

ANÁLISIS DE PATRONES GENÉTICOS COMUNES RELACIONADOS CON LA COLONIZACIÓN DE DIVERSAS BACTERIAS ENDÓFITAS AISLADAS DE *Rhizophora* sp. Y *Avicennia* sp.

Nombres y apellidos

Natalia Sofía Castañeda Herrera
202122236115

Laura Vanessa Prada Narváez
201912212291

Jersy Johanna Sandoval Guerra
202012220097

Trabajo de Investigación del Programa de Microbiología

Tutor(es):
Zamira Elena Soto Varela

RESUMEN

Los manglares, ubicados en zonas tropicales y subtropicales, son ecosistemas clave que brindan importantes servicios ecosistémicos, como la conservación de la biodiversidad y la captura de CO₂. En estos entornos, las bacterias endófitas desempeñan un rol esencial al mejorar la tolerancia al estrés de las plantas y aportar nutrientes, favoreciendo así la estabilidad del ecosistema. A pesar de la importancia de este ecosistema y el potencial significativo de las bacterias endófitas en varias aplicaciones, hay pocos estudios centrados en estas interacciones, y la falta de conocimiento genético limita la capacidad para comprender plenamente su función y potencial en estos ecosistemas vitales. Hasta la fecha, la información genética sobre estas bacterias es escasa, desconociéndose las características comunes que les permiten establecer asociaciones simbióticas como especies endófitas del manglar. Este estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar los patrones genéticos relacionados con la colonización de bacterias endófitas en *Rhizophora* sp. y *Avicennia* sp.

Inicialmente, se seleccionaron especies bacterianas más predominantes aisladas de las especies *Rhizophora* sp y *Avicennia* sp mediante una revisión bibliográfica

en las bases de datos Google Scholar, PubMed y ScienceDirect, siguiendo el criterio de búsqueda Endophytes "bacteria" species "isolated" y (mangrove *Rhizophora* sp. and/or *Avicennia* sp.). La selección de las especies se realizó considerando su repetibilidad en los estudios analizados. Las relaciones evolutivas entre las bacterias seleccionadas se estudiaron a través de la comparación de genes 16S en MEGA. Adicionalmente, se realizó la búsqueda y descargue de sus genomas en el NCBI, a los cuales se les analizó su calidad utilizando la herramienta QUASt. Para caracterizar los patrones genéticos asociados a los mecanismos de colonización de plantas, se llevaron a cabo pBLAST de secuencias de proteínas relacionadas con mecanismos de colonización. Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron las proteínas más frecuentes y se realizaron alineamientos en el software MEGA. A partir de estos alineamientos, se generaron árboles filogenéticos que representan las relaciones evolutivas entre las especies analizadas.

Se identificaron 28 especies bacterianas aisladas de *Rhizophora* sp. (10) y *Avicennia* sp. (18), principalmente de las especies de mangle *Rhizophora apiculata* y *Avicennia marina*. Los géneros más comunes entre los aislados fueron *Bacillus* y *Staphylococcus*, con *Bacillus cereus* como la especie predominante. El análisis filogenético del ARN 16s mostró que la mayoría de las bacterias se agrupan según el árbol de manglar del que fueron aisladas. Sin embargo, algunas especies provenientes de diferentes manglares forman clados similares, lo que podría indicar adaptaciones evolutivas compartidas en respuesta a las condiciones de manglar. La evaluación de la calidad del genoma reveló una marcada variabilidad en la calidad y características de los ensamblados, evidenciada en la fragmentación, tamaño y contenido de GC. Aunque el ensamblado logra capturar la mayor parte del genoma, algunas muestras presentan menor cobertura. El amplio rango de contenido de GC entre las muestras indica una diversidad genómica significativa y posibles adaptaciones específicas a distintos ambientes. En el análisis BLAST, de las 36 secuencias de proteínas de referencia, 34 se encontraron en bacterias endófitas, principalmente glutathione disulfide-reductase (25), superoxide dismutase (23), peroxidasa (21) y lipasa (13) relacionadas con la regulación de genes para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de enzimas líticas. Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias de proteínas más frecuentes confirma que el género de manglar afecta la composición microbiana, mostrando que las bacterias aisladas de diferentes especies de manglares tienden a agruparse según el tipo de manglar.

Los patrones genéticos identificados resaltan la importancia de las bacterias endófitas en los procesos de conservación y restauración de manglares, además de sugerir aplicaciones potenciales en biotecnología agrícola y costera. Sin embargo, los hallazgos también evidencian que, pese a la amplia diversidad de bacterias endófitas observadas, el conocimiento sobre los patrones genéticos que facilitan la simbiosis con los manglares sigue siendo limitado. Se recomienda promover investigaciones adicionales que profundicen en la diversidad, funcionalidad e

interacciones de las bacterias endófitas en los manglares. Estos estudios permitirán una mejor comprensión de los mecanismos de adaptación al estrés ambiental y ampliarán el conocimiento sobre su potencial biotecnológico.

Palabras clave: Manglares, bacterias, endófitos, *Rhizophora*, *Avicennia*.

ABSTRACT

Mangroves, located in tropical and subtropical regions, are key ecosystems that provide important ecosystem services such as biodiversity conservation and CO₂ sequestration. In these environments, endophytic bacteria play an essential role by improving plant stress tolerance and supplying nutrients, thereby promoting ecosystem stability. Despite the importance of this ecosystem and the significant potential of endophytic bacteria in various applications, few studies have focused on these interactions, and the lack of genetic knowledge limits the ability to fully understand their function and potential in these vital ecosystems. To date, genetic information on these bacteria is scarce, and the common characteristics that allow them to establish symbiotic associations as mangrove endophytes are unknown. This study aimed to identify and characterize the genetic patterns related to the colonization of endophytic bacteria in *Rhizophora* sp. and *Avicennia* sp.

Bacterial species were selected through a bibliographic review in Google Scholar, PubMed, and ScienceDirect databases, using the search criteria "Endophytes" "bacteria" species "isolated" and (mangrove *Rhizophora* sp. and/or *Avicennia* sp.). The species selection was based on their recurrence in the analyzed studies. Evolutionary relationships among the selected bacteria were studied by comparing 16S genes in MEGA. Genomes were searched and downloaded from NCBI, and its quality was assessed using the QUASt tool. To characterize genetic patterns associated with plant colonization mechanisms, pBLAST searches of protein sequences related to colonization were conducted. Based on the results, the most frequent proteins were selected and aligned in MEGA software. Phylogenetic trees representing evolutionary relationships among the analyzed species were generated from these alignments.

A total of 28 bacterial species were identified, isolated from *Rhizophora* sp. (10) and *Avicennia* sp. (18), primarily from *Rhizophora apiculata* and *Avicennia marina* mangrove species. The most common genera among the isolates were *Bacillus* and *Staphylococcus*, with *Bacillus cereus* being the predominant species. The 16S rRNA phylogenetic analysis showed that most bacteria clustered according to the mangrove tree from which they were isolated. However, some species from different mangroves formed similar clades, suggesting shared evolutionary adaptations to mangrove conditions. Genome quality assessment revealed marked variability in the quality and characteristics of assemblies, evidenced by fragmentation, size, and GC content. Although the assembly captured most of the genome, some samples

showed lower coverage. The wide GC content range among the samples indicates significant genomic diversity and potential adaptations to different environments. In the BLAST analysis, of the 36 reference protein sequences, 34 were found in endophytic bacteria, mainly glutathione disulfide reductase (25), superoxide dismutase (23), peroxidase (21), and lipase (13), associated with gene regulation for detoxification of reactive oxygen species (ROS) and the production of lytic enzymes. Finally, the phylogenetic analysis of these most frequent protein sequences supports the idea that the mangrove genus influences microbial composition.

The identified genetic patterns highlight their importance in mangrove conservation and restoration processes and suggest potential applications in agricultural and coastal biotechnology. However, the findings also reveal that, despite the broad diversity of endophytic bacteria observed, knowledge of the genetic patterns that facilitate symbiosis with mangroves remains limited. Further research is recommended to deepen our understanding of the diversity, functionality, and interactions of endophytic bacteria in mangroves. These studies will lead to a better understanding of environmental stress adaptation mechanisms and expand knowledge of their biotechnological potential.

KeyWords: Mangroves, bacteria, endophytes, *Rhizophora*, *Avicennia*.

REFERENCIAS

1. Adeleke, B. S., Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Genomic analysis of endophytic bacillus cereus t4s and its plant growth-promoting traits. *Plants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/plants10091776>
2. Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. In *Microbiological Research* 221, 36–49. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
3. Álvarez-León, R. (2003). Los manglares de Colombia y la recuperación de sus áreas degradadas: revisión bibliográfica y nuevas experiencias. In *Madera y Bosques* (Vol. 9, Issue 1). <https://www.redalyc.org/pdf/617/61790101.pdf>
4. Aragón, S., & Beltrán-Acosta, C. (2019). Aplicaciones y perspectivas Endophytic fungi in biological control of phytopathogens and insect pests. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 2. https://www.researchgate.net/publication/335635615_Endophytic_fungi_in_biological_control_of_phytopathogens_and_insect_pests

5. Bai, X., Zhang, M., & Liu, Y. (2023). Microbial diversity in mangrove ecosystems: Insights from 16S rRNA gene analysis. *Environmental Microbiome*, 15(2), 130-145. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00499-5>
6. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
7. Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K., y Azhar, E. I. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 16(2), 1-12. <https://doi.org/10.4238/gmr16029657>
8. Castro, R. A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Batista, B. D., Luvizotto, D. M., Marcon, J., Ferreira, A., Melo, I. S., & Azevedo, J. L. (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-382>
9. Chen, Q., Zhao, Q., Li, J., Jian, S., & Ren, H. (2016). Mangrove succession enriches the sediment microbial community in South China. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep27468>
10. Chen, Y., Zhao, Y., & Huang, J. (2022). Interactions of microbial communities in mangrove ecosystems: Implications for bioremediation. *Annals of Microbiology*, 72(5), 25-36. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0442-7>
11. Dechavez, R., Calub, M. L., Genobata, D. R., Balacuit, R., Jose, R., & Tabugo, S. R. (2022). Identification of culture-dependent microbes from mangroves reveals dominance of *Bacillus* including medically important species based on DNA signature. *Biodiversitas*, 23(10), 5342–5350. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d231044>
12. Deivanai, S., Bindusara, A. S., Prabhakaran, G., & Bhore, S. J. (2014). Culturable bacterial endophytes isolated from Mangrove tree (*Rhizophora apiculata* Blume) enhance seedling growth in Rice. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 5(2), 437–444. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136233>
13. Figueroa-Galvis, I. (2017). Caracterización de la diversidad y predicción del potencial genético funcional de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera del mangle negro (*Avicennia germinans*) en un gradiente de salinidad de La Guajira. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59560>
14. Gómez-Renaud, V., Romero R, B. A., Landaverde, C., Luna, O., Martínez, Q., Cueto, R., & de Química, F. (2009). Efecto de la aplicación de peróxido de hidrogeno para la inducción de resistencia en chile jalapeño (*Capsicum annum* L.) contra la enfermedad de marchitez del chile ocasionada por *Phytophthora capsici*. https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/OctavoVerano_38/12_Gomez_Renaud2.pdf

15. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>
16. Hernández, M & Villalba, J. (2024). *Avicennia germinans*. <https://colombia.inaturalist.org/taxa/62853-Avicennia-germinans>
17. Hong CE, Kim JU, Lee JW, Bang KH, Jol-H. (2018). Complete genome sequence of the endophytic bacterium *Bacillus cereus* PgBE311, isolated from *Panax ginseng*. *Microbiol ResourAnnounc* 7:e01382-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01382-18>.
18. Hu, H. J., Chen, Y. L., Wang, Y. F., Tang, Y. Y., Chen, S. L., & Yan, S. Z. (2017). Endophytic *Bacillus cereus* effectively controls *Meloidogyne incognita* on tomato plants through rapid rhizosphere occupation and repellent action. *Plant Disease*, 101(3), 448–455. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0871-RE>
19. Janarthine, S. R. S., & Eganathan, P. (2012). Plant growth promoting of endophytic *Sporosarcina aquimarina* SjAM16103 isolated from the pneumatophores of *Avicennia marina* L. *International Journal of Microbiology*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/532060>
20. Jiménez, J.A. y R. Soto. 1985. Patrones regionales en la estructura y composición florística de los manglares de la costa Pacífica de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical. Biología Tropical* 33(1): 25-37. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9588789>
21. Jumrah, E., & Salnus, S. (2024). (Review Article) Identification of Endophytic Bacteria by 16S rRNA Analysis (Artikel Rev.) Identifikasi Bakteri Endofit dengan Analisis 16S rRNA. *Jurnal Sains Dan Teknik Terapan*, 2024(2), 70–77. <https://journal.akom-bantaeng.ac.id/index.php/jstt>
22. Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. In *Microorganisms*, 5(4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
23. Linnaei, C. (1764). *Species Plantarum* (3rd ed., Vol. 2). <https://www.biodiversitylibrary.org/item/13830>
24. Londoño, D., & Quintero, L. (2015). endofíticos presentes en la especie *Witheringia coccoloboides* (solanaceae) del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira. <https://repositorio.utp.edu.co/entities/publication/fa0886f9-da05-460c-88f9-b98086d28f97>
25. Mendarte-Alquisira, C., Gutiérrez-Rojasy, M., & Volke-Sepúlveda, T. (2020). The fungus *lewia* sp. Alleviates the oxidative stress in f. *arundinacea* during the endophyte-assisted phyto remediation of hydrocarbons. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 19, 69–80. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1547>

26. Miranda, L. (2023). Caracterización de bacterias endófitas cultivables aisladas de *Rhizophora mangle* y su potencial como promotores del crecimiento en *Oryza sativa*. <https://repositorio.una.ac.cr/items/5570a36d-fc18-4df0-9b28-e190b0c4dc96>
27. Nagarajan, N., & Pop, M. (2013). Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 157-167. <https://doi.org/10.1038/nrg3367>
28. Pellinen, R. I., Korhonen, M. S., Tauriainen, A. A., Tapio Palva, E., & Kangasjärvi, J. (2002). Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology*, 130(2), 549–560. <https://doi.org/10.1104/pp.003954>
29. Pérez, E. R. H. M. D. la N. B. (2004). Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción hma-tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) Var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. *Cultivos Tropicales*, 25(2), 45–52. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217832007>
30. Petrini, O., & Fisher, P. J. (1986). Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. *Transactions - British Mycological Society*, 87(4), 647–651. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80109-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80109-7)
31. Sabry Sultan, M., Elsayed, A., & Ahmed El-Amier, Y. (2023). FIRST REPORT OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM *Senecio glaucus* L., EGYPT. *Granja*, 38(2), 80–93. <https://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.06>
32. Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Yunueth, K., Sandoval-Espinosa, M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. D.R. © TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas, 132(2), 132–146. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006
33. Santamaría-Hernando, S., de Bruyne, L., Höfte, M., & Ramos-González, M. I. (2022). Improvement of fitness and biocontrol properties of *Pseudomonas putida* via an extracellular heme peroxidase. *Microbial Biotechnology*, 15(10), 2652–2666. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14123>
34. Serrato, S. (2019). Aislamiento y caracterización de hongos endofíticos provenientes de pasto para uso agrícola. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/43166>
35. Shah, A., Hassan, Q. P., Mushtaq, S., Shah, A. M., & Hussain, A. (2017). Chemoprofile and functional diversity of fungal and bacterial endophytes and role of ecofactors – A review. *Journal of Basic Microbiology*, 57(10), 814–826. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700275>
36. Silva, C. D., Ferreira, J. L., & Pinto, J. M. (2023). The role of environmental factors in shaping bacterial communities in mangrove habitats. *PLOS ONE*, 18(4), e0258335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258335>
37. Soldan, R., Mapelli, F., Crotti, E., Schnell, S., Daffonchio, D., Marasco, R., y 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.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.008>
38. Soto, R., & Corrales, L. (1987). Variación de algunas características foliares de *Avicennia germinans* (L.) L. (*Avicenniaceae*) en un gradiente climático y de salinidad. *Revista de Biología*, 2, 245–256.
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/24002>
39. Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), e1005595.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
40. Wu P, Xiong X, Xu Z, Lu C, Cheng H, Lyu X, et al. (2016) Bacterial Communities in the Rhizospheres of Three Mangrove Tree Species from Beilun Estuary, China. *PLoS ONE* 11(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164082>
41. Zamora-Trejos, P., & Cortés, J. (2009). Los manglares de Costa Rica: el Pacífico norte. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN, 57(3), 473–488.*
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44911876003>