

# Primeros análisis genómicos de *Marteilia* sp. infectando *Mytilus galloprovincialis* del río Piedras (Huelva, España)

José Ignacio Navas Triano, Pablo García Sánchez, IFAPA *Agua del Pino*, Cartaya, Huelva (España)  
Claudio Jiménez Ruiz, Roberto de la Herrán Moreno, Dpto. Genética, Fac. de Ciencias, Universidad de Granada (España)



## Resumen

Los primeros estudios de secuenciación masiva y de análisis de secuencias repetidas de *Marteilia* sp. aislada de mejillones del litoral atlántico andaluz han permitido obtener, por primera vez, el locus completo del ADN ribosómico del parásito. El análisis del solapamiento de secuencias también ha revelado una región hipervariable en la zona 5' del espaciador IGS que podría ser utilizada como diana para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas más específicas que aquellas basadas en el ITS1.

## Introducción

La marteilosis es una de las principales enfermedades parasitarias de moluscos bivalvos. Causada por parásitos protista del género *Marteilia* (Cercozoa, Paramyxida), afecta principalmente al sistema digestivo causando lesiones que pueden provocar la muerte del molusco. En la actualidad se conocen al menos 10 especies de *Marteilia* distribuidas por todo el mundo y afectando a ostras, mejillones, almejas, berberechos, vieiras y navajas. A pesar de su importancia, es escaso el conocimiento genético de este género y de los paramixidios en general. Esto conlleva una discutida taxonomía y una gran dificultad para diseñar test de diagnóstico específicos. El proyecto DIAMARTAND persigue la caracterización genómica de la marteilosis en el litoral andaluz mediante secuenciaciones de nueva generación (NGS) del ADN genómico de parásitos purificados con el fin de realizar estudios filogenéticos y encontrar nuevas dianas diagnósticas.

## Material y Métodos

Ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* del río Piedras (Huelva) fueron muestreados y sometidos a depuración durante 24 h. Tras su disección se les extrajo la glándula digestiva, realizando improntas de cada una y conservándolas hasta su análisis en agua de mar filtrada 0,22µm con 1% Tween-80 sobre hielo. El examen microscópico de las improntas teñidas con Hemacolor® permitió diagnosticar la presencia de esporangios de *Marteilia* (Fig. 1).

Sólo las glándulas digestivas de los individuos muy infectados fueron utilizadas para la purificación del parásito utilizando un procedimiento similar al descrito por Robledo, Mialhe y Figueras (1995) (Fig. 2). Tras la purificación, los esporangios fueron conservados el líquido de Seutin (Seutin, White y Boag, 1991) hasta la extracción de su ADN utilizando el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus (Zymo Research). Evaluada la calidad del ADN, éste se utilizó para la construcción de librerías y posterior secuenciación *Illumina* (Macrogen, Korea). Para la detección de las secuencias repetidas dispersas y los clústeres de secuencias en tándem se utilizó el software RepeatExplorer2 (Novák, Neumann y Macas, 2020).

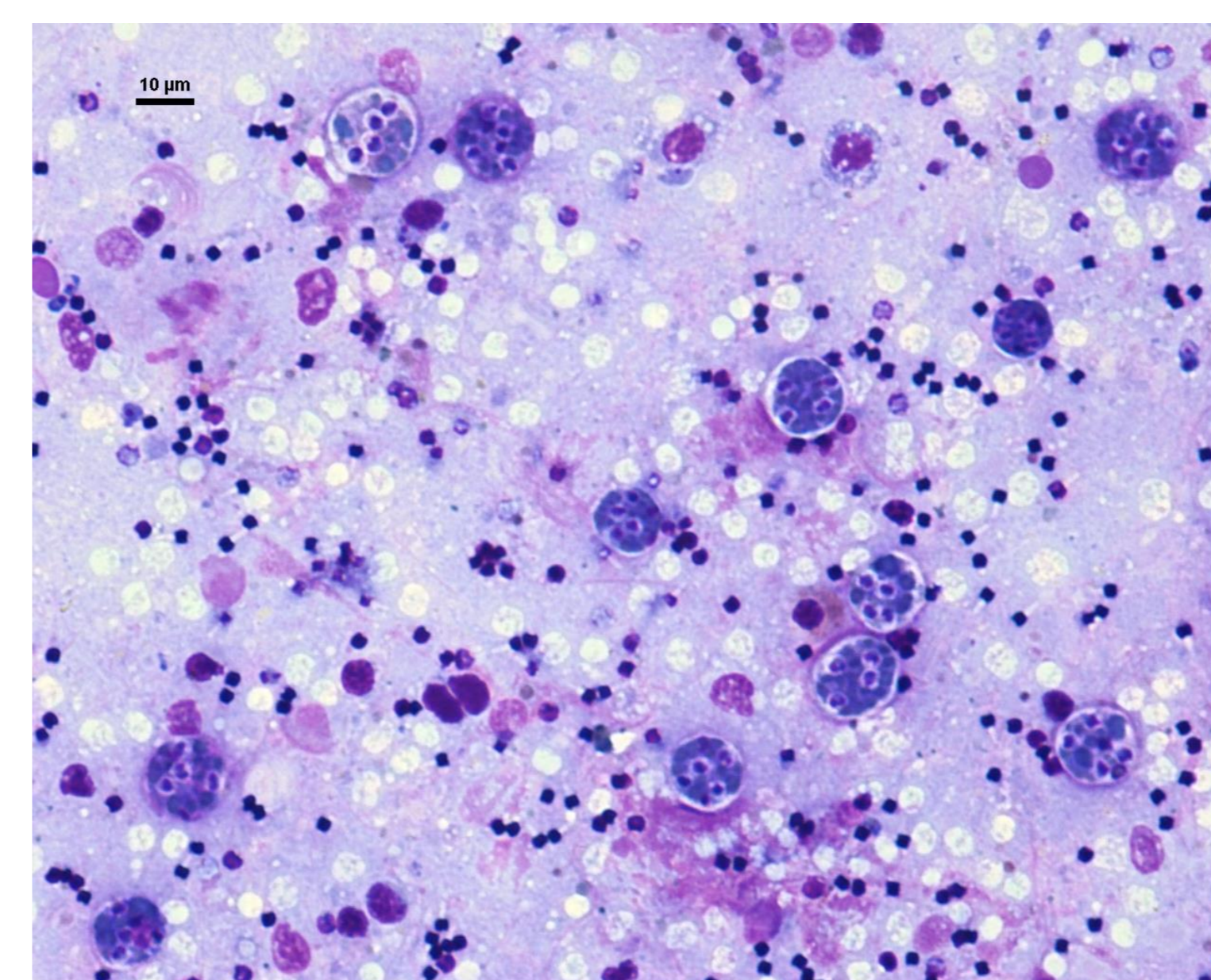


Fig.1 *Marteilia* en impronta de glándula digestiva de *M. galloprovincialis*

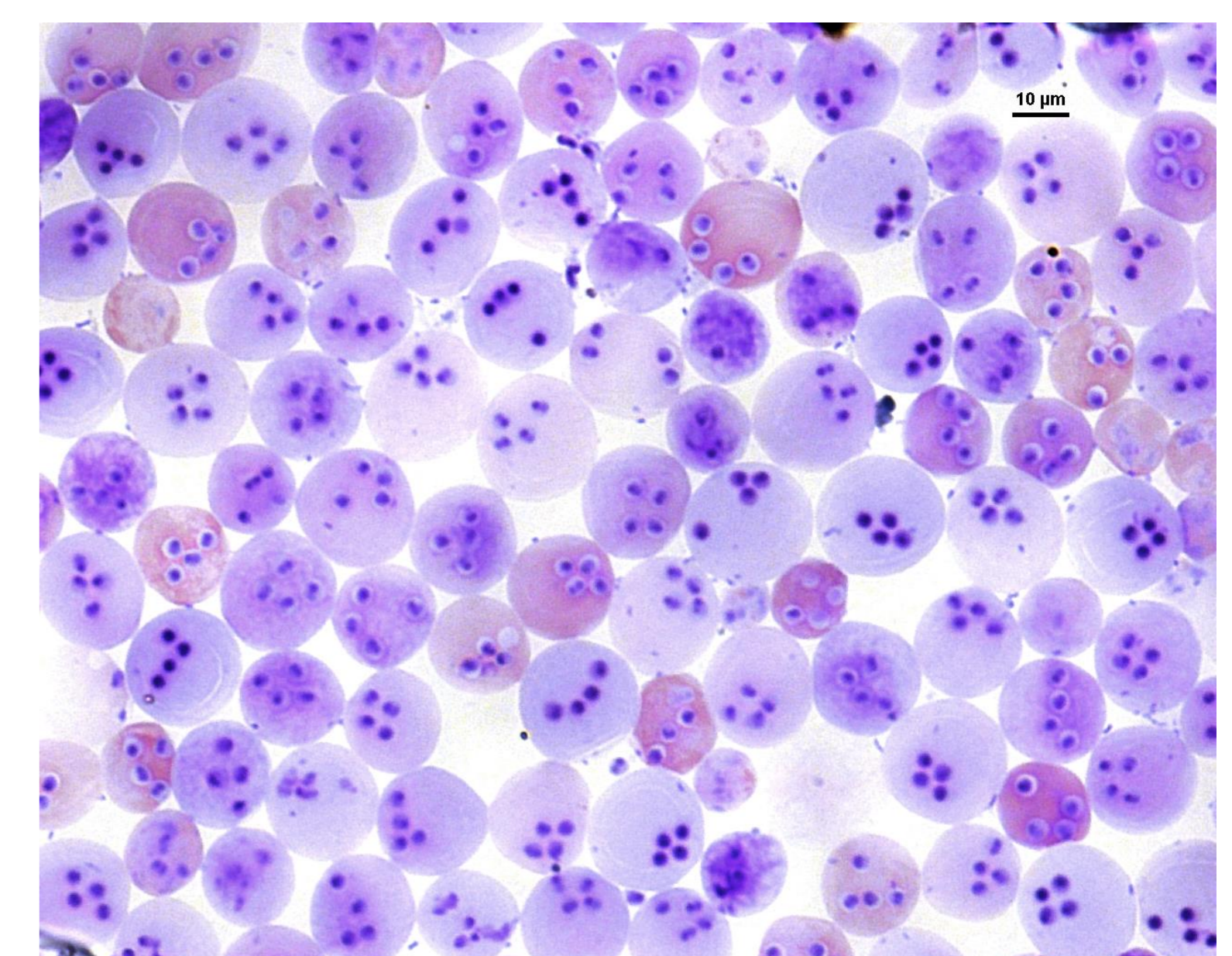


Fig.2 *Marteilia* purificada

## Resultados y discusión

La secuenciación *Illumina* resultó en:

- 37.045.914 lecturas pareadas, 1.361.612 analizadas con RepeatExplorer.
- 407 clústeres de ADN repetido: 368 descartados por su similitud con *M. galloprovincialis*.
- 4 clústeres principales de ADN repetido específicos de *M. refringens* seleccionados para posteriores análisis (Fig. 3):
  - Una familia con similitud del 100% con el ADN ribosómico de *Marteilia refringens* (CL191contig1) utilizada como semilla para el ensamblaje, obteniéndose por primera vez la unidad de repetición completa del locus de ADN ribosómico del parásito compuesto por los genes 18S, 28S, 5,8S y los espaciadores IGS, ITS1 e ITS2, con un total de 9.862 pares de bases (Fig. 4).
  - El análisis de las secuencias ITS1 revela una variabilidad intrapoblacional del 98,8% y las posiciones diagnóstico basadas en esta región constata que todas las variantes analizadas coinciden con el perfil "M" (mejillón) de *Marteilia refringens* / *Marteilia pararefringens*.
  - El análisis del solapamiento ha permitido detectar una región hipervariable en la zona 5' del espaciador IGS que podría ser utilizada como diana para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas más específicas que aquellas basadas en el ITS1.

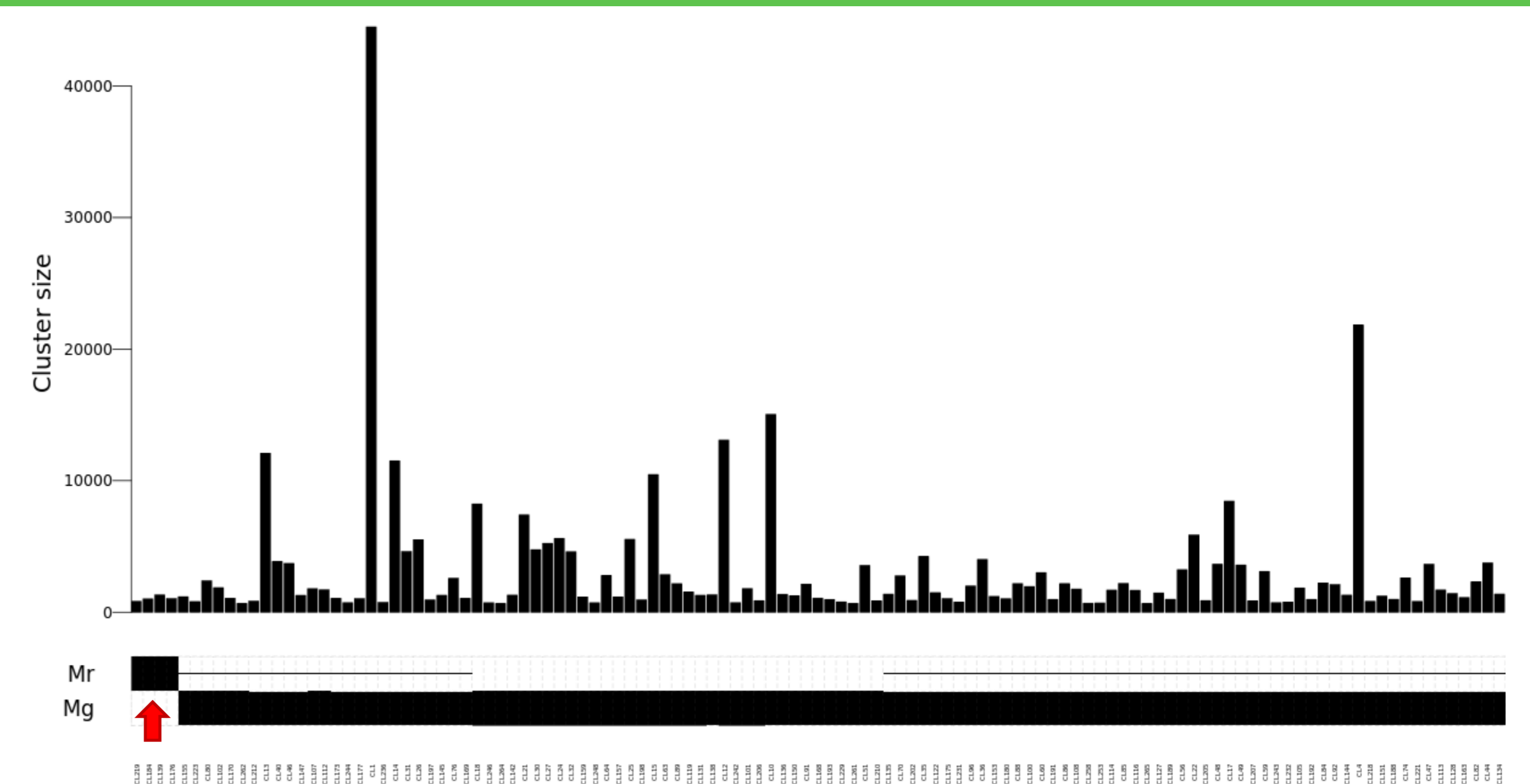


Fig.3 Comparación de clusters de ADN repetido entre *M. galloprovincialis* (Mg) y *M. refringens* (Mr). Los cuatro primeros clústeres son exclusivos del genoma de *M. refringens* (flecha roja).

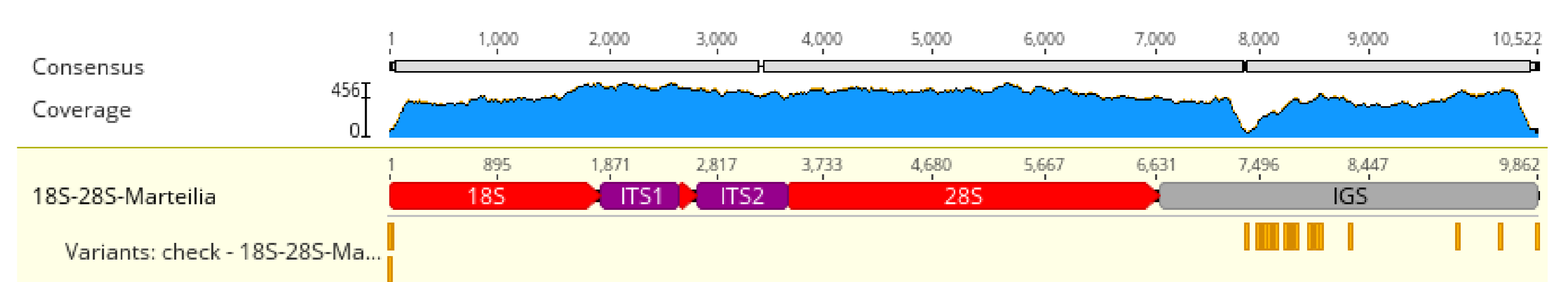


Fig.4 Unidad completa del ADN ribosómico caracterizado en *M. refringens* mediante secuenciación masiva. Las barras amarillas señalan las posiciones hipervariables en la comparación de las reads.

## Conclusiones

Esta primera región hipervariable detectada en el IGS es sólo el principio de los resultados esperables con la estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) a partir de ADN genómico del parásito purificado emprendida gracias al proyecto DIAMARTAND. El grado de variabilidad del resto de clústeres obtenidos en este análisis está siendo evaluado con el fin de localizar nuevos marcadores específicos para las diferentes especies de *Marteilia*.

## Referencias

- Novák, P., Neumann, P. y Macas, J. 2020. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nature Protocols*, 15(11): 3745-3776.
- Robledo, J. A. F., Mialhe, E. y Figueras, A. J. 1995. Purification of several phases of the parasite *Marteilia* (Protozoa: Asctospora) from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Techniques in fish immunology*, 4: 117-122.
- Seutin, G., White, B. N. y Boag, P. T. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian journal of zoology*, 69(1): 82-90.

## Agradecimientos

El presente trabajo se ha realizado gracias al Proyecto de Investigación PAIDI P20.00993 "Diagnóstico y caracterización genómica de la marteilosis en el litoral andaluz" (DIAMARTAND), Cofinanciado (80%) con fondos FEDER, Programa Operativo FEDER 2014-2020. Pablo García Sánchez disfruta de un contrato cofinanciado en un 91 por 100, por el Fondo Social Europeo dentro del Programa Operativo de Empleo Juvenil, para el período de programación 2014-2020, así como la Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI).



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de Desarrollo Regional



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Social Europeo  
El FSE invierte en tu futuro



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Junta de Andalucía**  
Consejería de Agricultura, Pesca,  
Agua y Desarrollo Rural  
Instituto Andaluz de Investigación  
y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria  
y de la Producción Ecológica