Polimorfismos en la MxB de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

y susceptibilidad a VNNV

P. Novel1, J. Fernández2, J. Porta3, M. C. Alvarez1 y J. Béjar1

1 Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, bejar@uma.es

2 Departamento de Mejora Genética Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, 28040 Madrid, Spain

3 Aquasolutions Biotech, Arces 37, 29018 Málaga, Spain

**Summary**

Resistance to diseases is gaining interest in aquaculture breeding programs. Vertebrate Mx proteins are key components of the antiviral state triggered by type I interferon in response to viral infections. Allelic variability in Mx genes has been related with resistance to viral infections in different species, thus being potential markers for selective breeding of virus-resistant fish.European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, is one of the cultured species more sensitive to encephalopathy and retinopathy (VER), caused by the nervous necrosis virus (VNNV).In one of the two Mx genes identified in this species (MxB), two microsatellites were found in introns 1 and 4 respectively. In this study, a possible association between the variability of these two microsatellites and the resistance/susceptibility of the European sea bass to VNNV infection has been assessed by challenging juvenile fish and recording dead and survivors of the infection.Results suggest that this character has a genetic component linked to the intron 1 locus, which encourages us to continue this line of investigation. The confirmation of this hypothesis will come from *in vitro* assays demonstrating functional differences of the alleles of this locus, and from *in vivo* challenge experiments reinforcing the association between allelic variability and a different response of individuals to VNNV infection.

**Resumen**

La resistencia a las enfermedades es uno de los caracteres más interesantes en los programas de mejora genética en acuicultura. Las proteínas Mx son elementos clave en el estado antiviral desencadenado por el interferón tipo I en respuesta a las infecciones virales. La variabilidad alélica de los genes Mx se ha relacionado con la resistencia a infecciones virales en diferentes especies, por lo que se consideran marcadores potenciales para los programas de selección de individuos resistentes. La lubina (*Dicentrarchus labrax*), es una de las especies cultivadas más susceptible a la encefalopatía y retinopatía causada por el virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV). En uno de los dos genes Mx identificados en esta especie, la MxB, se han encontrado dos microsatélites en los intrones 1 y 4, respectivamente. En este trabajo, se ha estudiado la relación entre la variabilidad de estas dos regiones microsatélites y la resistencia o susceptibilidad a VNNV de la lubina. Para ello se realizó una infección experimental con VNNV y se muestrearon los individuos que murieron y los supervivientes. Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a VNNV tiene un componente genético ligado al locus del intrón 1, lo cual sostiene la continuación de esta línea de investigación, ya que la confirmación de esta hipótesis de trabajo debe venir de ensayos que demuestren diferencias funcionales entre los alelos de este locus y de infecciones experimentales que claramente asocien la variabilidad alélica con la respuesta a la infección con VNNV.

**Justificación**

La existencia de variabilidad alélica asociada a la susceptibilidad a distintas enfermedades se conoce bien. De hecho se han identificado varios QTLs que hacen de la resistencia a las enfermedades uno de los caracteres más interesantes en programas de mejora en acuicultura. Las proteínas Mx son elementos clave en el estado antiviral desencadenado por el interferón tipo I en respuesta a las infecciones virales. La variabilidad alélica de los genes Mx se ha relacionado con la resistencia a infecciones virales en diferentes especies, incluyendo los peces, por lo que se consideran marcadores potenciales para los programas de mejora en acuicultura. La lubina (*Dicentrarchus labrax*), es una de las especies cultivadas más susceptible a la encefalopatía y retinopatía causada por el virus de la necrosis nerviosa viral (VNNV), pero se han detectado poblaciones de lubina con diferente susceptibilidad a VNNV. En uno de los dos genes Mx identificados en esta especie, la MxB, se han encontrado dos microsatélites en los intrones 1 y 4, respectivamente. Además, junto al microstélite del intrón 1 hay una secuencia ISRE, (IFN stimulated element), los motivos responsables de la respuesta de las Mx al IFN. En este trabajo, se ha estudiado la relación entre la variabilidad de las dos regiones microsatélites de la MxB y la resistencia o susceptibilidad a VNNV de la lubina.

# Material y Métodos

Un total de 235 lubinas de aproximadamente 30 g participaron en la infección experimental: a 150 se les inyectó VNNV (105 TCID50 mL−1) y a 85 PBS. Se tomaron muestras de aleta caudal de los supervivientes, muertos y controles y se genotiparon usando una herramienta de 9 microsatélites, la *Dlplex10*, así como para los dos loci de la MxB. Los datos obtenidos se utilizaron para analizar la estructura genética de los tres grupos y su diversidad alélica.

**Resultados y Discusión**

La primera tarea de este objetivo consistió en diseñar una multiplex que amplificara los dos *loci* microsatélites presentes en la MxB: la *MxBplex*, la cual ha demostrado ser útil para el análisis genético de estos dos *loci*. Los resultados obtenidos tras el análisis con marcadores moleculares no han permitido establecer una asociación clara entre la variabilidad de la MxB y la susceptibilidad de las lubinas a la infección por VNNV (las diferencias no fueron estadísticamente significativas). Sin embargo, sí hemos observado algunos indicios de asociación entre el gen de la MxB, en concreto del *locus* Int1, y la susceptibilidad a VNNV que animan a la continuidad de esta línea de investigación. Estos indicios se basan en las siguientes observaciones:

1.- Al analizar el conjunto de muestras con la *MxBplex*, los valores de An indican que el grupo de muertos presenta menor variabilidad, siendo la diferencia más acusada para el locus Int1 que para el Int4. En cambio, este mismo grupo presenta un valor de An mayor para los loci de la *Dlplex10*. Estos resultados sugieren que los *loci* analizados con la *MxBplex* han respondido al desafío de la infección de forma diferente a los *loci* analizados con la *Dlplex10.*

2.- Los valores de Fst indican que existen diferencias significativas entre los grupos de supervivientes y de muertos, tanto utilizando la *Dlplex10* como el *locus* Int1 de la MxB. Esto indica que la separación entre supervivientes y muertos no ha ocurrido de forma aleatoria, sino que existe un componente genético en la susceptibilidad a VNNV asociado al *locus* Int1.

3.- El valor de diferenciación alélica (AST) entre los tres grupos es máximo para el *locus* Int1 y mínima para el *locus* Int4. Al ser dos *loci* ligados, de hecho, están separados 2 kb aproximadamente, esta observación sugiere de nuevo que existen diferencias entre los tres grupos (supervivientes, muertos y controles) relacionadas específicamente con el *locus* Int1.

En definitiva, hemos realizado una primera aproximación a este posible marcador de resistencia a VNNV localizado en un intrón del gen MxB. Los ensayos a realizar para confirmar esta asociación, son por un lado un análisis funcional de los distintos alelos del *locus* Int1, y por otro, un ensayo de infección experimental en la que individuos con distintos genotipos muestren un comportamiento diferente frente a la infección.

**Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto europeo IMAQUANIM (contrato no. 007103) y por el proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P09-TEP- 5380.