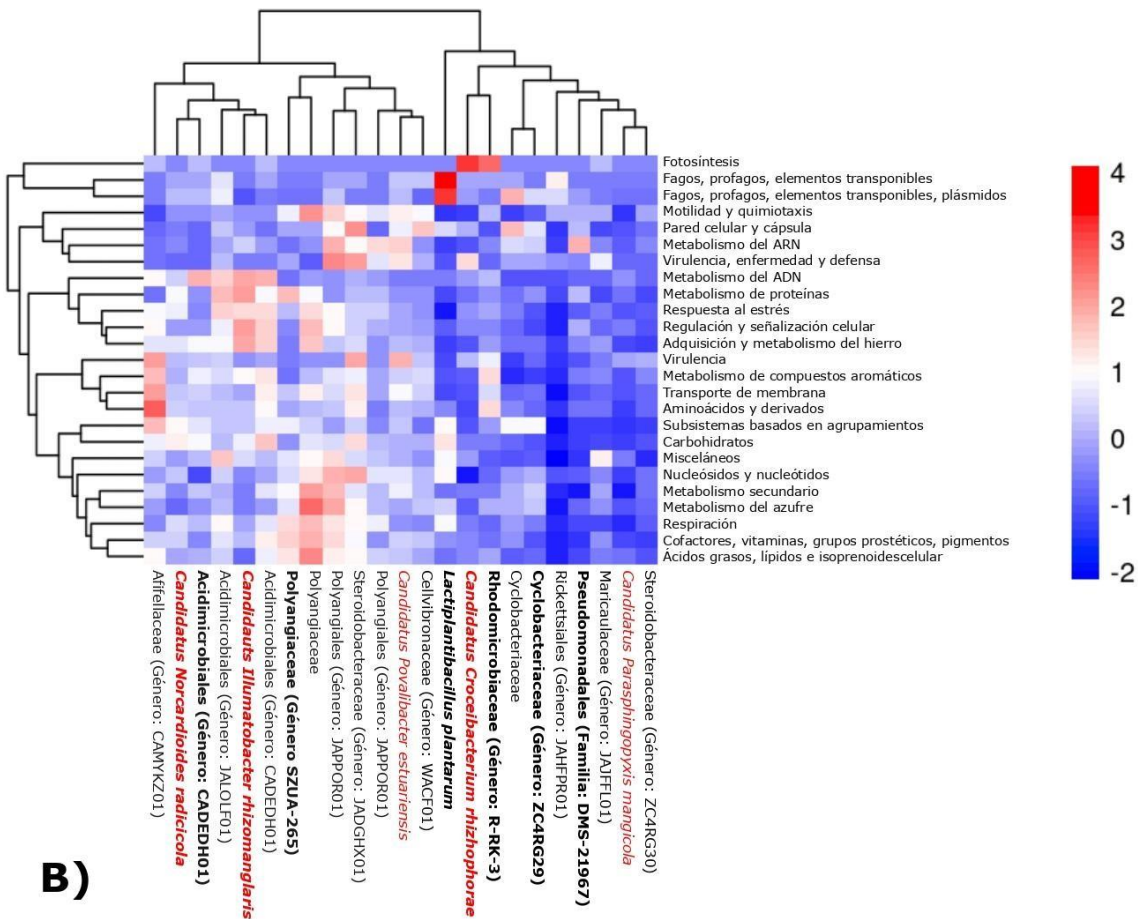
La anotación de los 26 MAG contra la base de datos de subsistemas del SEED mostró en cuáles categorías metabólicas había una mayor abundancia de CDS (Figura 10). Dentro de estos resultados fue notable el potencial metabólico de algunas de las especies que no han sido reportadas, todavía. Para la especie *Candidatus Illumatobacter rhizomanglaris*, que hace parte del metagenoma de *R. mangle*, se identificó una alta prevalencia de CDS relacionados con metabolismo de ADN, proteínas, hierro, regulación y señalización celular y respuestas al estrés (Figura 10A). Para la especie *Candidatus Povalibacter estuarensis*, los CDS asociados con virulencia fueron dominantes. Aunque esta especie está presente en las dos plantas

hospederos, este potencial patogénico solo se evidenció en *R. mangle* (Figura 10). Con relación a la especie Candidatus *Croceibacterium rhizophorae* fueron relevantes los CDS asociados con funciones de fotosíntesis (Figura 10A).

En algunos de los genomas ensamblados se identificó una alta abundancia de CDS en categorías funcionales específicas. Por ejemplo, en el genoma de la familia Polyangiaceae (Bin 34, Tabla 4) se detectó un potencial significativo para el metabolismo del azufre (Figura 10A). Asimismo, en el genoma del género CAMYKZ01, perteneciente a la familia Afifellaceae (Bin 14, Tabla 4), se observó una alta prevalencia de genes relacionados con el metabolismo y transporte de aminoácidos (Figura 10A). Por otro lado, en el genoma correspondiente al género JAPPOR01, del orden Polyangiales (Bin 6, Tabla 4), se identificó un marcado potencial para la adquisición y el metabolismo del hierro (Figura 10B).



A)



B)

Figura 10. Análisis del potencial metabólico asociado con las 26 especies de la comunidad de endófitos rescatadas del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Abundancia de los CDS dentro de las diferentes categorías de la base de datos de subsistemas del SEED. A) MAG ensamblados a partir de los metagenomas de *A. germinans*. B) MAG recuperados de los metagenomas de *R. mangle*.

Anotación funcional de los MAG: aporte de algunas especies de endófitos en la interacción mangleendófito:

En cuanto a las funciones relevantes para la interacción planta-microorganismo, se determinó que las 26 especies para las cuales se pudo ensamblar su genoma a partir de los metagenomas pueden contribuir de forma individual en procesos metabólicos de la planta, aportan a la resistencia contra el estrés biótico y abiótico, y cuentan con características relevantes para el endófitismo como funciones relacionadas con la comunicación con la planta hospedera y su colonización (Figura 11).

Dentro del potencial metabólico de los 26 genomas analizados las funciones con mayor abundancia de CDS fueron el metabolismo de nucleósidos derivados de plantas, la solubilización de fósforo, la neutralización del estrés por salinidad, del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, además de las proteínas relacionadas con los procesos de señalización en condiciones de estrés (Figura 11). Se encontró que la mayoría de los genomas contaba con genes implicados en la resistencia a metales pesados como el arsénico, el cobalto, el cobre, el níquel y el zinc (Figura 11). Con relación a la colonización de la planta hospedera, en todos los genomas resaltó la utilización de aminoácidos derivados de los árboles de mangle (Figura 11). Por último, se identificaron diversas categorías funcionales que promueven el crecimiento de la planta hospedera en los 26 genomas que se relacionan con la adquisición de elementos como el hierro, el nitrógeno y el azufre (Figura 11).

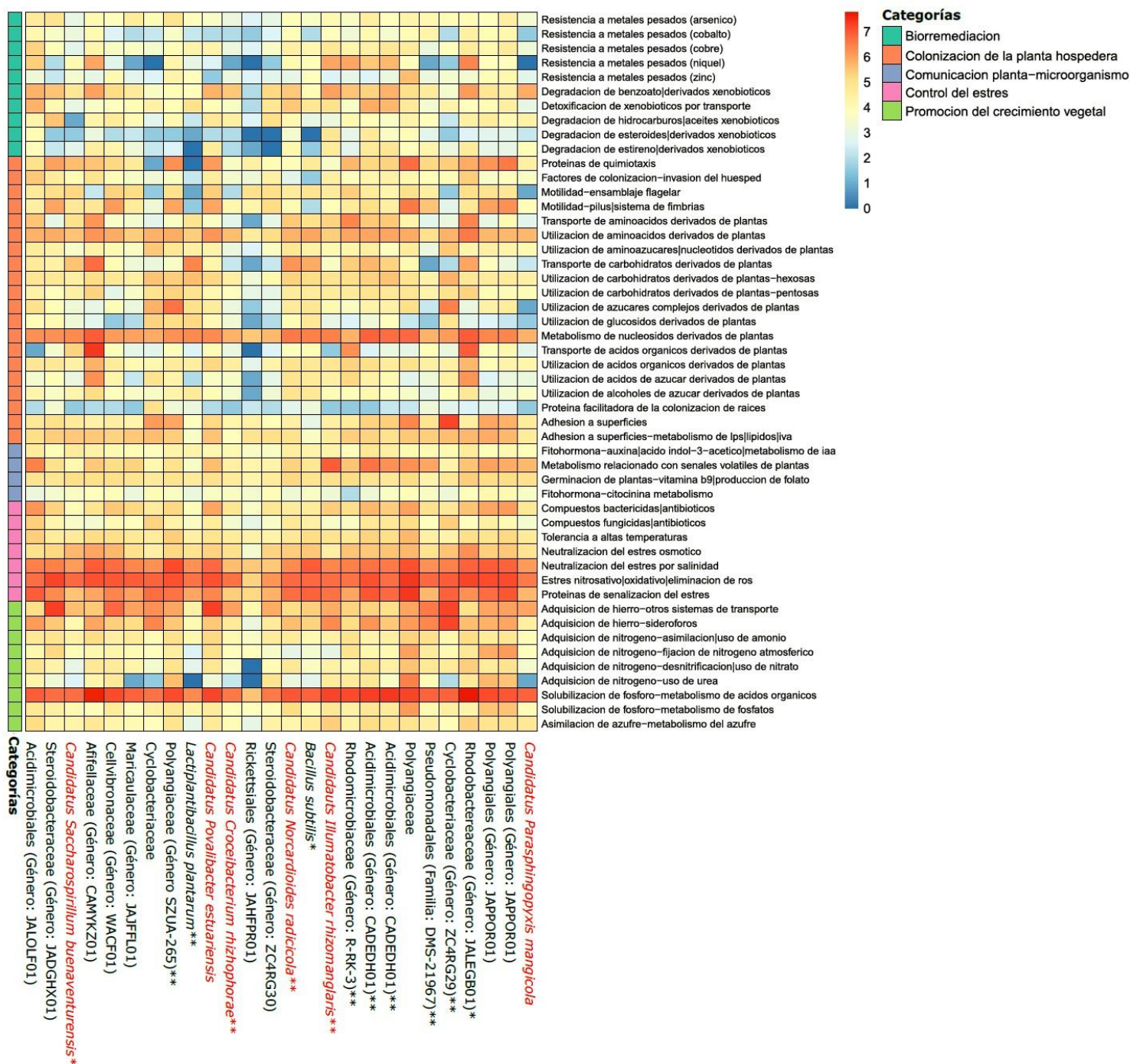


Figura 11. Análisis del potencial metabólico de 26 especies de la comunidad de endófitos asociados con el tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans*. Abundancia de los CDS de cada genoma en diferentes categorías relacionadas con la interacción planta-microorganismo. En rojo se encuentran los genomas de las especies para las cuales se propuso un estatus taxonómico provisional en esta investigación. *Genomas exclusivos de *A. germinans*. **Genomas exclusivos de *R. mangle*. En la escala del heatmap, el rojo indica una alta abundancia de secuencias codificantes en las categorías de la base de datos PLaBase, mientras que el azul representa su ausencia.

Discusión:

En este capítulo se determinaron las posibles funciones que desempeñan bacterias endófitas específicas en su asociación con las hojas y raíces de *R. mangle* y *A. germinans*. La metagenómica de genomas completos permitió ensamblar y caracterizar taxonómica y funcionalmente 26 genomas de bacterias endófitas, de los cuales 24 corresponden a especies no descritas previamente. Estas especies tienen el potencial de proporcionar a sus plantas hospederas mecanismos complementarios de adaptación a las condiciones de la zona intermareal, compartiendo las funciones observadas a nivel comunitario. Los resultados obtenidos destacan que los endófitos en los bosques de manglar son altamente diversos e inexplorados, con numerosos linajes aún no descritos y con características de interés ecológico y biotecnológico.

Con relación al componente taxonómico de los MAG, se identificaron 26 especies de bacterias diferentes (Tabla 4). Este hallazgo es relevante desde el punto de vista bioinformático y ecológico, ya que el proceso de agrupar o poner juntos los fragmentos de los diferentes genomas (binning), en ecosistemas hipersalinos, está influenciado por la estructura de la diversidad microbiana. En estos ambientes, las presiones ambientales seleccionan un número reducido de especies con alta variabilidad genética, lo que representa un desafío significativo para la recuperación de MAG (Ramos-Barbero et al., 2019). Luo et al., (2021) recuperaron 64 MAG de bacterias y tres de arqueas a partir de muestras de sedimento de manglar (completación > 50% y contaminación < 10%). En este estudio, la cantidad de genomas recuperados fue menor debido, posiblemente, a la aplicación de criterios más estrictos en los parámetros de completación y contaminación para el filtrado de los MAG (Tabla 2). A nivel ecológico, esta diferencia también puede explicarse por la menor diversidad de la comunidad de endófitos en comparación con los microorganismos presentes en los sedimentos y en la superficie de las plantas, ya que estos últimos no enfrentan los mecanismos de selección impuestos por la planta hospedera (Yao et al., 2020; Yuan et al., 2023). El hecho de que todos los MAG pertenecían a especies de bacterias, puede deberse a que fueron los grupos más abundantes dentro de la microbiota analizada (Anexo 8). La baja abundancia de ciertos grupos microbianos dificulta su recuperación mediante los algoritmos de binning (Wang et al., 2012), por lo cual no fue posible ensamblar genomas de hongos, arqueas ni virus que cumplieran con los parámetros de calidad establecidos.

Solo dos de los genomas recuperados pudieron ser identificados hasta especie: *Bacillus subtilis* y *Lactiplantibacillus plantarum* (Tabla 4). *Bacillus subtilis* se ha aislado del interior de hojas y raíces de *Ceriops tagal* (Perr.) y *Rhizophora mucronata* Lam., ambos árboles de la familia Rhizophoraceae, y se ha comprobado que presenta actividad antibacteriana (Prihanto, 2018; Haryani et al., 2020). En cuanto a *Lactiplantibacillus plantarum*, se considera una especie generalista que tiene la capacidad de ser endófito (Skotniczny & Satora, 2023), pero hasta el momento no hay registro de que interactúe con árboles de mangle, por

lo que este sería el primer reporte como endófito de *A. germinans*. A nivel funcional, se ha reportado que *Bacillus subtilis* promueve el crecimiento vegetal (Ferreira et al., 2018). Además, contribuye a la tolerancia al estrés salino mediante la producción de la enzima ACC desaminasa (Ferreira et al., 2018). Esto podría explicar la alta abundancia de CDS relacionados con proteínas de señalización de estrés y de neutralización por el estrés salino; sin embargo, es necesario complementar esta información con estudios sobre la expresión génica como respuesta a los cambios en la salinidad. Los resultados obtenidos se suman a la evidencia previa para proponer a *Bacillus subtilis* como una bacteria promotora de crecimiento que puede ser empleada en la agronomía sustentable (Afridi et al., 2024). Con relación a *Lactiplantibacillus plantarum*, en otros estudios se ha demostrado que produce metabolitos bioactivos con actividad antibacteriana y antifúngica (Javed et al., 2022; Petkova et al., 2022), lo que soporta las funciones que se encontraron en los procesos de anotación.

Igualmente, se identificaron especies nuevas dentro de diferentes géneros (Tabla 4). Este fue un hallazgo importante, ya que expande el conocimiento sobre endófitos en los bosques de manglar. Los taxa identificados son coherentes con las otras especies reportadas dentro de su respectivo grupo, ya que se han aislado de ecosistemas con condiciones similares a los bosques de manglar. Por ejemplo, las otras especies dentro del género *Parasphingopyxis* se han aislado de muestras de agua de mar costera y asociadas con algas rojas (Choi et al., 2021). Dentro del género *Saccharospirillum*, la especie *Saccharospirillum mangrovi*, se aisló de sedimentos de manglar (Zhang et al., 2018). El género *Povalibacter* se ha encontrado estableciendo relaciones con plantas que crecen en condiciones de salinidad moderada (Abdelfadil et al., 2024). Especies del grupo *Croceibacterium* se han obtenido del sedimento de la zona intermareal y se han identificado como endófitas (Liu et al., 2019; Sun et al., 2024). También, especies del grupo *Norcardioides* se han encontrado como endófitas de plantas de mangle (Jiang et al., 2018). Además, especies del género *Illumatobacter* se han detectado en alta abundancia en asociación con organismos marinos (Valliappan et al., 2014). Todos estos resultados podrían atribuirse a que la microbiota de los ecosistemas de manglar es una combinación de microorganismos terrestres, marinos y de agua dulce (Palit et al., 2022) y que, seguramente, su actividad metabólica, bien adaptada a estos ambientes complejos, les permite sobrevivir en las condiciones adversas de este ecosistema. Todo esto sugiere que la presión de selección ejercida por el ambiente extremo del manglar ha favorecido funciones especializadas dentro del microbioma.

En microbiología, la delimitación de especies es un desafío debido a la alta diversidad microbiana no cultivable, cuya existencia ha sido revelada gracias al desarrollo de herramientas de secuenciación (Culligan et al., 2016). Para estos grupos, los criterios taxonómicos tradicionales no son aplicables, ya que su caracterización fenotípica depende de pruebas en medios de cultivo (Rosselló-Móra & Amann, 2015). Debido a esto, la identificación de 24 posibles nuevas especies en esta investigación representa un aporte

significativo para fortalecer las iniciativas de caracterización y conservación de la diversidad microbiana en ecosistemas de manglar (Allard et al., 2020). Tradicionalmente, para que una especie microbiana sea considerada nueva, debe cumplir con tres criterios: coherencia genómica, coherencia fenotípica y monofilia (Rosselló-Móra & Amann, 2015). En este estudio, los 24 MAG propuestos como nuevas especies fueron evaluados en función de su coherencia genómica y monofilia, mediante la estimación del ANI y el análisis de sus relaciones filogenéticas con otros linajes bacterianos, lo que proporcionó evidencia robusta para su delimitación taxonómica. Esta metodología ha sido adoptada en otros estudios metagenómicos recientes (Liu et al., 2023; Zhang et al., 2023). No obstante, no fue posible evaluar el criterio de coherencia fenotípica. Esta limitación ha sido objeto de debate en los últimos años, y como solución provisional, se ha incorporado el uso del término *Candidatus* para designar a microorganismos no cultivables identificados únicamente mediante datos de secuenciación de ADN. Konstantinidis et al. (2015, 2020), han enfatizado la necesidad de establecer un sistema de nomenclatura válido que priorice el uso del término *Candidatus*, y que valide las secuencias genómicas como material alternativo para las descripciones taxonómicas. Teniendo en cuenta lo anterior, nuestros hallazgos permiten proponer los nombres *Candidatus Parasphingopyxis mangicola*, *Candidatus Saccharospirillum buenaventurensis*, *Candidatus Povalibacter estuarensis*, *Candidatus Croceibacterium rhizophorae*, *Candidatus Nocardioides radicolica* y *Candidatus Illumatobacter rhizomanglaris* para seis de las especies identificadas en el microbioma estudiado.

Respecto al potencial biotecnológico de los microorganismos estudiados, se identificaron diversas funciones de interés relacionadas con las condiciones ambientales de los manglares. En primer lugar, el enriquecimiento funcional de los MAG para la metabolización del fósforo y del nitrógeno se puede atribuir a la deficiencia de estos elementos en el entorno donde se encuentran los microorganismos. Ishfaq et al., (2025), reportaron que 73.3% de las plantas de mangle son deficientes en nitrógeno y 16,4% en fósforo. Esto sugiere que los endófitos están ayudando a suplir estas deficiencias nutricionales. Desde una visión para la agricultura sostenible, estas características son relevantes, ya que permitirían el reemplazo de fertilizantes químicos por la inoculación con endófitos que puedan promover el crecimiento vegetal (de Medeiros Azevedo et al., 2021). Para la agricultura sostenible también son importantes las funciones relacionadas con la resistencia al estrés abiótico, como las identificadas en los 26 MAG. Ya que, según las estimaciones, el incremento de la salinidad en los suelos podría generar pérdidas del 50% de la tierra cultivable del mundo (Mal & Panchal, 2024). Por el lado de la biorremediación, el enriquecimiento de los MAG en funciones asociadas a la degradación de contaminantes, como metales pesados y xenobióticos, sugiere que estas especies poseen propiedades de biosorción y bioacumulación, lo que las posiciona como potenciales candidatas para aplicaciones biotecnológicas (Slama et al., 2021). En conjunto, estos resultados destacan el potencial biotecnológico de los endófitos de manglar del Pacífico colombiano, no solo para

mejorar el crecimiento vegetal y la resiliencia ante el estrés ambiental, sino también para contribuir a estrategias de biorremediación en ecosistemas impactados por la contaminación. Nuestra investigación representa un punto de partida para el desarrollo de estudios aplicados que permitan aprovechar el potencial metabólico de la comunidad endófito del mangle rojo y el mangle negro.

En conclusión, la genómica ambiental permitió ensamblar y caracterizar genomas de especies particulares de endófitos asociados con *R. mangle* y *A. germinans* que no se han logrado cultivar. Los resultados obtenidos son una gran contribución al estudio de la diversidad microbiana de los endófitos en los ecosistemas de manglar. El potencial metabólico de cada genoma coincide con las funciones identificadas a nivel comunitario, lo que permite inferir que las presiones de selección dadas por el entorno y por la planta hospedera estructuran una comunidad con características metabólicas específicas, que, de forma sinérgica, contribuyen en la adaptación de los árboles de mangle. Este estudio destaca el valor de las metodologías ómicas para caracterizar interacciones planta-endófito, permitiendo acceder a información genómica de especies no cultivables que, con enfoques tradicionales, permanecerían desconocidas. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la microbiota endófito de los manglares y sientan las bases para futuras investigaciones sobre sus aplicaciones.

Discusión general:

En esta investigación se buscó caracterizar y comparar la microbiota y el microbioma del tejido foliar y radicular de *R. mangle* y *A. germinans* en la bahía de Buenaventura, Colombia. Los bosques de manglar albergan una comunidad microbiana diversa que contribuye activamente al mantenimiento de este ecosistema y en las funciones ecológicas que ocurren en él (Allard et al., 2020). Dentro de esta comunidad, los microorganismos endófitos, son de especial interés debido a su potencial metabólico, que los hace candidatos prometedores para aplicaciones biotecnológicas en diversas industrias (Paul et al., 2020; Dwibedi et al., 2022; Watts et al., 2023). A pesar de la relevancia de los endófitos en la ecología y biotecnología, su estudio en ecosistemas de manglar ha sido limitado en comparación con otros entornos bien caracterizados, como los bosques tropicales y subtropicales (Harrison & Griffin, 2020). *R. mangle* y *A. germinans* son especies dominantes en la vegetación de la bahía de Buenaventura, cuya distribución está determinada por factores fisicoquímicos del suelo, la exposición a las mareas y por gradientes ambientales (Cantera & Blanco, 2001). Además de su papel ecológico, estas especies tienen importancia económica para las comunidades locales, ya que se utilizan como fuente de madera y en la medicina tradicional (Palacios & Cantera, 2017). Debido a la importancia ecológica y socioeconómica de estas plantas, su microbiota endófito representa un aspecto importante para comprender mejor el rol de los microorganismos en este ecosistema y desarrollar futuras aplicaciones.

Mediante la metagenómica, fue posible caracterizar a nivel taxonómico y funcional la comunidad endófito de *R. mangle* y *A. germinans*. En cuanto a la diversidad y la estructura de la microbiota endófito se encontró que la comunidad se encuentra constituida principalmente por bacterias, seguida de hongos, arqueas y virus. La diversidad de microorganismos se vio influenciada por el tipo de tejido, siendo las raíces y los neumatóforos las partes de la planta donde hubo una mayor presencia microbiana. Este patrón ha sido observado en otros estudios sobre la microbiota endófito (Wallace et al., 2018; Garcia et al., 2024), y se atribuye a la interacción directa de las raíces con el suelo, un ambiente con una alta diversidad de microorganismos (van der Heijden & Schlaeppi, 2015). Con relación al potencial funcional de la comunidad microbiana, se identificó a nivel comunitario y específico que los endófitos de *R. mangle* y *A. germinans* aportan con funciones clave en la interacción planta-endófito. Dentro de las principales funciones destacan: El metabolismo de nutrientes esenciales (C, N, P, S), la promoción del crecimiento vegetal y la resistencia a condiciones adversas (Estrés oxidativo, alta salinidad y concentración de metales pesados y compuestos xenobióticos), estos resultados complementan las funciones reportadas en otras investigaciones (Holguin & Bashan, 2001; Thatoi et al., 2013; Hastilestari et al., 2024).

Si bien, en otras investigaciones se ha empleado la metagenómica para caracterizar los microorganismos de los ecosistemas de manglar, en la mayoría de los casos se han enfocado en la diversidad microbiana asociada a los sedimentos (Pawano et al., 2024; Subramani et al., 2025). Es por esto, por lo que nuestros hallazgos brindan otra capa de información más específica sobre la comunidad de endófitos de este ecosistema. El hecho de haber logrado determinar la presencia de arqueas y virus dentro del tejido de las plantas de mangle, sumado a las 24 especies nuevas de bacterias no cultivables, representa una gran contribución a la caracterización de la diversidad microbiana en los manglares. Estos resultados demuestran que la creciente utilización de metodologías ómicas permite obtener resultados robustos para identificar endófitos asociados con las plantas de mangle y las funciones que se encuentran desempeñando (Bohra et al., 2024; Yang et al., 2024).

Aunque la metagenómica permitió identificar las especies que constituían la microbiota endofítica y brindó información sobre el potencial metabólico de estos microorganismos, las inferencias realizadas sobre las funciones se quedan en términos putativos, lo cual es característico de esta metodología (Simon & Daniel, 2011; Adeleke et al., 2023). Esto se debe a que la metagenómica no permite obtener información relacionada con la expresión génica de la comunidad microbiana (Kaul et al., 2016). Por este motivo, se plantea como perspectiva aplicar un enfoque multidisciplinar, que integre la metagenómica y la metatranscriptómica para brindar una mayor riqueza en el estudio de los endófitos, tanto, de *R. mangle* como de *A. germinans*. La

metatranscriptómica, se enfoca en la secuenciación de todos los ARNs producidos por la comunidad de microorganismos, presentes en una muestra y, por lo tanto, esta estrategia, sí, permitiría saber cuáles funciones se encuentran sobre o subrepresentadas en la microbiota endofítica, en un momento determinado (Nath et al., 2021). En conjunto la metagenómica y la metatranscriptómica disminuyen las limitaciones que se presentan al ser aplicadas de forma independiente, lo que permitiría una mejor caracterización de los endófitos del mangle rojo y el mangle negro a nivel taxonómico, genómico y transcripcional (Kaul et al., 2016; Sáenz et al., 2021).

En este contexto, los resultados de la caracterización taxonómica y funcional obtenidos en este estudio proporcionan una base sólida para futuras investigaciones que integren enfoques complementarios como la metatranscriptómica, la proteómica y la metabolómica. La combinación de estas metodologías permitirá profundizar en la dinámica de los microorganismos endófitos asociados con *R. mangle* y *A. germinans*, además de validar las funciones identificadas a través de la metagenómica. La identificación de especies no descritas previamente y su potencial metabólico refuerzan la importancia de seguir explorando el microbioma de los manglares y promoviendo el uso de herramientas ómicas que aporten información clave para su conservación y aprovechamiento sostenible.

Limitaciones metodológicas y consideraciones para la interpretación de los resultados

A pesar de la solidez metodológica del enfoque metagenómico empleado en este estudio, los resultados deben interpretarse considerando algunas limitaciones inherentes al tipo de datos y a las herramientas bioinformáticas utilizadas. En primer lugar, la caracterización taxonómica y funcional se basa en comparaciones con bases de datos de referencia que presentan sesgos hacia microorganismos cultivables y de interés biomédico, lo que puede afectar la representación de microorganismos propios de ecosistemas poco explorados como los manglares tropicales (Albright & Louca, 2023), un aspecto particularmente relevante dada la información aún limitada sobre la diversidad y distribución de los endófitos en bosques de manglar (Harrison & Griffin, 2020). Asimismo, ciertos grupos microbianos, como los virus, suelen estar subestimados en estudios metagenómicos debido a limitaciones asociadas a su detección, ensamblaje y anotación, lo que dificulta una caracterización exhaustiva de la fracción viral del microbioma endófito (Rose et al., 2016). Por otra parte, la inferencia funcional se fundamenta en la asignación de funciones basada en homología de secuencias, asumiendo que la similitud a nivel de secuencia implica conservación funcional, lo cual no siempre se cumple en comunidades microbianas ambientalmente diversas y evolutivamente distantes (Prakash & Taylor, 2012); en este sentido, las funciones asignadas deben considerarse putativas y requerirían validación experimental o enfoques complementarios que integren información estructural y

ecológica de las proteínas (Ghaly et al., 2025). Finalmente, aunque factores técnicos asociados al muestreo y procesamiento de las muestras pueden influir en la representatividad de las comunidades detectadas, el protocolo de desinfección empleado corresponde a un método estandarizado y previamente reportado como eficaz para minimizar la presencia de microorganismos epífitos (Correa-Galeote et al., 2018), por lo que los resultados deben entenderse como una aproximación inferencial y comparativa al microbioma endófito, más que como una descripción exhaustiva de la diversidad microbiana del ecosistema.

Conclusiones generales:

Esta investigación destaca la importancia de los microorganismos endófitos en la ecología y funcionalidad de los bosques de manglar, particularmente aquellos asociados con *R. mangle* y *A. germinans*. Se logró realizar una caracterización detallada de la comunidad microbiana, evidenciando la influencia del tipo de tejido en su composición y diversidad. Además, el análisis funcional reveló el papel clave de estos microorganismos en la adaptación de sus hospederos a condiciones ambientales extremas, así como su potencial biotecnológico en procesos como la biorremediación y la agricultura sostenible. La identificación de 24 nuevas especies microbianas subraya la necesidad de seguir explorando la microbiota endófito de las plantas de mangle, tanto para comprender su ecología como para aprovechar su potencial aplicado. En este sentido, será necesario desarrollar a futuro estudios experimentales que validen las funciones inferidas en este trabajo.

Agradecimientos:

Agradezco a las instituciones que financiaron esta investigación a través del proyecto "Investigación para el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad de los microorganismos asociados al ecosistema de manglar y la exploración de su potencial biotecnológico en la costa pacífica del Valle del Cauca", financiado por el Fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías (BPIN: 2021000100488) y la Universidad del Valle (CI: 71323).

Al profesor Nelson Toro Perea por su orientación y apoyo durante este proceso. Al Grupo de Estudios Ecogenéticos y de Biología Molecular, por el aprendizaje compartido y el acompañamiento. Al programa de Maestría en Ciencias – Biología de la Universidad del Valle, por brindar el espacio académico y el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación.

A César Alejandro Lemos Lucumí, mi compañero de investigación y de vida, por su apoyo incondicional, especialmente en los momentos más difíciles.

Por último, pero no menos importante, a mis compañeros, amigos y familia, quienes de distintas maneras me brindaron su apoyo a lo largo de esta etapa.

Literatura citada:

- Abiye, S., Assumpta, A., Ibietela, D., & Renner, N.** (2022). Culture on nutritive media and characterization of some endophytic bacteria isolated from the roots and leaves of mangrove plants: *Avicennia germinans*, *Acrostichum aureum* and *Rhizophora mangle*. *Journal of Advances in Microbiology*, 22(11), 1-11.
- Adeleke, B. S., Muller, D., & Babalola, O. O.** (2023). A metagenomic lens into endosphere microbial communities, promises, and discoveries. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), ovac030.
- Abdelfadil, M. R., Patz, S., Kolb, S., & Ruppel, S.** (2024). Unveiling the influence of salinity on bacterial microbiome assembly of halophytes and crops. *Environmental Microbiome*, 19(1), 49.
- Afridi, M., Sadaippan, B., Nassar, A. S., Mahmoudi, H., Khan, M. A., & Mundra, S.** (2024). Mangrove sediments-associated bacterium (*Bacillus* sp. SW7) with multiple plant growthpromoting traits promotes the growth of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Frontiers in Marine Science*, 11, 1379439.
- Agrolab.** (s.f.). Interpretación de análisis de fertilidad de suelos. Recuperado el 9 de febrero de 2025, de http://www.agrolab.com.mx/sitev002/sitev001/assets/interpretacion_fertsuel.pdf
- Albright, S., & Louca, S.** (2023). Trait biases in microbial reference genomes. *Scientific Data*, 10(1), 84.
- Allard, S. M., Costa, M. T., Bulseco, A. N., Helfer, V., Wilkins, L. G., Hassenrück, C., ... & Bowman, J.** (2020). Introducing the mangrove microbiome initiative: identifying microbial research priorities and approaches to better understand, protect, and rehabilitate mangrove ecosystems. *MSystems*, 5(5), 10-1128.
- Ancheeva, E., Daletos, G., & Proksch, P.** (2018). Lead compounds from mangrove-associated microorganisms. *Marine Drugs*, 16(9), 319. <https://doi.org/10.3390/MD16090319>
- Andreote, F. D., Jiménez, D. J., Chaves, D., Dias, A. C. F., Luvizotto, D. M., Dini-Andreote, F., Fasanella, C. C., et al.** (2012). The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLOS ONE*, 7(6), e38600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038600>
- Andrews, S.** (2010). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data* [Software]. Disponible en <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arbeláez-Cortés, E., Castillo-Cárdenas, M. F., Toro-Perea, N., & Cárdenas-Henao, H.** (2007). Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia*, 583(1), 321–330. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0622-9>

- Asaf, S., Numan, M., Khan, A. L., & Al-Harrasi, A. (2020).** *Sphingomonas*: From diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(2), 138-152.
- Avontuur, J. R., Palmer, M., Beukes, C. W., Chan, W. Y., Coetzee, M. P., Blom, J., ... & Steenkamp, E. T. (2019).** Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: Where to from here? *Systematic and Applied Microbiology*, 42(4), 427-439.
- Barbier, E. B., Hacker, S. D., Kennedy, C., Koch, E. W., Stier, A. C., & Silliman, B. R. (2011).** The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81(2), 169–193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Barco, R. A., Garrity, G. M., Scott, J. J., Amend, J. P., Nealson, K. H., & Emerson, D. (2018).** A genus definition for *Bacteria* and *Archaea* based on genomics.
- Bezerra, W. M., Tavares, T. C. L., Nogueira, V. L. R., Normando, L. R. O., Bomfim, T. A., Angelim, A. L., & Melo, V. M. M. (2022).** Bacteriome associated with *Rhizophora mangle* sediments within Brazil semi-arid mangroves.
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., Azhar, E. I., et al. (2017).** Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo-and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 16029657. <https://doi.org/10.4238/gmr16029657>
- Bimrah, K., Dasgupta, R., & Saizen, I. (2022).** Cultural ecosystem services of mangroves: A review of models and methods. *Springer, Singapore*, 239–250. https://doi.org/10.1007/978-981-19-27386_13
- 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.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014).** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolívar-Anillo, H. J., Asensio-Montesinos, F., Reyes Almeida, G., Solano Llanos, N., Sánchez Moreno, H., Orozco-Sánchez, C. J., & Anfuso, G. (2023).** Litter content of Colombian beaches and mangrove forests: Results from the Caribbean and Pacific coasts. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(2), 250.
- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Harmon-Smith, M., Doud, D., Reddy, T. B. K., ... & Woyke, T. (2017).** Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology*, 35(8), 725-731.

- Cadamuro, R. D., da Silveira Bastos, I. M. A., Silva, I. T., da Cruz, A. C. C., Robl, D., Sandjo, L. P., ... & Fongaro, G.** (2021). Bioactive compounds from mangrove endophytic fungus and their uses for microorganism control. *Journal of fungi*, 7(6), 455.
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J.** (2021). eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5825-5829. <https://academic.oup.com/mbe/article/38/12/5825/6379734>
- 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.
- Castro, R. A., Dourado, M. N., Almeida, J. R. D., Lacava, P. T., Nave, A., Melo, I. S. D., ... & Quecine, M. C.** (2018). Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. *Brazilian journal of microbiology*, 49(1), 59-66.
- Cerón-Souza, I., Rivera-Ocasio, E., Medina, E., Jiménez, J. A., McMillan, W. O., & Bermingham, E.** (2010). Hybridization and introgression in New World red mangroves, *Rhizophora* (Rhizophoraceae). *American Journal of Botany*, 97(6), 945-957. doi: 10.3732/ajb.0900185
- Chadha, N., Mishra, M., Rajpal, K., Bajaj, R., Choudhary, D. K., & Varma, A.** (2015). An ecological role of fungal endophytes to ameliorate plants under biotic stress. *Archives of Microbiology*, 197(7), 869-881.
- Chandramohanakumar, Z. J. N.** (2015). Distribution of amino acids in sediments of a mangrove ecosystem, west coast of India. *Mapana Journal of Sciences*, 14(2), 31.
- Chatterjee, A., & Abraham, J.** (2020). Mangrove endophytes: a rich source of bioactive substances. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources* (pp. 27-47). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-819532-1.00002-0
- Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H.** (2020). GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database.
- Chen, M., & Yu, G.** (2022). MicrobiomeProfiler: an R/shiny package for microbiome functional enrichment analysis. *R package version*, 1(0).
- Choi, S. Y., Oh, J. S., & Roh, D. H.** (2021). *Parasphingopyxis marina* sp. nov. isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), 005049.
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E. J., & Arone, G. J.** (2018). Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Frontiers in Microbiology*, 9, 484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00484>

- Costa, G. M. D., Costa, S. S., Baraúna, R. A., Castilho, B. P., Pinheiro, I. C., Silva, A., ... & Graças, D. A. D. (2023). Effects of degradation on microbial communities of an Amazonian mangrove. *Microorganisms*, 11(6), 1389.
- Cregger, M. A., Veach, A. M., Yang, Z. K., Crouch, M. J., Vilgalys, R., Tuskan, G. A., & Schadt, C. W. (2018). The *Populus* holobiont: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome. *Microbiome*, 6, 1-14. <https://link.springer.com/article/10.1186/s40168-018-0413-8>
- Culligan, E. P., & Sleator, R. D. (2016). From genes to species: novel insights from metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1181.
- Dabdoub, S. (2016). kraken-biom: enabling interoperative format conversion for Kraken results (Version 1.2). *Kraken-Biom: Enabling Interoperative Format Conversion for Kraken Results (Version, 1)*. <https://github.com/smdabdoub/kraken-biom>
- Das, S. K., Patra, J. K., & Thatoi, H. (2016). Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: A review. *International Review of Hydrobiology*, 101(1-2), 3-19.
- Dat, T. T. H., Oanh, P. T. T., Tam, V. T. T., & Anh, H. L. T. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of bacterial endophytes isolated from leaves of the mangrove plant *Rhizophora stylosa*. *Journal of Biology/Tạp chí Sinh Học*, 41(4).
- Deepika, D. S., Lavanya, J., & Sridevi, M. (2023). Screening of salt tolerant endophytic bacteria with plant growth promoting characters isolated from *Acanthus ilicifolius* L., a species of mangrove ecosystem located at Corangi Wildlife Sanctuary, Andhra Pradesh. *Journal of Applied and Natural Science*, 15(2), 518-525. doi: 10.31018/JANS.V15I2.4384
- Devadatha, B., Jones, E. B. G., Pang, K. L., Abdel-Wahab, M. A., Hyde, K. D., Sakayaroj, J., ... & Zhang, S. N. (2021). Occurrence and geographical distribution of mangrove fungi. *Fungal Diversity*, 106, 137-227.
- Devi, R. R., & Sugunan, V. S. (2020). Isolation and metabolic profile identification of four bioremedial endophytic bacterial colonies from the pneumatophore of *Avicennia officinalis* from Poovar mangrove, north east coast of Kerala, India. *Perspectives on Biodiversity of India*, 25.
- Dey, G., Upadhyay, H., Maity, J. P., Chen, C. Y., Wang, S. L., Sinha, A., & Chakraborty, A. (2024). Root-associated plant growth-promoting bacteria in mangrove ecosystem and its application in sustainable biotechnology. *Indian Journal of Microbiology*, 1-14.
- Dröge, J., & McHardy, A. C. (2012). Taxonomic binning of metagenome samples generated by nextgeneration sequencing technologies. *Briefings in Bioinformatics*, 13(6), 646-655.
- Dwibedi, V., Rath, S. K., Joshi, M., Kaur, R., Kaur, G., Singh, D., ... & Kaur, S. (2022). Microbial endophytes: application towards sustainable agriculture and food security. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(17), 5359-5384.

- Erazo-Enríquez, K., Duque, G., & Cogua, P. (2023).** Accumulation of cadmium and lead in macroinvertebrates in relation to sediment concentration and the dynamics of environmental parameters in a tropical estuary of the Colombian Pacific.
- Fadiji, A.E. y Babalola, O.O. (2020),** “Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review”, *Journal of Microbiological Methods, Elsevier, Vol. 170*, p. 105860, doi: 10.1016/J.MIMET.2020.105860.
- Fatimaa, M., Sawant, M., Yoosuf, S., Nambiar, P., Bhagwat, S., Gupte, A. y Singh, S. (2024),** “Screening of plant growth promoting and heavy metal tolerance of rhizospheric microorganisms in the mangrove ecosystem”, *Annals of Plant and Soil Research, Vol. 26(2)*, 184-194.
- Ferreira, N. C., Mazzuchelli, R. D. C. L., Pacheco, A. C., Araujo, F. F. D., Antunes, J. E. L., & Araujo, A. S. F. D. (2018).** *Bacillus subtilis* improves maize tolerance to salinity. *Ciência Rural*, 48(8), e20170910.
- Figueroa-Negrón, V. (2018).** *Endophytic fungi associated with the black mangrove Avicennia germinans in Cabo Rojo, Puerto Rico: Their antimicrobial potential* (Doctoral dissertation).
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F., & Reimer, A. (2017).** Metagenomics: the next culture-independent game changer. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1069.
- 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.
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/23/3150/192160>
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013).** Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.
- Gamboa-García, D.E., Duque, G., Cogua, P. & Marrugo-Negrete, J.L. (2020).** Mercury dynamics in macroinvertebrates in relation to environmental factors in a highly impacted tropical estuary: Buenaventura Bay, Colombian Pacific. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 40444057.
- Garcia, C., Pauli, D., Plecki, C., Alnasser, H., Rozzi, B., Calleja, S., & Arnold, A. E. (2024).** The Root Endophytic Microbiome Shifts Under Drought in High-Performing Sorghum. *Phytobiomes Journal*, 8(3), 282-296.
- Ghaly, T. M., Rajabal, V., Russell, D., Colombi, E., & Tetu, S. G. (2025).** EcoFoldDB: Protein structure-guided functional profiling of ecologically relevant microbial traits at the metagenome scale. *Environmental Microbiology*, 27(9), e70178.
- Ghosh, A., Saha, R., & Bhadury, P. (2022).** Metagenomic insights into surface water microbial communities of a South Asian mangrove ecosystem. *PeerJ*, 10, e13169.

- Gilbert, G. S., Mejía-Chang, M., & Rojas, E.** (2002). Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia*, 132, 278-285.
- Glick, B.R.** (2020). Microbiomes and Endophytes. In: *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer; Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9_2
- Goussarov, G., Claesen, J., Mysara, M., Cleenwerck, I., Leys, N., Vandamme, P., & Van Houdt, R.** (2022). Accurate prediction of metagenome-assembled genome completeness by MAGISTA, a random forest model built on alignment-free intra-bin statistics. *Environmental Microbiome*, 17(1), 9.
- Guo, J., Chen, Y., Lu, P., Liu, M., Sun, P., & Zhang, Z.** (2021). Roles of endophytic bacteria in *Suaeda salsa* grown in coastal wetlands: Plant growth characteristics and salt tolerance mechanisms. *Environmental Pollution*, 287, 117641.
- Harrison, J. G., & Griffin, E. A.** (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here. *Environmental Microbiology*, 22(6), 2107-2123. <https://sci-hub.se/10.1111/1462-2920.14968>
- Haldar, S., & Nazareth, S. W.** (2018). Taxonomic diversity of bacteria from mangrove sediments of Goa: metagenomic and functional analysis. *3 Biotech*, 8, 1-10.
- Hartman, K., & Tringe, S. G.** (2019). Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. *Biochemical Journal*, 476(19), 2705-2724.
- Haryani, Y., Hilma, R., Delfira, N., Martalinda, T., Puspita, F., Friska, A., ... & Ardi, F.** (2020, May). Antibacterial activity of *Achromobacter* sp. and *Bacillus* sp., bacterial endophytes derived from Mangrove *Ceriops tagal* (Perr.) CB Robb. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 833, No. 1, p. 012013). IOP Publishing.
- Hastilestari, B. R., Syahidah, D., Riyanti, E. I., & Alfiansah, Y. R.** (2024). Below tropical coastal land ecosystems: Composition and functional diversity of microbial community across mangroves and paddy field. In *Microbiome Drivers of Ecosystem Function* (pp. 281-309). Academic Press.
- van der Heijden, M. G., & Schlaeppi, K.** (2015). Root surface as a frontier for plant microbiome research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), 2299-2300.
- Holguin, G., Vazquez, P., & Bashan, Y.** (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 265-278.
- Imchen, M., Kumavath, R., Barh, D., Vaz, A., Góes-Neto, A., Tiwari, S., Ghosh, P., et al.** (2018). "Comparative mangrove metagenome reveals global prevalence of heavy metals and antibiotic resistome across different ecosystems". *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29521-4>.

- Inoue, T., Shimono, A., Akaji, Y., Baba, S., Takenaka, A., & Tuck Chan, H.** (2020). Mangrove–diazotroph relationships at the root, tree and forest scales: diazotrophic communities create high soil nitrogenase activities in *Rhizophora stylosa* rhizospheres. *Annals of Botany*, 125(1), 131-144.
- Irfan, Z., Firdous, S. M., Citarasu, T., Uma, G., & Thirumalaikumar, E.** (2024). Isolation and screening of antimicrobial biosurfactants obtained from mangrove plant root–associated bacteria. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(5), 3261-3274.
- Ishfaq, M., Tam, N. F. Y., Lang, T., Hussain, M., & Zhou, H.** (2025). Nitrogen-phosphorus conservation and trade-offs in mangroves. *Plant and Soil*, 1-20.
- Javed, M. R., Salman, M., Tariq, A., Tawab, A., Zahoor, M. K., Naheed, S., ... & Ali, H.** (2022). The antibacterial and larvicidal potential of bis-(2-ethylhexyl) phthalate from *Lactiplantibacillus plantarum*. *Molecules*, 27(21), 7220.
- Jiang, Z. K., Tuo, L., Huang, D. L., Osterman, I. A., Tyurin, A. P., Liu, S. W., ... & Sun, C. H.** (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 868.
- Jin, M., Guo, X., Zhang, R., Qu, W., Gao, B., & Zeng, R.** (2019). Diversities and potential biogeochemical impacts of mangrove soil viruses. *Microbiome*, 7, 1-15.
- Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., & Bello-Amez, S.** (2006). La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica)*, 24(1), 49-61.
- Kaul, S., Ahmed, M., Sharma, T., & Dhar, M. K.** (2014). Unlocking the myriad benefits of endophytes: an overview. *Microbial diversity and biotechnology in food security*, 41-57.
- Kaul, S., Sharma, T., & Dhar, M. K.** (2016). “Omics” tools for better understanding the plant–endophyte interactions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 955.
- Kanehisa, M.** (2002, November). The KEGG database. In *In silico simulation of biological processes: Novartis Foundation Symposium 247* (Vol. 247, pp. 91-103). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470857897.ch8>.
- Kathiresan, K. & Bingham, B. L.** (2001). “Biology of mangroves and mangrove ecosystems”. *Advances in Marine Biology*, 40, 81–251. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(01\)40003-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(01)40003-4).
- Kawasaki, A., Dennis, P. G., Forstner, C., Raghavendra, A. K., Mathesius, U., Richardson, A. E., ... & Ryan, P. R.** (2021). Manipulating exudate composition from root apices shapes the microbiome throughout the root system. *Plant Physiology*, 187(4), 2279-2295.

- Khan, A. L., Ullah, I., Hussain, J., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., & Lee, I. J. (2016).** Regulations of essential amino acids and proteomics of bacterial endophytes *Sphingomonas* sp. LK11 during cadmium uptake. *Environmental Toxicology*, 31(7), 887-896.
- Khan, A. L., Numan, M., Bilal, S., Asaf, S., Crafword, K., Imran, M., ... & Lee, I. J. (2022).** Mangrove's rhizospheric engineering with bacterial inoculation improves degradation of diesel contamination. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127046.
- Kolde, R. (2018).** pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12. <https://github.com/raivokolde/pheatmap>.
- Konstantinidis, K. T., & Rosselló-Móra, R. (2015).** Classifying the uncultivated microbial majority: a place for metagenomic data in the *Candidatus* proposal. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 223-230.
- Konstantinidis, K. T., Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2017).** Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *The ISME journal*, 11(11), 2399-2406.
- Konstantinidis, K. T., Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2020).** Advantages outweigh concerns about using genome sequence as type material for prokaryotic taxonomy. *Environmental Microbiology*, 22(3), 819-822.
- Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T., & Marchand, C. (2008).** Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: a review. *Aquatic Botany*, 89(2), 201-219.
- Kumar, V., Bilal, M., Shahi, S. K., & Garg, V. K. (Eds.). (2022).** *Metagenomics to bioremediation: applications, cutting edge tools, and future outlook*. Academic Press.
- Kuźniar, A., Włodarczyk, K., & Wolińska, A. (2019).** Agricultural and other biotechnological applications resulting from trophic plant-endophyte interactions. *Agronomy*, 9(12), 779.
- Kuźniar, A., Kruczyńska, A., Włodarczyk, K., Vangronsveld, J., & Wolińska, A. (2025).** Endophytes as Permanent or Temporal Inhabitants of Different Ecological Niches in Sustainable Agriculture. *Applied Sciences*, 15(3), 1253.
- Lacava, P. T., Bogas, A. C., & Cruz, F. D. P. N. (2022).** Plant growth promotion and biocontrol by endophytic and rhizospheric microorganisms from the tropics: a review and perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 796113.
- Lai, J., Cheah, W., Palaniveloo, K., Suwa, R., & Sharma, S. (2022).** A systematic review of the physicochemical and microbial diversity of mangrove forests. *Forests*, 13(12), 2160.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.

- Laux, M., Ciapina, L. P., de Carvalho, F. M., et al.** (2024). Living in mangroves: a syntrophic scenario unveiling a resourceful microbiome. *BMC Microbiology*, 24(1), 228.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S. C., & Chun, J.** (2016). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1100-1103.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup.** (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/25/16/2078/204688>
- Liu, Y. H., Fang, B. Z., Dong, Z. Y., Li, L., Mohamad, O. A. A., Zhang, Y. G., ... & Li, W. J.** (2019). *Croceibacterium* gen. nov., with description of *Croceibacterium ferulae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Ferula sinkiangensis* KM Shen and reclassification of *Porphyrobacter mercurialis* as *Croceibacterium mercuriale* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(8), 2547-2554.
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y.** (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315–330.
<https://doi.org/10.1007/S13238-020-00724-8>
- Liu, S., Hu, R., Peng, N., Zhou, Z., Chen, R., He, Z., & Wang, C.** (2023). Phylogenetic and ecophysiological novelty of subsurface mercury methylators in mangrove sediments. *The ISME Journal*, 17(12), 2313-2325.
- Luo, Z., Zhong, Q., Han, X., Hu, R., Liu, X., Xu, W., ... & Wang, C.** (2021). Depth-dependent variability of biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in mangrove sediments. *Microbiome*, 9, 1-14.
- de Medeiros Azevedo, T., Aburjaile, F. F., Ferreira-Neto, J. R. C., Pandolfi, V., & Benko-Iseppon, A. M.** (2021). The endophytome (plant-associated microbiome): methodological approaches, biological aspects, and biotech applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 206.
- Mal, S., & Panchal, S.** (2024). Drought and salt stress mitigation in crop plants using stress-tolerant auxin-producing endophytic bacteria: a futuristic approach towards sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1422504.
- Mande, S. S., Mohammed, M. H., & Ghosh, T. S.** (2012). Classification of metagenomic sequences: methods and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 13(6), 669-681.
- Marfil-Santana, M. D., Martínez-Cárdenas, A., Ruíz-Hernández, A., Vidal-Torres, M., MárquezVelázquez, N. A., Figueroa, M., & Prieto-Davó, A.** (2021). A meta-omics analysis

unveils the shift in microbial community structures and metabolomics profiles in mangrove sediments treated with a selective actinobacterial isolation procedure. *Molecules*, 26(23), 7332.

Maysaroh, S., Ismet, M. S., Andini, R., Anggraini, N. P., & Subhan, B. (2024). High and Low Taxa Specificity of Rhizosphere Bacterial Communities of Mangrove (*Rhizophora mucronata*) from Kuala Langsa and Telaga Tujuh Island, East Aceh. *Scientific Journal of Fisheries & Marine/Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 16(2).

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.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061217>

de Medeiros Azevedo, T., Aburjaile, F. F., Ferreira-Neto, J. R. C., Pandolfi, V., & Benko-Iseppon, A. M. (2021). The endophytome (plant-associated microbiome): methodological approaches, biological aspects, and biotech applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 206.

Mendes, L. W., Taketani, R. G., Navarrete, A. A., & Tsai, S. M. (2012). Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. *Research in Microbiology*, 163(5), 366-377.

Meng, S., Peng, T., Liu, X., Pratush, A., Wang, H., Huang, T., ... & Hu, Z. (2022). Archaeal communities of South China mangroves and their potential roles in the nitrogen cycle. *Geomicrobiology Journal*, 39(8), 697-704.

Mikheenko, A., Saveliev, V., & Gurevich, A. (2016). MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics*, 32(7), 1088-1090.
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/32/7/1088/1743987>

Ministerio de AgroIndustria (s.f.). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina. Valores de referencia para diagnóstico de suelos. Recuperado el 9 de febrero de 2025, de https://magyp.gob.ar/brechaproductiva/_pdf/valores-de-referencia-para-diagnostico-desuelos.pdf

Mitra, A. (2020). Ecosystem Services of Mangroves: An Overview. En *Mangrove Forests in India* (pp. 1–32). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20595-9_1

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.

Mukherjee, A., Anam, G. B., & Ahn, Y. H. (2025). 3 Omics' Approach to Discern the Functional Diversity of Fungi in Plants. En *Natural Bioactives from the Endophytes of Medicinal Plants* (p. 35).

- Muwawa, E. M., Obieze, C. C., Makonde, H. M., Jefwa, J. M., Kahindi, J. H., & Khasa, D. P.** (2021). 16S rRNA gene amplicon-based metagenomic analysis of bacterial communities in the rhizospheres of selected mangrove species from Mida Creek and Gazi Bay, Kenya. *PloS One*, 16(3), e0248485.
- Naskar, S., & Palit, P. K.** (2015). Anatomical and physiological adaptations of mangroves. *Wetlands Ecology and Management*, 23(3), 357-370. <https://doi.org/10.1007/S11273-014-9385-Z>
- Nath, M., Bhatt, D., Bhargava, P., & Choudhary, D. K.** (Eds.). (2021). *Microbial metatranscriptomics belowground*. Springer Singapore.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-981-15-9758-9.pdf>
- Negi, R., Sharma, B., Kumar, S., Chaubey, K. K., Kaur, T., Devi, R., ... & Yadav, A. N.** (2024). Plant endophytes: unveiling hidden applications toward agro-environment sustainability. *Folia Microbiologica*, 69(1), 181-206.
- New, F. N., & Brito, I. L.** (2020). What is metagenomics teaching us, and what is missed? *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 117-135.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A.** (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824-834.
<https://genome.cshlp.org/content/27/5/824.short>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... & Stevens, R.** (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D206-D214.
- Palacios, M. L., & Cantera, J. R.** (2017). Mangrove timber use as an ecosystem service in the Colombian Pacific. *Hydrobiologia*, 803(1), 345-358. <https://doi.org/10.1007/S10750-017-3309-X>
- 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.
<https://doi.org/10.1007/S11356-022-19048-7>
- Panda, S. K., & Das, S.** (2024). Potential of plant growth-promoting microbes for improving plant and soil health for biotic and abiotic stress management in mangrove vegetation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 23(3), 801-837.
- Patra, J.K., Mishra, R.R., & Thatoi, H.** (2020). (Eds). *Aprovechamiento Biotecnológico de los Recursos de los Manglares*. Prensa Académica.
- Patz, S., Gautam, A., Becker, M., Ruppel, S., Rodríguez-Palenzuela, P., & Huson, D.H.** *PLaBAs: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of*

plantassociated bacteria. (to be submitted, meanwhile you can read the preprint)
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.13.472471v1>

- Paul, S., Bhagobaty, R. K., Nihalani, M. C., & Joshi, S. R.** (2020). Characterization of oleaginous endophytic fungi of biodiesel plants as potential biofuel minifactories. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105750.
- Pawano, O., Jenpuntarat, N., Streit, W. R., Pérez-García, P., Pongtharangkul, T., Phinyocheep, P., ... & Intra, B.** (2024). Exploring untapped bacterial communities and potential polypropylenedegrading enzymes from mangrove sediment through metagenomics analysis. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1347119.
- Pellegrinetti, T. A., Monteiro, G. G. T. N., Lemos, L. N., dos Santos, R. A. C., Barros, A. G., & Mendes, L. W.** (2024). PGPg_finder: A comprehensive and user-friendly pipeline for identifying plant growth-promoting genes in genomic and metagenomic data. *Rhizosphere*, 30, 100905.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2452219824000600>
- Peng, M., Wang, C., Wang, Z., Huang, X., Zhou, F., Yan, S., & Liu, X.** (2022). Differences between the effects of plant species and compartments on microbiome composition in two halophyte *Suaeda* species. *Bioengineered*, 13(5), 12475-12488.
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21655979.2022.2076009>
- Peñaranda, M. L. P., Kintz, J. R. C., & Salamanca, E. J. P.** (2019). Carbon stocks in mangrove forests of the Colombian Pacific. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 227, 106299.
- Pérez-Cobas, A.E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C.** (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics, Microbiology Society*, 6, 1–22. doi: 10.1099/MGEN.0.000409
- Petkova, M., Gotcheva, V., Dimova, M., Bartkiene, E., Rocha, J. M., & Angelov, A.** (2022). Screening of *Lactiplantibacillus plantarum* strains from sourdoughs for biosuppression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Botrytis cinerea* in table grapes. *Microorganisms*, 10(11), 2094.
- Polidoro, B. A., Carpenter, K. E., Collins, L., Duke, N. C., Ellison, A. M., Ellison, J. C., Farnsworth, E. J., et al.** (2010). The loss of species: Mangrove extinction risk and geographic areas of global concern. *PLOS ONE*, 5(4), e10095. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0010095
- Prakash, T., & Taylor, T. D.** (2012). Functional assignment of metagenomic data: Challenges and applications. *Briefings in Bioinformatics*, 13(6), 711–727.
- Prihanto, A. A.** (2018, April). *Bacillus subtilis* UBTn7, a potential producer of L-methioninase isolated from mangrove, *Rhizophora mucronata*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1), 012077. IOP Publishing.
- Primavera, J. H., Friess, D. A., Van Lavieren, H., & Lee, S. Y.** (2019). The mangrove ecosystem.

- Quach, N. T., Vu, T. H. N., Bui, T. L., Le, T. T. X., Nguyen, T. T. A., Ngo, C. C., & Phi, Q. T.** (2022). Genomic and physiological traits provide insights into ecological niche adaptations of mangrove endophytic *Streptomyces parvulus* VCCM 22513. *Annals of Microbiology*, 72(1), 27.
- Qu, W., Lin, D., Zhang, Z., Di, W., Gao, B., & Zeng, R.** (2018). Metagenomics investigation of agarlytic genes and genomes in mangrove sediments in China: A potential repertory for carbohydrate-active enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1864.
- Rai, N., Kumari Keshri, P., Verma, A., Kamble, S. C., Mishra, P., Barik, S., ... & Gautam, V.** (2021). Plant-associated fungal endophytes as a source of natural bioactive compounds. *Mycology*, 12(3), 139-159.
- Rahmawati, S. I., Izzati, F. N., Hapsari, Y., Septiana, E., Rachman, F., Bustanussalam, & Simanjuntak, P.** (2019, May). Endophytic microbes and antioxidant activities of secondary metabolites from mangroves *Avicennia marina* and *Xylocarpus granatum*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1), 012065. IOP Publishing.
- Ramesh, A., Sajan, A., Mobram, M., Namitha, L. H., Brijithlal, N. D., & Williams, G. P.** (2024). Unique adaptations and bioresources of mangrove ecosystems. *Environmental and Experimental Biology*, 22(2), 71-78.
- Ramos-Barbero, M. D., Martín-Cuadrado, A. B., Viver, T., Santos, F., Martínez-García, M., & Antón, J.** (2019). Recovering microbial genomes from metagenomes in hypersaline environments: The good, the bad and the ugly. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(1), 3040.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., & Perkins, D. L.** (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4), 967–977. doi: 10.1016/J.BBRC.2015.12.083
- Rho, H., Hsieh, M., Kandel, S. L., Cantillo, J., Doty, S. L., & Kim, S. H.** (2018). Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta-analysis on plant stress mitigation by endophytes. *Microbial Ecology*, 75, 407-418.
- Robertson, A. I.** (1991). Plant-animal interactions and the structure and function of mangrove forest ecosystems. *Australian Journal of Ecology*, 16(4), 433–443. doi: 10.1111/J.1442-9993.1991.TB01073.X
- Rog, S. M., Clarke, R. H., & Cook, C. N.** (2017). More than marine: revealing the critical importance of mangrove ecosystems for terrestrial vertebrates. *Diversity and Distributions*, 23(2), 221–230. doi: 10.1111/DDI.12514

- Rose, R., Constantinides, B., Tapinos, A., Robertson, D. L., & Prosperi, M. (2016).** Challenges in the analysis of viral metagenomes. *Virus Evolution*, 2(2), vew022.
- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015).** Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea*. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.
- Rosero, R. F. C., Melo, C. N. C., & Bastidas, G. D. (2008).** Evaluación de los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos de las principales bahías del Pacífico colombiano. *Boletín Científico Centro de Control de Contaminación del Pacífico*, 15, 47-59.
- Roy, S., Chakraborty, A. P., & Chakraborty, R. (2021).** Understanding the potential of root microbiome influencing salt-tolerance in plants and mechanisms involved at the transcriptional and translational level. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1657-1681.
- RStudio Team (2020).** *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA. URL: <http://www.rstudio.com/>
- Saenz, C., Nigro, E., Gunalan, V., & Arumugam, M. (2022).** MIntO: a modular and scalable pipeline for microbiome metagenomic and metatranscriptomic data integration. *Frontiers in Bioinformatics*, 2, 846922. doi: 10.3389/fbinf.2022.846922
- Saha, B., & Sen, A. (2024).** Effects of plant growth-promoting halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962 with hydrocarbon degradation ability, isolated from Sundarbans mangrove area in West Bengal, on *Abelmoschus esculentus* (okra) plant growth. *Current Agriculture Research Journal*, 12(2).
- Saheb Kashaf, S., Almeida, A., Segre, J. A., & Finn, R. D. (2021).** Recovering prokaryotic genomes from host-associated, short-read shotgun metagenomic sequencing data. *Nature Protocols*, 16(5), 2520-2541.
- Sandilyan, S., & Kathiresan, K. (2012).** Mangrove conservation: A global perspective. *Biodiversity and Conservation*, 21(14), 3523–3542. doi: 10.1007/S10531-012-0388-X
- Santos, M. L. D., Berlitz, D. L., Wiest, S. L. F., Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2018).** Benefits associated with the interaction of endophytic bacteria and plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61, e18160431.
- Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018).** Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1), 25-41.
- Scherer, B. P., Mason, O. U., & Mast, A. R. (2022).** Bacterial communities vary across populations and tissue type in red mangroves (*Rhizophora mangle*, Rhizophoraceae) along an expanding front. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(12), fiac139.

- Sebastianes, F. L. S., de Azevedo, J. L., & Lacava, P. T.** (2017). Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (pp. 37-56).
- Seemann, T.** (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. URL: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/14/2068/2390517>
- Setubal, J. C.** (2021). Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. *Biophysical Reviews*, 13(6), 905-909.
- SIDAP (Sistema Departamental de Áreas Protegidas, CVC)** (2011). Humedales de Buenaventura. Disponible en: <https://sidap.cvc.gov.co/es/node/166> [Accedido el 26 diciembre 2024].
- Sim, C. S. F., Chen, S. H., & Ting, A. S. Y.** (2018). Endophytes: Emerging tools for the bioremediation of pollutants. In *Emerging and Eco-friendly Approaches for Waste Management* (pp. 189-217). Singapore: Springer.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M.** (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.
- Simões, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., Mokhtar, N. A., et al.** (2015). Soil and rhizosphere associated fungi in gray mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea — A metagenomic approach. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(5), 310–320. doi: 10.1016/J.GPB.2015.07.002
- Simon, C., & Daniel, R.** (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1153-1161. URL: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.02345-10>
- Singh, Y. D., Singh, M. C., & Panda, M. K.** (2020). Biotechnological aspects of mangrove microorganisms. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources* (pp. 381–398). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-819532-1.00018-4
- Skotniczny, M., & Satora, P.** (2023). Molecular detection and identification of plant-associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4853.
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Silini, A., Alenezi, F. N., Luptakova, L., ... & Belbahri, L.** (2021). Biotechnology and bioinformatics of endophytes in biocontrol, bioremediation, and plant growth promotion. In *Endophytes: Mineral Nutrient Management, Volume 3* (pp. 181-205).
- 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.

- de Souza Sebastianes, F. L., Romão-Dumaresq, A. S., Lacava, P. T., Harakava, R., Azevedo, J. L., De Melo, I. S., & Pizzirani-Kleiner, A. A.** (2013). Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Current Genetics*, 59, 153-166.
- 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. doi: 10.1002/ECY.3679
- Subramani, M., & Suthindhiran, K.** (2025). Exploration of uncultivable actinobacteria from pristine mangrove sediments of Palk Strait, India—A metagenomic approach. *Ecological Genetics and Genomics*, 34, 100321.
- Subudhi, E., Sahoo, R. K., Dey, S., Das, A., & Sahoo, K.** (2018). Unraveling plant-endophyte interactions: an omics insight. In *Endophytes and Secondary Metabolites* (pp. 1-19).
- Sui, J., He, X., Yi, G., Zhou, L., Liu, S., Chen, Q., ... & Wu, J.** (2023). Diversity and structure of the root-associated bacterial microbiomes of four mangrove tree species, revealed by high-throughput sequencing. *PeerJ*, 11.
- Sun, X. Y., Dong, H., Zhang, Y., Gao, J. W., Zhou, P., Sun, C., & Xu, L.** (2024). Isolation and cultivation of carotenoid-producing strains from tidal flat sediment and proposal of *Croceibacterium aestuarii* sp. nov., a novel carotenoid-producing species in the family *Erythrobacteraceae*. *Journal of Marine Science and Engineering*, 12(1), 99.
- Tatusov, R. L., et al.** (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4, 41. URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2105-4-41>
- Thatoi, H., et al.** (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. *Annals of Microbiology*, 63(1), 1–19. doi: 10.1007/S13213-012-0442-7
- Tiwari, P., & Bae, H.** (2023). Trends in harnessing plant endophytic microbiome for heavy metal mitigation in plants: a perspective. *Plants*, 12(7), 1515.
- Tong, T., Li, R., Wu, S., & Xie, S.** (2019). The distribution of sediment bacterial community in mangroves across China was governed by geographic location and eutrophication. *Marine Pollution Bulletin*, 140, 198-203.
- Uritskiy, G. V., DiRuggiero, J., & Taylor, J.** (2018). MetaWRAP—a flexible pipeline for genomeresolved metagenomic data analysis. *Microbiome*, 6, 1-13.
- Valliappan, K., Sun, W., & Li, Z.** (2014). Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 7365-7377.

- Venugopalan, A., & Srivastava, S.** (2015). Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 33(6), 873-887.
- Wallace, J., Laforest-Lapointe, I., & Kembel, S. W.** (2018). Variation in the leaf and root microbiome of sugar maple (*Acer saccharum*) at an elevational range limit. *PeerJ*, 6, e5293.
- Wang, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M., & Chin, F. Y.** (2012). MetaCluster 5.0: a two-round binning approach for metagenomic data for low-abundance species in a noisy sample. *Bioinformatics*, 28(18), i356-i362.
- Wang, W., Yan, Z., You, S., Zhang, Y., Chen, L., & Lin, G.** (2011). Mangroves: obligate or facultative halophytes? A review. *Trees*, 25, 953-963.
- Watts, D., Palombo, E. A., Jaimes Castillo, A., & Zaferanloo, B.** (2023). Endophytes in agriculture: potential to improve yields and tolerances of agricultural crops. *Microorganisms*, 11(5), 1276.
- Westreich, S. T., Treiber, M. L., Mills, D. A., Korf, I., & Lemay, D. G.** (2018). SAMSA2: a standalone metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 19, 1-11.
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B.** (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 1-13. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Xu, Y., You, G., Yin, J., Zhang, M., Peng, D., Xu, J., ... & Hou, J.** (2023). Salt tolerance evolution facilitates antibiotic resistome in soil microbiota: Evidences from dissemination evaluation, hosts identification and co-occurrence exploration. *Environmental Pollution*, 317, 120830.
- Yadav, A., & Yadav, K.** (2017). Exploring the potential of endophytes in agriculture: A minireview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 6(4), 00221.
- Yan, L., Kuang, Y., Xie, X., Peng, K., Deng, Y., Gan, Y., ... & Zhang, Y.** (2024). Insights into nitrogen biogeochemical cycling in mangrove wetland from genome-resolved metagenomic sequencing. *Journal of Hydrology*, 640, 131741.
- Yang, X., Dai, Z., Yuan, R., Guo, Z., Xi, H., He, Z., & Wei, M.** (2023). Effects of salinity on assembly characteristics and function of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of salttolerant *Avicennia marina* mangrove species. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e03000-22.
- Yang, X., Yuan, R., Yang, S., Dai, Z., Di, N., Yang, H., ... & Wei, M.** (2024). A salt-tolerant growthpromoting phyllosphere microbial combination from mangrove plants and its mechanism for promoting salt tolerance in rice. *Microbiome*, 12(1), 270.
- Yao, H., Sun, X., He, C., Li, X. C., & Guo, L. D.** (2020). Host identity is more important in structuring bacterial epiphytes than endophytes in a tropical mangrove forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(4), fiae038.

- Yeoh, Y. K.** (2021). Removing host-derived DNA sequences from microbial metagenomes via mapping to reference genomes. *The Plant Microbiome: Methods and Protocols*, 147-153.
- Yu, X., Tu, Q., Liu, J., Peng, Y., Wang, C., Xiao, F., ... & He, Z.** (2023). Environmental selection and evolutionary process jointly shape genomic and functional profiles of mangrove rhizosphere microbiomes. *Mlife*, 2(3), 253-266.
- Yuan, Z., Zeng, Z., & Liu, F.** (2023). Community structures of mangrove endophytic and rhizosphere bacteria in Zhangjiangkou National Mangrove Nature Reserve. *Scientific Reports*, 13(1), 17127.
- Yue, Y., Huang, H., Qi, Z., Dou, H. M., Liu, X. Y., Han, T. F., ... & Tu, J.** (2020). Evaluating metagenomics tools for genome binning with real metagenomic datasets and CAMI datasets. *BMC Bioinformatics*, 21, 1-15.
- Zayas-Rivera, J.** (2018). *Microbial diversity of halotolerant and halophilic endophytes from the mangrove Avicennia germinans located at the solar salterns of Cabo Rojo, Puerto Rico* (Doctoral dissertation).
- Zhang, W., Du, P., Zheng, H., Yu, W., Wan, L., & Chen, C.** (2014). Whole-genome sequence comparison as a method for improving bacterial species definition. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(2), 75-78.
- Zhang, C. J., Pan, J., Liu, Y., Duan, C. H., & Li, M.** (2020). Genomic and transcriptomic insights into methanogenesis potential of novel methanogens from mangrove sediments. *Microbiome*, 8, 1-12.
- Zhang, W., Yuan, Y., Su, D., Ding, L., Yan, X., Wu, M., ... & He, S.** (2018). *Saccharospirillum mangrovi* sp. nov., a bacterium isolated from mangrove sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2813-2818.
- Zhang, X., Xu, Z., Ma, J., Zhou, D., & Xu, J.** (2021). Phylogenetic diversity, antimicrobial and antioxidant potential and identification of bioactive compounds from culturable endophytic fungi associated with mangrove *Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir. *Current Microbiology*, 78, 479-489.
- Zhang, C. J., Chen, Y. L., Sun, Y. H., Pan, J., Cai, M. W., & Li, M.** (2021). Diversity, metabolism and cultivation of archaea in mangrove ecosystems. *Marine Life Science & Technology*, 3, 252-262.
- Zhang, Y., Gui, H., Zhang, S., & Li, C.** (2022). Diversity and potential function of prokaryotic and eukaryotic communities from different mangrove sediments. *Sustainability*, 14(6), 3333.
- Zhang, Z. F., Liu, L. R., Pan, Y. P., Pan, J., & Li, M.** (2023). Long-read assembled metagenomic approaches improve our understanding on metabolic potentials of microbial community in mangrove sediments. *Microbiome*, 11(1), 188.
- Zhang, J. W., Wang, R., Liang, X., Han, P., Zheng, Y. L., Li, X. F., ... & Dong, H. P.** (2023). Novel gene clusters for natural product synthesis are abundant in the mangrove swamp microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(6), e00102-23.

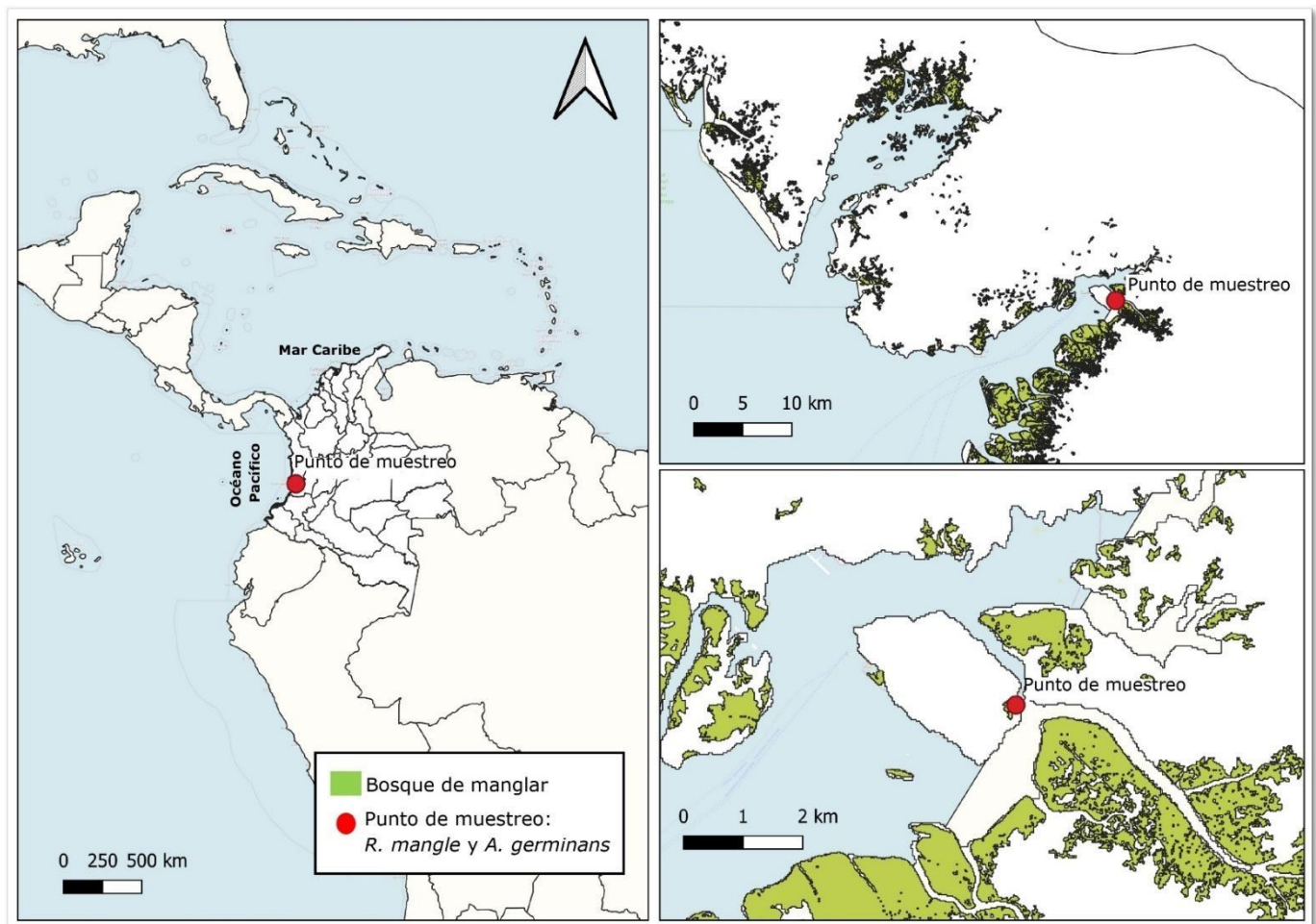
Zhang, Z. F., Pan, J., Pan, Y. P., & Li, M. (2021). Biogeography, assembly patterns, driving factors, and interactions of archaeal community in mangrove sediments. *mSystems*, 6(3), e010-1128.

Zhao, H., Yan, B., Mo, S., Nie, S., Li, Q., Ou, Q., ... & Jiang, C. (2019). Carbohydrate metabolism genes dominant in a subtropical marine mangrove ecosystem revealed by metagenomics analysis. *Journal of Microbiology*, 57, 575-586.

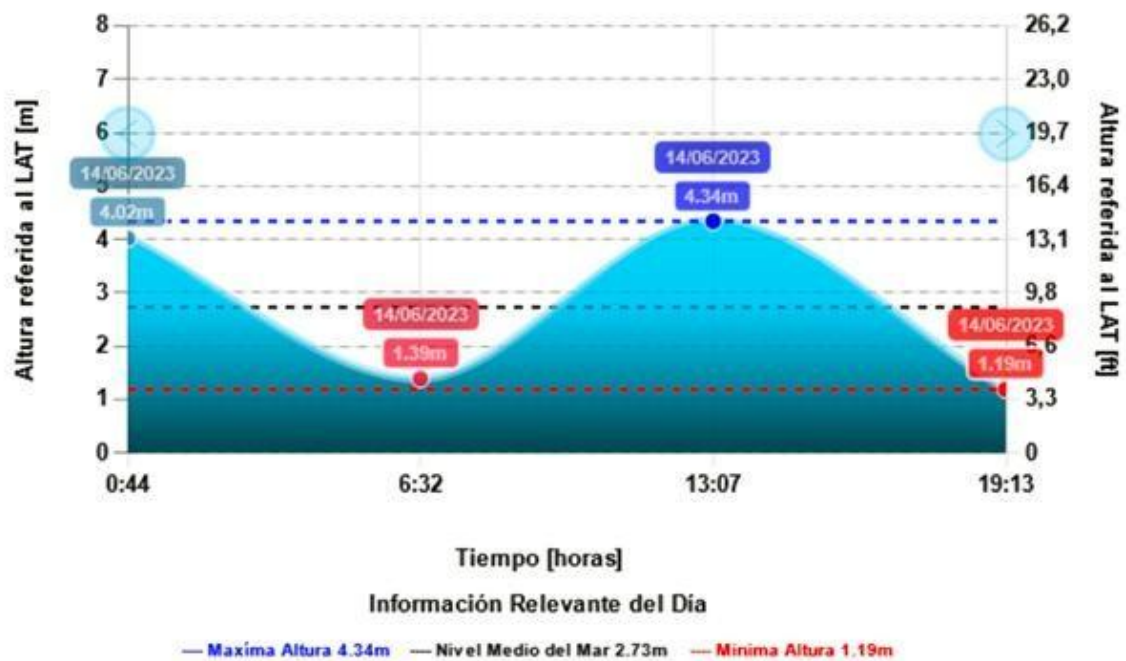
Zhou, Y., Liu, M., & Yang, J. (2022). Recovering metagenome-assembled genomes from shotgun metagenomic sequencing data: methods, applications, challenges, and opportunities. *Microbiological Research*, 260, 127023.

Zhu, Y., Li, R., Yan, S., Chen, X., Cen, S., & Xie, S. (2024). Habitat-and lifestyle-dependent structural and functional characteristics of viruses in mangrove wetlands of different functional zonings. *Environmental Research*, 252, 119070.

Anexos:



Anexo 1. Ubicación de la zona de muestreo. A). Bahía de Buenaventura en el Suroccidente colombiano. B) Desembocadura del río Dagua en el océano Pacífico. C) Zona de muestreo dentro del Bosque de manglar.



Anexo 2. Fluctuaciones en el nivel de la marea en la zona de muestreo el 14 de junio de 2023 según la Dimar (Dirección General Marítima Portuaria de Colombia).

Anexo 3. Parámetros meteorológicos registrados en la zona de muestreo el 14 de junio de 2023 según la Dimar (Dirección General Marítima Portuaria de Colombia).

Parámetro meteorológico	Resultado	Unidad
Temperatura	30.2	°C
Índice de calor	39	°C
Índice de frío	30	°C
Punto de rocío	26.3	°C
Búlbo humedo	27.3	°C
Humedad	78	%
Presión	14.65	PSI
Barómetro	13.24	PSI
Altura	-9.5	msnm

Anexo 4. Parámetros fisicoquímicos del suelo y del agua estuarina 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 ORP	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 Ω	41.4	mS/cm
Potasio intercambiable	642	mg/kg	Conductividad Ω	71.7	mS/cmA
Calcio intercambiable	792	mg/kg	Resistividad	0.8	Ω -cm
Magnesio intercambiable	994	mg/kg	Sólidos totales disueltos TDS	24.14	ppm
Sodio intercambiable	4480	mg/kg	Salinidad PSU	18.5	σ T
Fosforo	20.5	mg/kg	Turbidez	38.4	cm
Azufre	489	mg/kg	Temperatura	30.4	°C

Anexo 5. Flujo de trabajo empleado en el ensamblaje de los genomas de las plantas hospedadas (*R. mangle* y *A. germinans*) a partir de las librerías metagenómicas. En la sección 4.1 se detallan los pasos que se siguieron para obtener los genomas de las plantas hospedadas.

1. Toma de las muestras

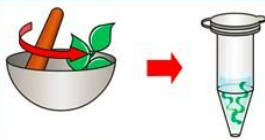


Tres muestras de tejido foliar y tres muestras de tejido radicular de *R. mangle*.



Tres muestras de tejido foliar y tres muestras de pneumatóforos de *A. germinans*.

2. Extracción de ADN



Se extrajo el ADN genómico total de cada muestra (ADN de la planta + ADN de los microorganismos endófitos)

3. Secuenciación Shotgun



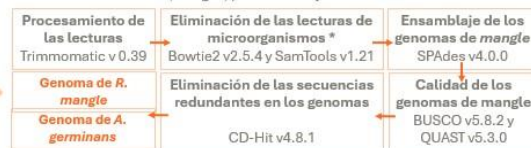
Librerías: TruSeq DNA nano kit[®],
Secuenciación: NovaSeq6000 (Illumina)
Lecturas: 150 pb

4. Análisis bioinformático de las secuencias



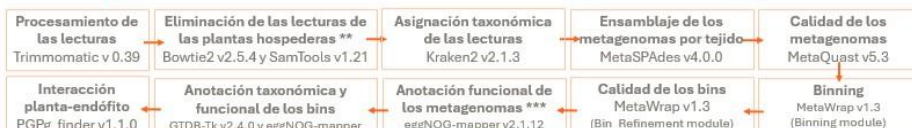
Lecturas crudas: ADN de la planta hospedera y de la comunidad de microorganismos endófitos.

* Las librerías se anotaron contra la base de datos Refseq de arqueas, bacterias, hongos, protozoarios y virus del NCBI.



4.1

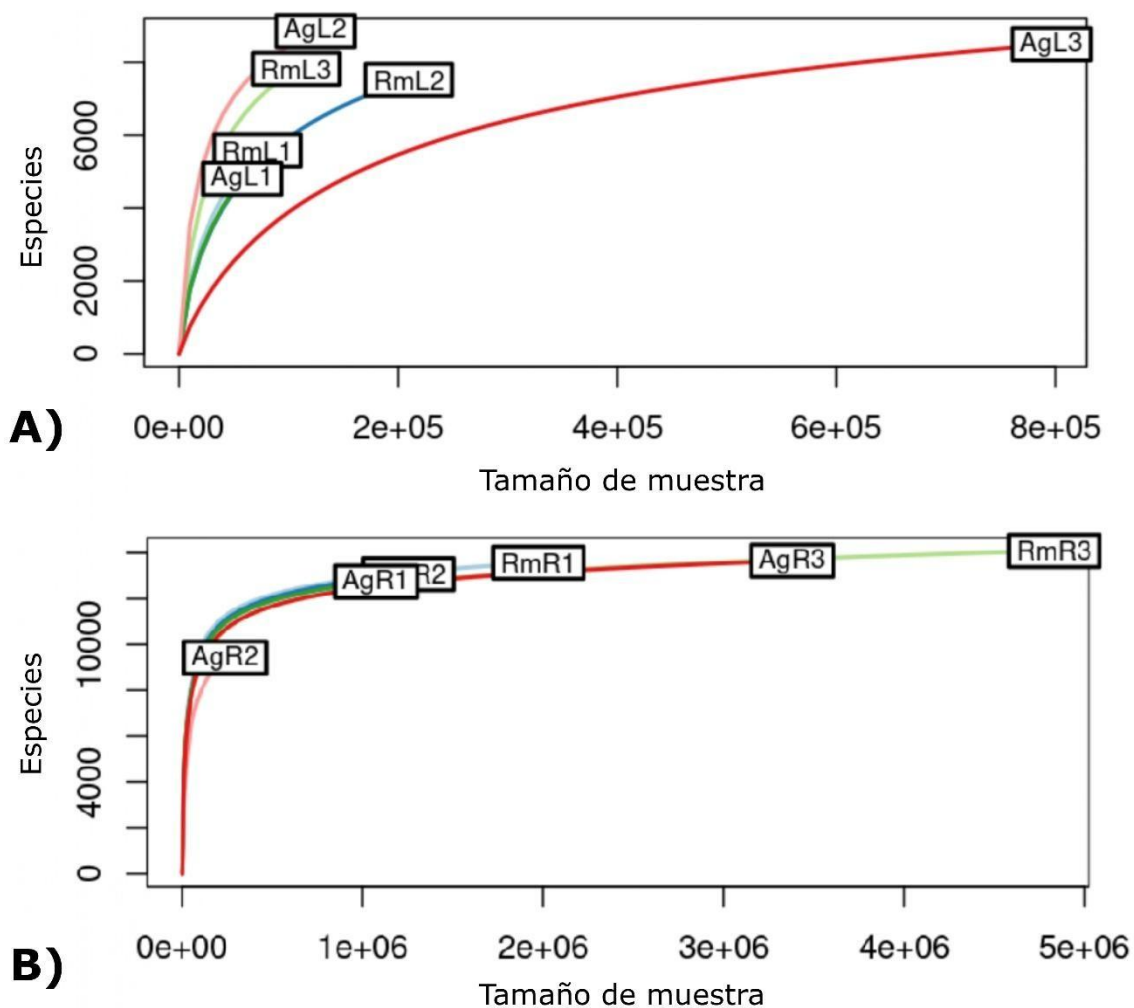
** Las librerías se anotaron contra los genomas de *R. mangle* y *A. germinans* obtenidos en la sección 4.1
*** Las secuencias codificantes se anotaron contra las bases de datos del KEGG y del COG



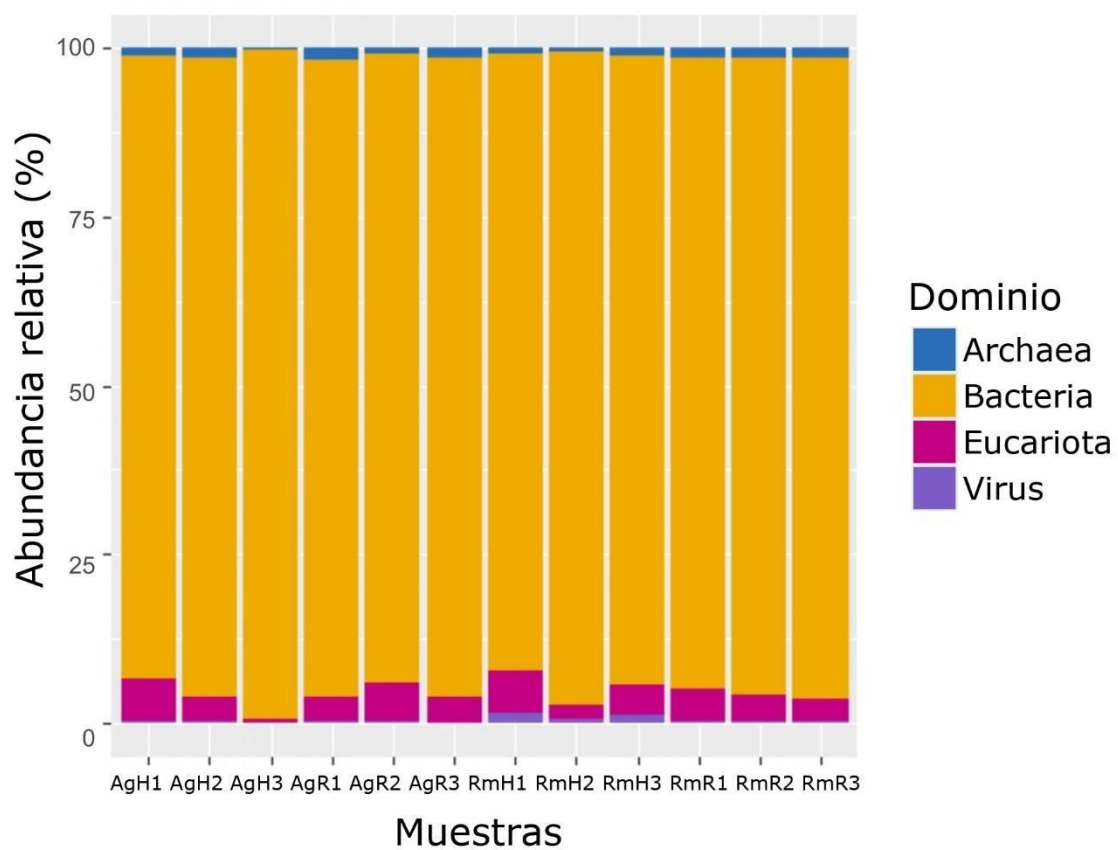
4.2

Anexo 6. Cantidad de lecturas antes y después del procesamiento para cada una de las librerías. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.

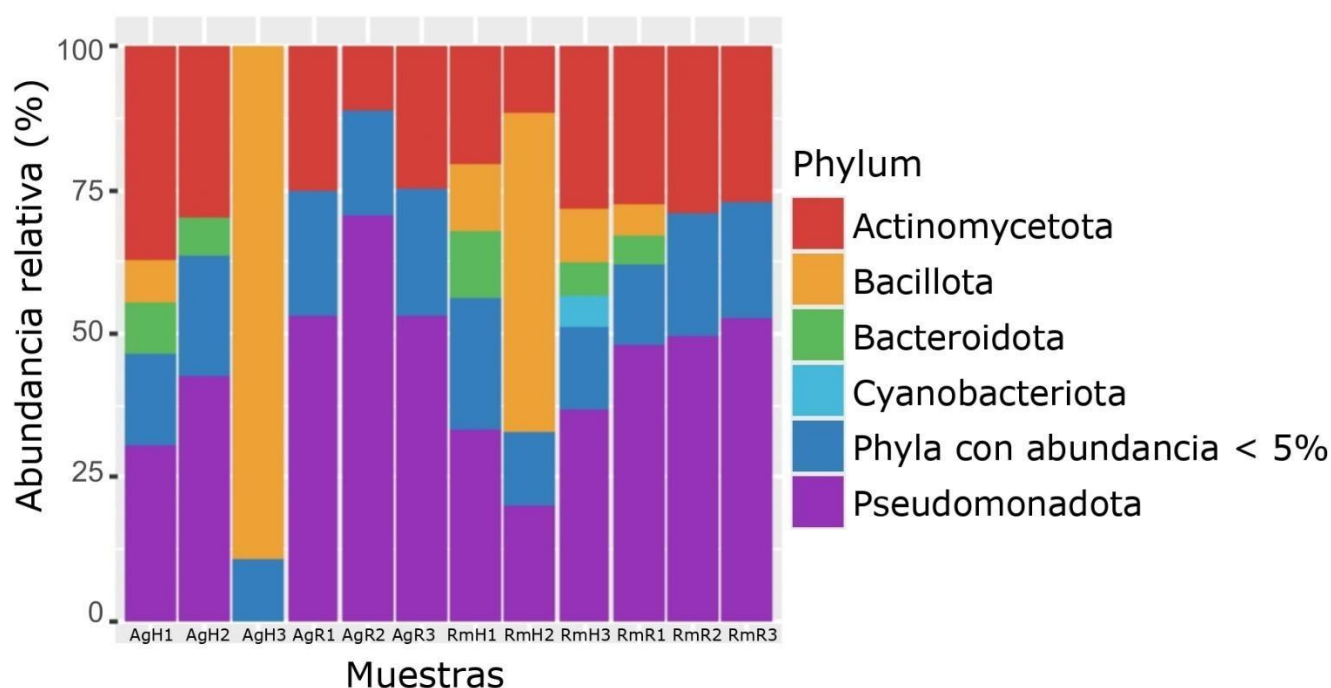
Muestra	Número de lecturas de ADN (M)	
	<i>Lecturas crudas</i>	<i>Lecturas procesadas</i>
RmH1	82663806	1013219
RmH2	81367835	1108079
RmH3	81050361	1358879
RmR1	83438373	18012580
RmR2	69261870	9386408
RmR3	83575760	23512378
AgH1	82292486	1069240
AgH2	83471539	1463923
AgH3	71314838	1786357
AgR1	75897095	7088200
AgR2	73542034	2006373
AgR3	81492412	16537973
Total	949368409	84343609



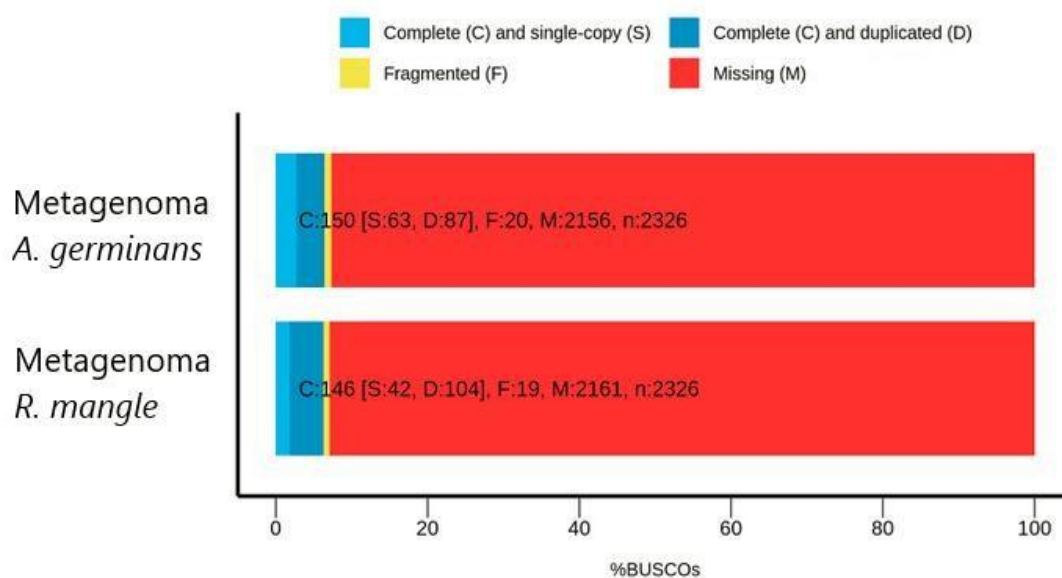
Anexo 7. Curvas de rarefacción para cada una de las réplicas. Cantidad de especies de endófitos en función del esfuerzo de muestreo (cantidad de secuencias). A) Tejido foliar. B) Tejido radicular. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; L, tejido foliar; R, tejido radicular.



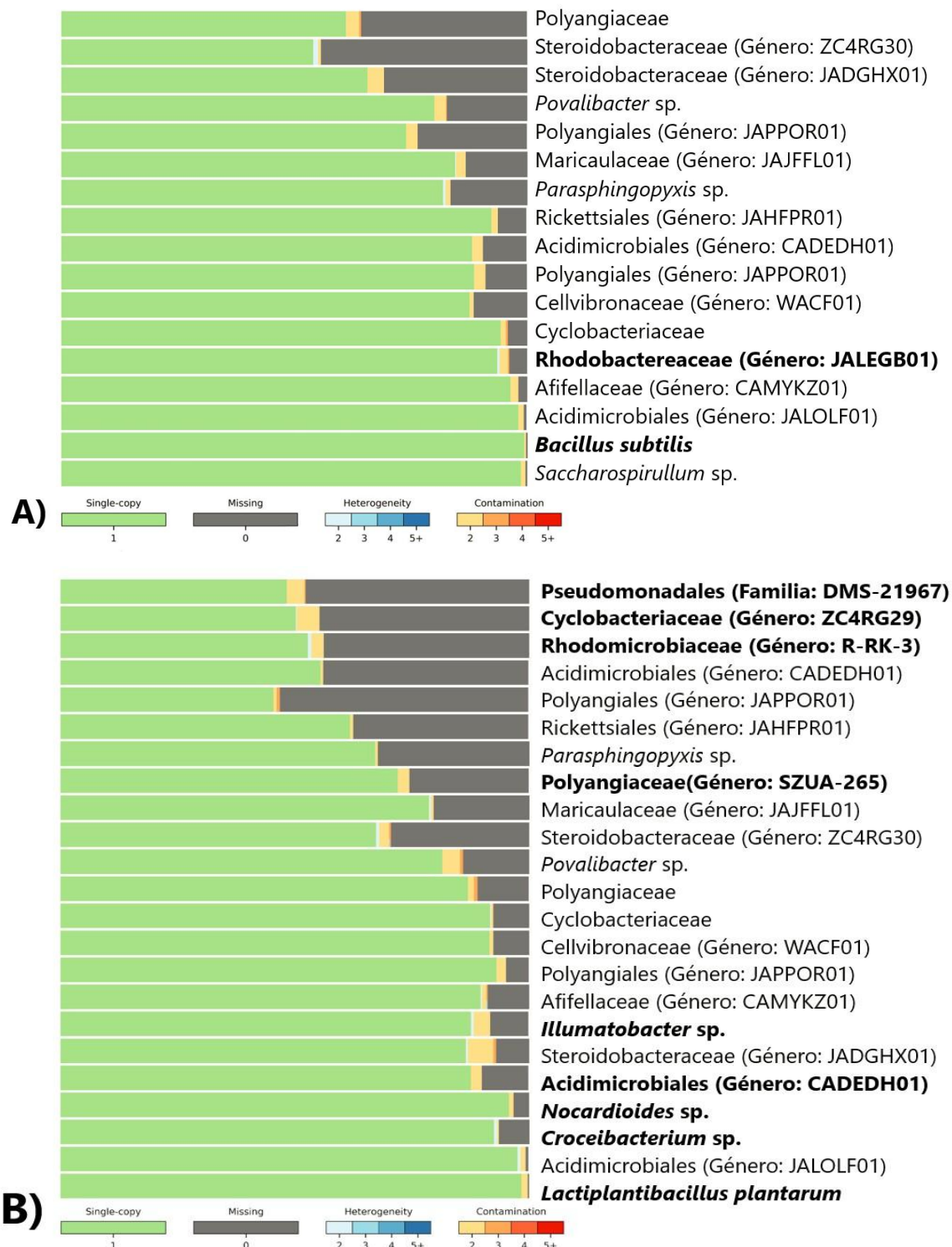
Anexo 8. Composición taxonómica de la microbiota endófitas de *R. mangle* y *A. germinans* a nivel de dominio. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.



Anexo 9. Phyla más abundantes que conforman la microbiota endófitra de *R. mangle* y *A. germinans*. Los nombres de las muestras indican la siguiente información: Rm, *R. mangle*; Ag, *A. germinans*; H, tejido foliar; R, tejido radicular.



Anexo 10. Evaluación comparativa de ortólogos universales de copia única (BUSCO) para los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*. En rojo se encuentra la cantidad de ortólogos de eudicotiledóneas que no se encontraron dentro de cada metagenoma.



Anexo 11. Parámetros de calidad de los 26 genomas microbianos obtenidos a partir de los metagenomas de *R. mangle* y *A. germinans*. La proporción verde/gris de las barras representa el nivel de completación con base en los SCG, el segmento amarillo representa el nivel de contaminación y la parte azul de las barras representa la heterogeneidad de cepas.

Anexo 12. Las filogenias completas de los MAG se encuentran disponibles en el siguiente enlace:

https://drive.google.com/drive/folders/1gGRNCVLFr4TYBfFKCctk8QD0jPtCSLq?usp=drive_link Árboles

filogenéticos basados en ANI, que muestran la relación de los MAG (resaltados en rojo) con otras especies reportadas dentro de sus respectivos grupos.