



亓玉华, 高杰, 任朋朋, 等. 一种新型类微小核糖核酸病毒的分子鉴定与分析 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059418.

Qi Y H, Gao J, Ren P P, *et al.* Molecular identification and analysis of a novel picorna-like virus [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059418 (in Chinese).

一种新型类微小核糖核酸病毒的分子鉴定与分析

亓玉华¹, 高杰¹, 任朋朋², 叶庄新², 李远宁³,
孙磊¹, 李俊敏², 王显伟^{1*}

(1. 山东大学生命科学院, 山东省发育稳态与再生重点实验室, 山东 青岛 266237;

2. 宁波大学植物病毒学研究所, 农产品质量安全全国重点实验室,
农业农村部 and 浙江省植物保护生物技术重点实验室, 浙江宁波 315211;

3. 山东大学海洋研究院, 山东青岛 266237)

摘要: 【目的】鉴定拟穴青蟹中的潜在 RNA 病毒, 解析其基因组特征、分类地位及其来源的小干扰 RNA 特征。【方法】以拟穴青蟹外观健康个体为研究对象, 采用宏转录组技术筛选候选病毒序列; 利用 RT-PCR、RACE 及 Sanger 测序获取病毒全长基因组序列; 基于生物信息学方法开展开放阅读框预测、保守结构域注释及系统发育分析; 进一步通过小 RNA 测序分析病毒来源的小干扰 RNA (vsiRNAs) 的长度分布特征。【结果】在拟穴青蟹样品中共鉴定到 3 种 RNA 病毒, 包括呼肠孤病毒、类整体病毒以及一种新型类微小核糖核酸病毒, 命名为拟穴青蟹类微小核糖核酸病毒 1 (SpPLV1)。该病毒基因组全长 9 596 nt, 包含 2 个开放阅读框, 编码 RNA 解旋酶、RNA 依赖的 RNA 聚合酶及衣壳蛋白等保守结构域。系统发育分析表明, SpPLV1 与温州类微小核糖核酸病毒 6、7 等聚集为独立分支, 并与海洋 RNA 病毒科亲缘关系较近。小 RNA 分析发现, 在拟穴青蟹样品中分别检出 125 720 条和 226 399 条可比对至温州蟹病毒 5 和拟穴青蟹呼肠孤病毒基因组的 vsiRNAs, 其长度以 22 nt 为主, 且正义链与负义链 vsiRNA 分布均衡; 此外, 检测到 44 条可比对至 SpPLV1 基因组的 sRNA 序列, 且未呈现明显的长度峰值与正负链分布特征。【结论】SpPLV1 是在拟穴青蟹中发现的一种新的类微小核糖核酸病毒, 其基因组结构具有该类病毒的典型特征, 属于与海洋 RNA 病毒科相近的未分类病毒谱系。研究结果丰富了拟穴青蟹微小核糖核酸病毒的多样性, 为进一步开展该病毒的生物学特性及其在宿主生理调控与病害发生中的潜在作用研究提供了理论依据。

关键词: 拟穴青蟹; 类微小核糖核酸病毒; 病毒鉴定; 宏转录组测序; 小 RNA 分析

中图分类号: S 945

文献标志码: A

收稿日期: 2026-01-12 修回日期: 2026-02-12

资助项目: 国家自然科学基金 (32525058)

第一作者: 亓玉华, 从事甲壳动物 RNA 病毒多样性研究, E-mail: qyhaa777@163.com

通信作者: 王显伟, 从事甲壳类免疫与病害防控研究, E-mail: wangxianwei@sdu.edu.cn



拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 广泛分布于中国东南沿海, 是我国重要的养殖蟹类之一, 具有较高的经济价值^[1]。然而, 随着养殖规模的扩大和集约化程度的提高, 由多种病原体 (包括病毒) 引起的病害问题日益突出, 已导致严重的生产损失^[2-4]。其中, 白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是已知感染养殖青蟹的重要病原之一^[5]; 此外, 青蟹呼肠孤病毒 (mud crab reovirus, MCRV) 于 2004 年首次在广东省报道, 其感染可导致超过 70% 的死亡率^[6-7]。近年来报道的青蟹双顺反子病毒-1 (mud crab dicistrovirus-1, MCDV-1) 隶属于双顺反子病毒科 (Dicistroviridae) 微小核糖核酸病毒目 (Picornavirales), 其感染可导致拟穴青蟹 100% 死亡^[8], 给青蟹养殖产业造成了显著的经济损失。尽管 WSSV 和 MCDV-1 等高致病性病毒已得到较为系统的研究, 但拟穴青蟹中更为广泛的病毒多样性, 尤其是可能与宿主长期共存、呈低致病性或隐性感染的病毒, 仍缺乏深入认识。

近年来, 高通量测序技术的快速发展极大地推动了无脊椎动物病毒组学研究, 大量未知 RNA 病毒被鉴定, 显著拓展了人们对病毒多样性及其进化关系的认识^[9-10]。在甲壳动物中, 研究人员已发现多类 RNA 病毒, 其中包括微小核糖核酸病毒目的新成员^[11-12]。该类病毒通常具有无包膜、二十面体对称的病毒粒子结构, 其基因组为正义单链 RNA, 广泛存在于脊椎动物与无脊椎动物中^[13-14]。其基因组通常编码结构蛋白和非结构蛋白, 如衣壳蛋白 (CP) 以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRp) 等^[15-16]。然而, 迄今为止在拟穴青蟹中仅报道过一种隶属于该病毒目的病毒 (MCDV-1), 微小核糖核酸病毒在青蟹中的多样性及其潜在生物学意义仍有待研究。

此外, 宿主对 RNA 病毒的免疫反应, 特别是 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 通路, 是节肢动物抵抗病毒感染的重要防线。病毒在复制过程中产生的双链 RNA 中间体可被宿主的 Dicer 核酸酶识别并切割, 形成长度主要为 21~23 个核苷酸 (nt) 的病毒来源小干扰 RNA (vsiRNAs), 进而介导同源病毒 RNA 的降解^[17-18]。因此, 分析宿主内 vsiRNA 的长度分布及链方向等特征, 可间接反映病毒的复制活性, 在缺乏培养体系的新病毒鉴定研究中尤为关键^[19]。

本研究利用宏转录组测序技术, 对表观健康的拟穴青蟹个体进行 RNA 病毒鉴定与分析, 发现并报道了一种新型类微小核糖核酸病毒。本研究通过获取其全基因组序列, 分析其基因组结构与分类地位; 进一步结合小 RNA (sRNA) 测序, 分析病毒感染所诱导产生的 vsiRNA 特征, 为后续探究其潜在功能及生态学角色提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2022 年从浙江省宁波市某水产市场随机采集 1 只外观健康的拟穴青蟹成体样品, 解剖并收集肌肉、肝胰腺、鳃、血淋巴以及心脏组织, 混合后充分研磨, 用于后续 RNA 提取。本研究获得了山东大学生命科学学院实验动物伦理委员会批准 (SYDWLL-2021-98), 实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照实验动物伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 RNA 提取与转录组测序

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取混合组织总 RNA, 具体操作按照说明书进行。使用 NanoDrop 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 检测 RNA 的浓度和纯度。质控合格的 RNA 样品由北京诺禾致源科技股份有限公司构建总 RNA 文库, 并在 Illumina HiSeq 4000 平台进行双端测序。对获得的原始测序数据 (raw reads) 进行严格质控, 去除接头及低质量序列, 获得高质量干净数据 (clean reads)。随后使用 Trinity v2.8.5 软件在默认参数下进行无参考基因组的从头组装^[20], 获得转录组拼接序列 (contigs)。

1.3 宿主物种鉴定

将转录组拼接获得的序列与生命条形码数据库 (Barcode of Life Data Systems, BOLD) 中的参考序列进行 BLASTn 比对。从中提取匹配的线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COI) 基因序列, 进一步与 NCBI 非冗余核酸数据库 (NT) 进行比对, 以确认宿主物种信息。同时, 设计特异性引物对 COI 基因进行 PCR 扩增, 并通过 Sanger 测序进行验证, 引物信息见表 1。

1.4 RNA 病毒鉴定与全长序列获取

将转录组拼接序列与本地构建的 NCBI 参考

病毒数据库(更新至 2025 年 1 月)进行 BLASTx 比对 (e 值阈值设为 $1e^{-5}$), 以筛选潜在病毒来源序列。随后将候选病毒序列与 NCBI 非冗余蛋白数据库 (NR) 及核酸数据库进行比对, 以排除源于宿主或其他非病毒生物的假阳性匹配。根据鉴定得到的候选新病毒序列设计多对特异性重叠引物, 引物信息见表 1。使用反转录聚合酶链反应试剂 (HiScript[®] II QRTSuperMix for qPCR, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 将青蟹总 RNA 反转录合

成 cDNA, 并以其为模板进行 PCR 扩增。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 DNA 回收试剂盒 [天根生化科技(北京)有限公司] 纯化, 并进行 Sanger 测序。使用 SMARTer[®]RACE 5'/3' Kit (TaKaRa, 日本) 通过 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆新病毒基因组 5' 末端和 3' 末端的缺失序列, 引物信息见表 1。根据 RACE 与 Sanger 测序获得序列进行比对与拼接, 获得完整的新病毒基因组序列。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

| 引物名称 primer name | 引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3') | 引物用途 usage of primer |
|---------------------|---|--------------------------|
| SpCOI-F | ATCAAATTTATAATGTTGTGTTAC | 宿主 COI 基因序列扩增 |
| SpCOI-R | GAGGAAATCAGTGTGCAATACCAGC | |
| 5'-RACE GSP | CCCAGTCCCAAGCCACATGGACTATCTCC | SpPLV1 基因组 5' 末端 RACE 扩增 |
| 3'-RACE GSP | GGACGGACTGCTATGTTACACCTGTTACG | SpPLV1 基因组 3' 末端 RACE 扩增 |
| Long primer | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT | 5'/3' 末端 RACE 扩增 |
| Short primer | CTAATACGACTCACTATAGGGC | |
| SpPLV1-F1 | CTGTGCGTTCGAGCGCGTATG | SpPLV1 基因组序列扩增 |
| SpPLV1-R1 | CTCAACGAAATCAGATTCTC | |
| SpPLV1-F2 | CAGCATTACTCACGAGTGCAGG | |
| SpPLV1-R2 | TCCTTCTGCACCAATGCTTTAG | |
| SpPLV1-F3 | GAACCAGGAAGAATGTTTCAG | |
| SpPLV1-R3 | CACCATTGGCATGTCTCAAG | |
| SpPLV1-F4 | GATACTTGATCCTTGGTCAAC | |
| SpPLV1-R4 | CGTGCTGCCACACGTCGAC | |

1.5 病毒基因组结构分析

使用 TBtools-II 软件对新病毒基因组进行开放阅读框 (ORFs) 预测^[21]。使用 NCBI 保守结构域数据库 (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对预测的蛋白序列进行保守结构域注释。同时, 使用 Bowtie2 v2.3.5.1 软件将质控后的转录组测序 clean reads 比对至完整病毒基因组序列, 通过 RStudio v2022.02.1+461 软件对结果进行可视化分析。

1.6 系统发育分析

使用 MAFFT v7.525 将新病毒 RdRp 保守结构域序列与已报道的微小核糖核酸病毒及类微小核糖核酸病毒的 RdRp 序列进行多序列比对^[22], 并使用 Gblocks 0.91b 去除比对低可信区域。使用 ModelTest-NG v0.1.7 评估最优替代模型^[23], 使用

IQ-TREE v3.0.1 构建最大似然 (ML) 系统发育树^[24], 并进行 1000 次自举重复分析, 以马铃薯 Y 病毒 (PVY) 作为外群。采用相同的序列比对、模型选择和系统发育分析方法, 基于 SpPLV1 及与已报道的微小核糖核酸病毒及类微小核糖核酸病毒的完整基因组序列构建最大似然系统发育进化树。同时, 使用 MegAlign v7.1.0 和 BioEdit Sequence Alignment Editor v7.1.11 软件^[25-26] 对病毒 RdRp 的氨基酸 (aa) 和核苷酸序列进行比对和同源性分析。所用病毒名称及其 GenBank 登录号见表 2。

1.7 sRNA 测序与分析

sRNA 测序由北京诺禾致源科技股份有限公司在 Illumina HiSeq 2500 平台完成。对 sRNA 原始数据进行质控, 去除接头及低质量序列。使用 Bowtie v1.2.3 软件将 sRNA 数据比对到完整病毒

表 2 病毒名称缩写及 GenBank 登录号

Tab. 2 Abbreviations of virus names and GenBank accession numbers

| 缩写 abbreviations | 病毒完整名称 complete virus name | 基因组登录号 accession (genome) | RdRp 登录号 accession (RdRp) |
|---------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| SpPLV1 | 拟穴青蟹类微小核糖核酸病毒1 <i>S. paramamosain</i> picorna-like virus 1 | PV550974 | XRT70651 |
| WzPLV6 | 温州类微小核糖核酸病毒6 Wenzhou picorna-like virus 6 | NC_033110.1 | YP_009337309.1 |
| WzPLV7 | 温州类微小核糖核酸病毒7 Wenzhou picorna-like virus 7 | NC_032842.1 | YP_009336714.1 |
| BhPLV23 | 北海类微小核糖核酸病毒23 Beihai picorna-like virus 23 | NC_032636.1 | YP_009333593.1 |
| APLV2 | 蜜蜂类微小核糖核酸病毒2 <i>Apis</i> picorna-like virus 2 | MZ822068.1 | UCR92470.1 |
| PwMLV7 | 威尔逊围沙蚕类海洋RNA病毒7 <i>Perinereis wilsoni</i> marma-like virus 7 | PP479897.1 | XDE70239.1 |
| JP-B | 海洋RNA病毒JP-B marine RNA virus JP-B | NC_009758.1 | YP_001429583.1 |
| SF-1 | 海洋RNA病毒SF-1 marine RNA virus SF-1 | NC_043515.1 | YP_009666351.1 |
| SF-2 | 海洋RNA病毒SF-2 marine RNA virus SF-2 | NC_043518.1 | YP_009666360.1 |
| SF-3 | 海洋RNA病毒SF-3 marine RNA virus SF-3 | NC_043519.1 | YP_009666362.1 |
| SqMV | 南瓜花叶病毒 <i>Squash mosaic virus</i> | NC_003799.1 | NP_620657.1 |
| PepMMV | 辣椒轻花叶病毒 pepper mild mosaic virus | NC_078594.1 | YP_010840300.1 |
| ABPV | 急性蜜蜂麻痹病毒 acute bee paralysis virus | NC_002548.1 | NP_066241.1 |
| MCDV | 青蟹双顺反子病毒 mud crab dicistrovirus | NC_014793.1 | YP_004063985.1 |
| IAPV | 以色列急性蜜蜂麻痹病毒 Israel acute paralysis virus | NC_009025.1 | YP_001040002.1 |
| KBV | 克什米尔蜜蜂病毒 Kashmir bee virus | NC_004807.1 | NP_851403.1 |
| AdIV | 家蟋蟀传染性软腐病病毒 <i>acheta domesticus</i> iflavivirus | NC_078647.1 | YP_010840358.1 |
| DWV | 蜜蜂残翅病毒 deformed wing virus | NC_004830.2 | NP_853560.2 |
| SBPV | 缓慢性蜜蜂麻痹病毒 slow bee paralysis virus | NC_014137.1 | YP_003622540.1 |
| SeIV2 | 甜菜夜蛾传染性软腐病病毒2 <i>Spodoptera exigua</i> iflavivirus 2 | NC_023676.1 | YP_009010984.1 |
| PVY | 马铃薯Y病毒 potato virus Y | X12456.1 | CAA30988.1 |

基因组序列。为提高比对特异性和结果的准确性，采用不允许错配的策略。随后使用 Perl 脚本对 sRNA 的长度分布、正负链来源及 5'核苷酸偏好进行统计，并通过 RStudio v2022.02.1+461 软件对结果进行可视化分析。

2 结果

2.1 转录组测序与宿主物种鉴定

对青蟹混合组织样品进行转录组测序，共获得 22 908 900 对原始读长。经质控后，使用 Trinity 软件组装获得 149 220 条转录组拼接序列，N50 为 2 239 nt。将拼接序列与 BOLD 数据库中 COI 基因参考序列进行比对，获得的 COI 序列与拟穴青蟹参考序列的核苷酸一致性为 99.77%，确认样品物种为拟穴青蟹。该 COI 序列进一步经 Sanger 测序验证，并提交至 GenBank 数据库，登录号为 PV545300。

2.2 拟穴青蟹中 RNA 病毒鉴定

通过与 NCBI 病毒参考数据库比对，在组装的转录本序列中共鉴定出 13 条可归属于 2 种已知病毒的 Contigs。其中，1 条长度为 8 419 nt 的 Contig 与温州蟹病毒 5 (YP_009337110.1) 的氨基酸一致性为 93.37%，是一种类整体病毒 (toti-like virus)，属于加布里埃尔病毒目 (Ghabrivirusales)；另外 12 条 Contigs 则与拟穴青蟹呼肠孤病毒和锯缘青蟹呼肠孤病毒相应序列的氨基酸一致性介于 96.80%~100.00%，属于呼肠孤病毒目 (Reovirales)，上述结果表明该样本存在两种已知病毒的共感染现象 (图 1)。此外，在青蟹样本中还鉴定到一条长度 9 439 nt、覆盖度较高 (50.70 ×) 的新型类微小核糖核酸病毒 Contig，表明其为一种潜在的新病毒。通过 Rt-PCR、RACE (图 2) 结合 Sanger 测序进一步验证并获得该病毒的完整基因组序列，其全长为 9 596 nt (不含 polyA 尾)，GC 含量为 42.23%。该新病毒与温州类微小核糖核酸病毒 6 (WzPLV6)；

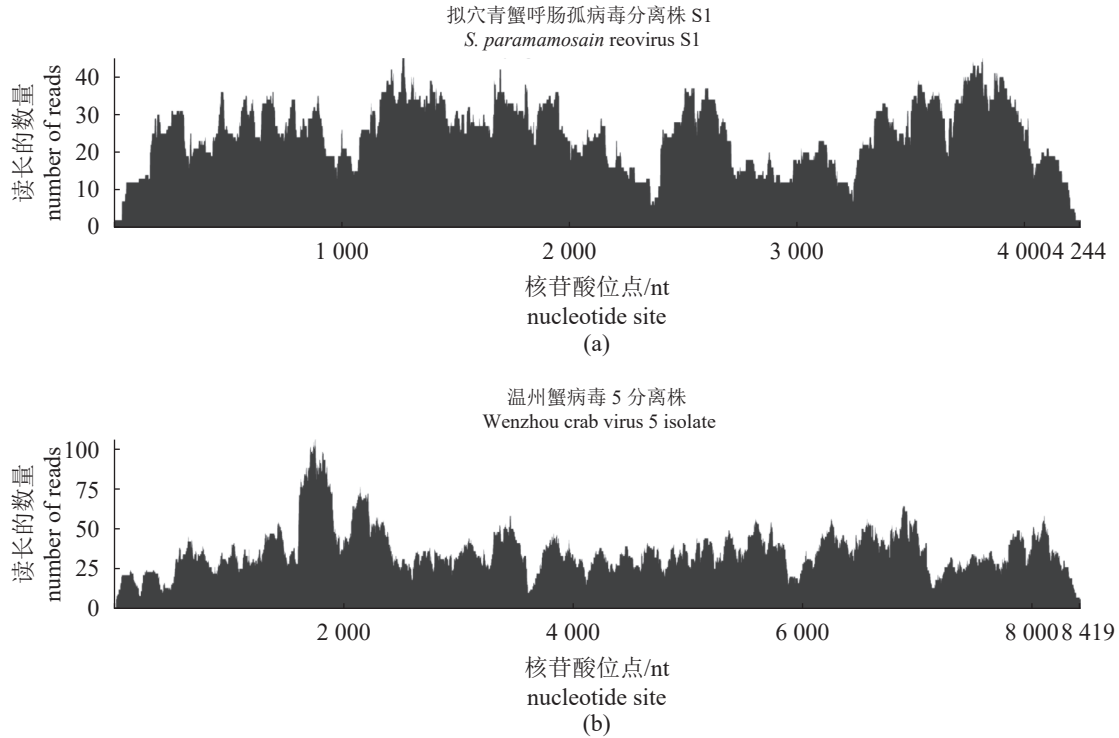


图 1 拟穴青蟹呼肠孤病毒分离株 S1 和温州蟹病毒 5 分离株的基因组读长覆盖度

横坐标为基因组位置, 纵坐标为测序覆盖度。

Fig. 1 Genome coverage distribution of *S. paramamosain* reovirus isolate S1 and Wenzhou crab virus 5 isolate

The x-axis indicates the genomic position, and the y-axis represents sequencing depth.

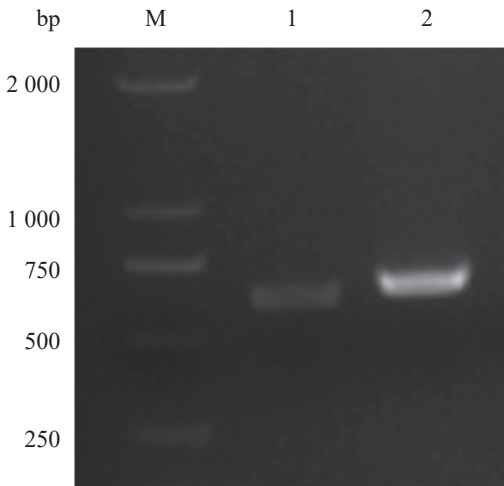


图 2 SpPLV1 基因组 3'末端和 5'末端 RACE 扩增结果 M.DNA 分子质量标准 (Marker); 1.SpPLV1 基因组 3'端 RACE 扩增产物; 2.SpPLV1 基因组 5'端 RACE 扩增产物。

Fig. 2 Amplification of the 3' and 5' terminal sequences of SpPLV1 by RACE

M. DNA marker; lane 1. 3' RACE product of SpPLV1; lane 2. 5' RACE product of SpPLV1.

登录号 YP_009337309.1, 宿主为双壳类) 和温州类微小核糖核酸病毒 7 (WzPLV7; 登录号 YP_009336714.1, 宿主为对虾) 的 RdRp 氨基酸序

列同源性最高, 分别为 78.80% 和 53.95%。该病毒被命名为“拟穴青蟹类微小核糖核酸病毒 1 (SpPLV1)”, 其完整基因组序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PV550974。

2.3 SpPLV1 基因组结构特征

SpPLV1 基因组包含 2 个 ORFs, 分别为 ORF1 和 ORF2。ORF1 编码一条长度为 1 828 aa 的蛋白, 包含 RNA 解旋酶 (Hel)、半胱氨酸蛋白酶 C3 (Pep) 和 RdRp 共 3 个保守结构域; ORF2 编码一条长度为 862 aa 的蛋白, 含有 4 个与病毒衣壳相关的结构域, 即 2 个 rhv-like 结构域、1 个 VP4 结构域和 1 个 CRPV 衣壳结构域。此外, SpPLV1 基因组还包含一段 868 nt 的 5'非翻译区 (UTR) 和一段 247 nt 的 3' UTR (图 3-a)。分析结果表明, SpPLV1 具有典型的微小核糖核酸病毒保守结构域, 与此前甲壳动物中报道的该类病毒特征一致^[10]。丰度分析显示, SpPLV1 来源的读段大多在基因组 3'末端聚集, 尤其是在 ORF2 区域中呈现更高的丰度(图 3-b), 表明该区域可能具有较为活跃的转录或复制活动。

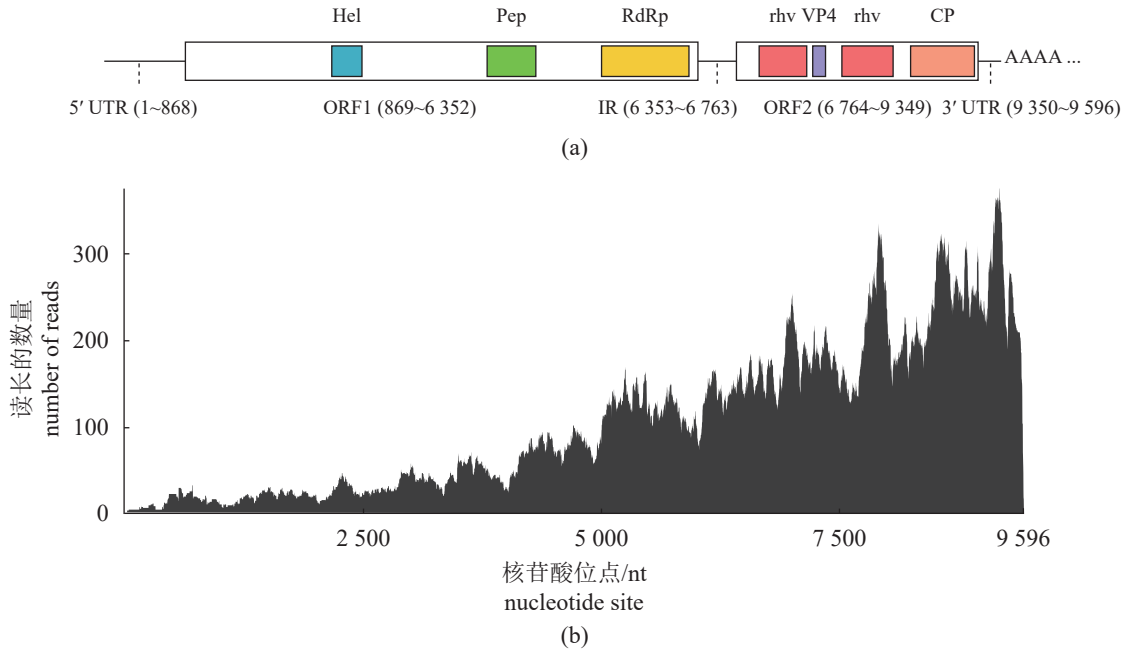


图 3 SpPLV1 的基因组长度与覆盖度

(a) SpPLV1 基因组 RNA 结构; UTR.非翻译区, ORF.开放阅读框, IR.基因间区, Hel. RNA 解旋酶, Pep. 半胱氨酸蛋白酶 C3, RdRp. RNA 依赖的 RNA 聚合酶, rhv、VP4、CP.衣壳蛋白相关结构域。(b) SpPLV1 基因组的读长覆盖度。横坐标为基因组位置, 纵坐标为测序覆盖度。

Fig. 3 Genome structure and reads coverage of SpPLV1

(a) genome structure of SpPLV1; UTR. untranslated region; ORF. open reading frame; IR. intergenic region; Hel. RNA helicase; Pep. peptidase C3; RdRp. RNA-dependent RNA polymerase; rhv, VP4, and CP indicate capsid protein-related domains. (b) reads coverage of the genome of SpPLV1. The x-axis represents the genome position, and the y-axis indicates sequencing coverage depth.

2.4 SpPLV1 的分类地位与序列同源性

为明确 SpPLV1 的系统分类地位, 分别基于其 RdRp 氨基酸序列与全基因组序列, 与已知的代表性微小核糖核酸病毒进行多序列比对, 并构建系统发育树。基于 RdRp 氨基酸序列构建的进化树显示, SpPLV1 与 WzPLV6 聚为一支(图 4-a), 并共同与 WzPLV7 等病毒形成一个独立的未分类进化分支。基于全基因组序列构建的最大进化树显示, SpPLV1 在全基因组水平上同样与 WzPLV6 和 WzPLV7 等病毒聚为一支(图 4-b), 并形成与其他病毒科清晰区分的独立进化分支。该分支在全基因组系统发育树中的拓扑结构与基于 RdRp 序列的分析结果高度一致, 进一步支持 SpPLV1 及其相近病毒代表一个尚未分类的独立系统发育类群。值得注意的是, 该分支与海洋 RNA 病毒科的病毒表现出较近的亲缘关系(图 4), 表明 SpPLV1 及其相近病毒可能在进化上与海洋 RNA 病毒科成员具有共同的起源或密切的遗传联系。

进一步对 SpPLV1 与其他微小核糖核酸病毒进行序列同源性分析。基于 RdRp 结构域,

SpPLV1 与该未分类进化分支中的病毒表现出较高的序列相似性, 与 WzPLV6 的同源性最高, 氨基酸和核苷酸序列一致性分别为 88.9% 和 77.2% (图 5), SpPLV1 与该分支中其他病毒的 RdRp 氨基酸和核苷酸序列一致性分别为 61.9%~88.9% 和 62.2%~77.2% (表 3)。与其他病毒科成员相比, 该分支病毒与海洋 RNA 病毒科的序列相似性更高, 该结果与系统发育树的拓扑结构一致。

2.5 病毒来源的小干扰 RNA 特征

对 SpPLV1 及 2 种已知病毒来源的 vsiRNA 进行分析, sRNA 测序共获得 14 318 346 条 sRNA 序列, 其中 44 个为 SpPLV1 来源的 sRNA, 125 720 个为温州蟹病毒 5 来源的 vsiRNA, 226 399 个为拟穴青蟹呼肠孤病毒来源的 vsiRNA。长度分布分析发现, 源于拟穴青蟹呼肠孤病毒和温州蟹病毒 5 的 siRNA 长度以 22 nt 为主, 且正负链分布均衡, 符合典型的 vsiRNA 的特征(图 6-a, b)。相比之下, SpPLV1 来源的 sRNA 数量极少, 且未呈现明显的长度峰值与正负链分布特征(图 6-c), 表明 SpPLV1 在样品中可能处于低复制水平。上述结

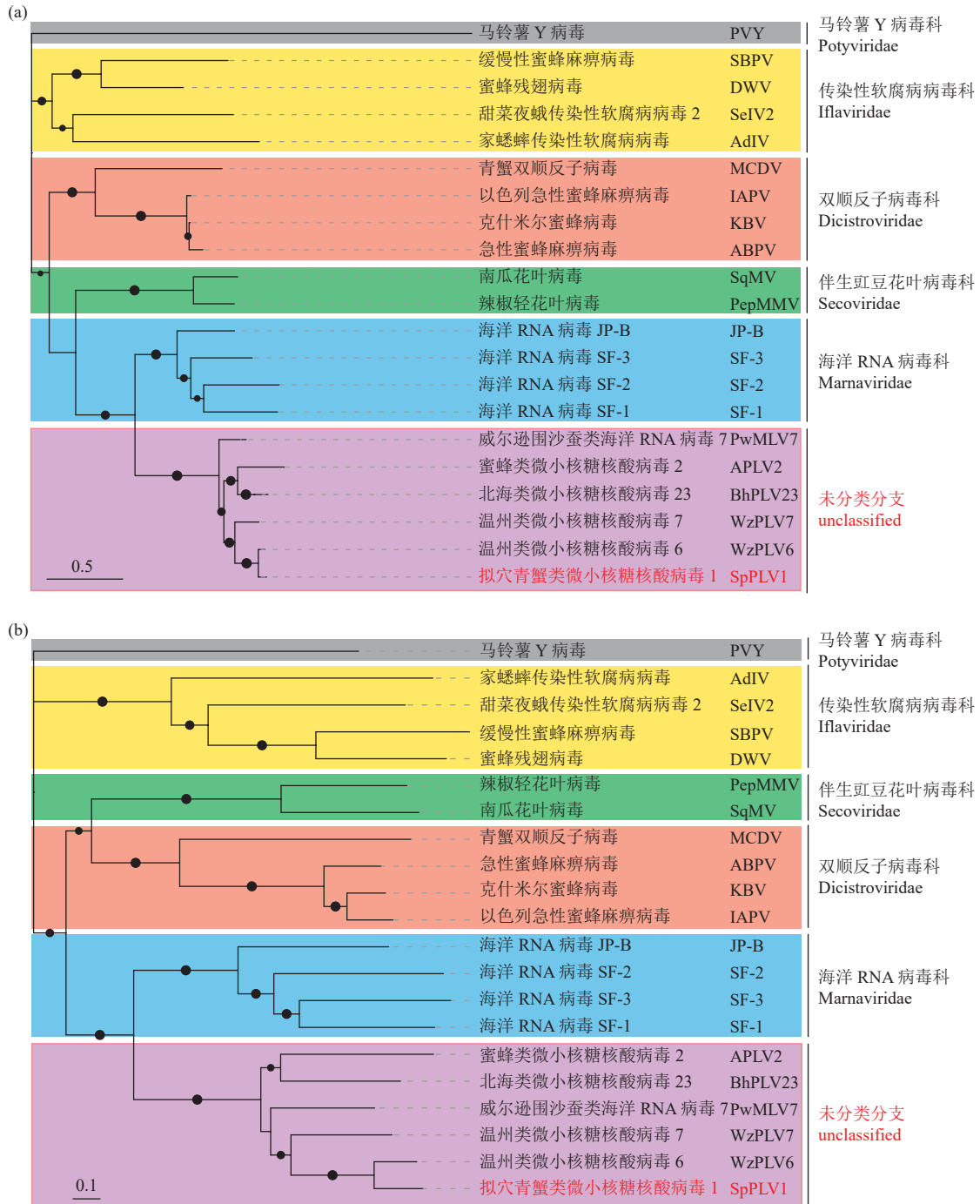


图 4 基于最大似然法构建的 SpPLV1 与微小核糖核酸病毒的 RdRp 氨基酸序列与全基因组序列系统发育进化树
 Fig. 4 Phylogenetic analysis of SpPLV1 and picornavirus-related viruses based on RdRp amino acid sequences and complete genome sequences using the maximum likelihood method

果表明, 拟穴青蟹呼肠孤病毒和温州蟹病毒 5 感染后可诱导宿主产生大量 vsRNA, 可能激活了宿主 RNAi 抗病毒免疫通路。

3 讨论

近年来, 高通量测序技术在水生动物病毒组

学研究中的广泛应用, 极大地拓展了人们对水生动物病毒多样性的认知^[11-12, 14]。本研究基于宏转录组测序, 在拟穴青蟹个体中共鉴定到 3 种 RNA 病毒, 包括 2 种已知病毒(呼肠孤病毒和类整体病毒)以及 1 种新的类微小核糖核酸病毒 SpPLV1。通过对 SpPLV1 的基因组特征分析、结构注释及

表 3 SpPLV1 和代表性微小核糖核酸病毒保守 RdRp 结构域氨基酸及核苷酸序列一致性分析

Tab. 3 Amino acid/nucleotide sequence identity based on the conserved RdRP domain of SpPLV1 and representative picornaviruses

Table with 21 columns (virus family, virus name, and sequence identity percentages 1-20) and rows for various virus families including unclassified, Marnaviridae, Secoviridae, Dicistroviridae, and Iflaviridae.

注: 氨基酸序列一致性以粗体表示, 核苷酸序列一致性以非粗体表示。1~20表示左侧列中的相应病毒。病毒名称及其GenBank登录号见表2。Notes: Amino acid sequence identity is indicated by bold text. Nucleotide sequence identity is indicated by non-bold text. The numbers 1-20 represent the corresponding viruses in the left column. Virus names and GenBank accession numbers are listed in Tab. 2.

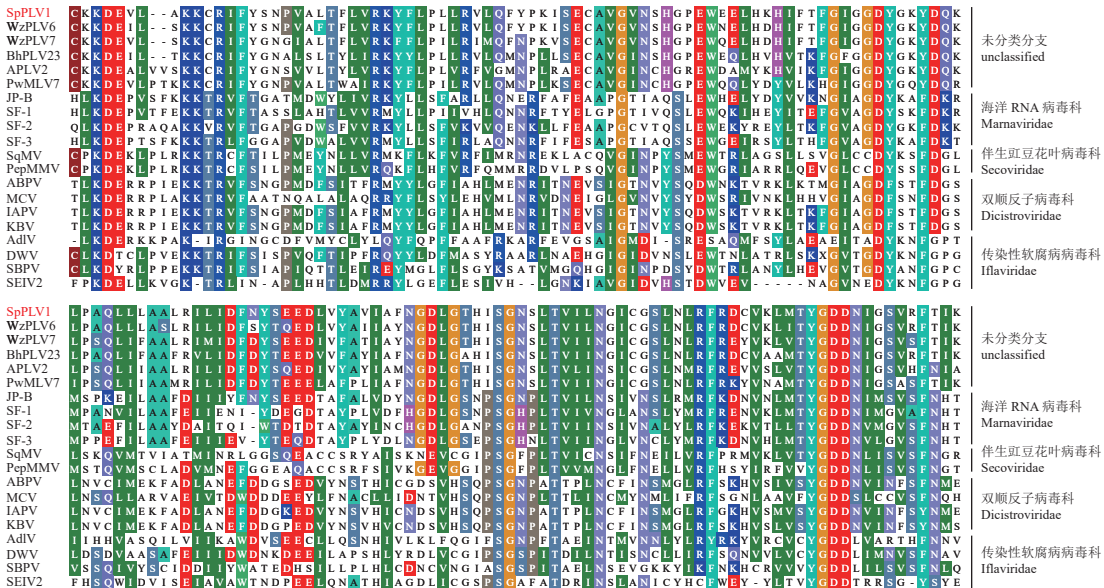


图 5 SpPLV1 与微小核糖核酸病毒的 RdRp 氨基酸序列同源性比对分析

Fig. 5 Homology alignment analysis based on RdRp amino acid sequences of SpPLV1 and picornaviruses

系统发育分析, 本研究为水产 RNA 病毒研究补充了新的基础数据。基因组结构分析显示, SpPLV1 具有典型的类微小核糖核酸病毒基因组特征, 其结构组成与

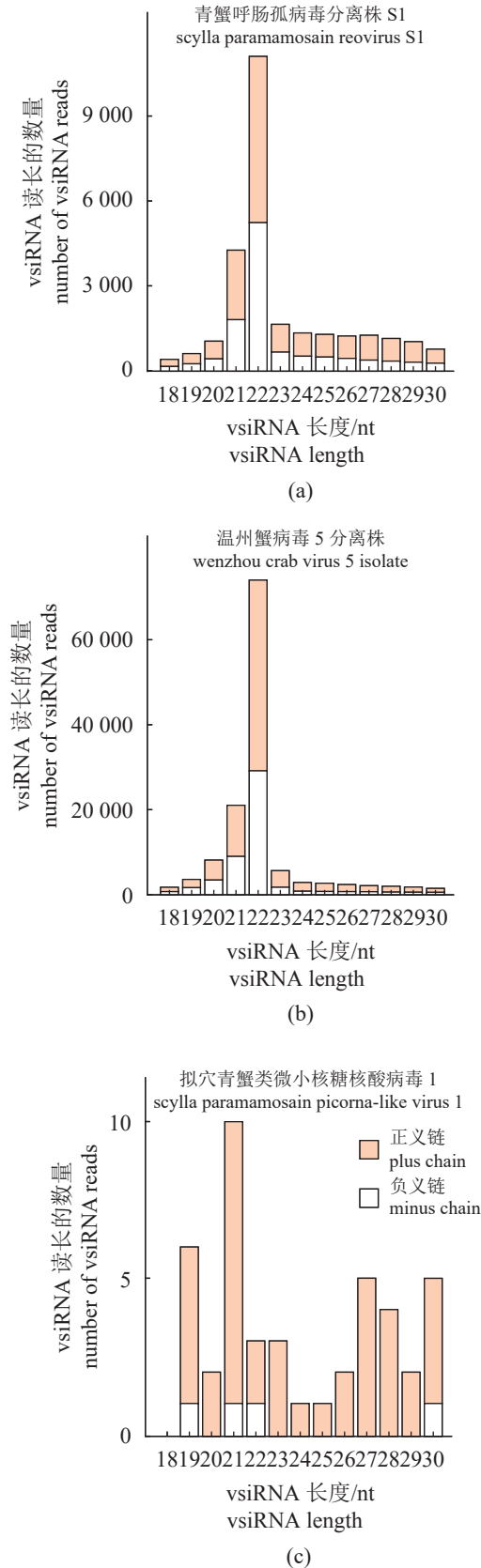


图 6 病毒来源的 vsRNA 分析
Fig. 6 Analysis of viruses derived vsRNA

已报道的多种无脊椎动物来源的该类病毒高度一致^[10, 27], 进一步支持其隶属于微小核糖核酸病毒目。值得注意的是, 病毒转录本在基因组中的分布呈现明显的区域偏好, 3'端 (尤其是 ORF2 区域) 的覆盖度显著高于 5'端。类似的转录特征已在多种 RNA 病毒中被观察到^[28-29], 可能与病毒复制策略、RNA 稳定性或测序文库构建偏倚等因素有关。系统发育分析表明, 基于 RdRp 氨基酸序列与全基因组序列的进化树拓扑结构一致。SpPLV1 与 WzPLV6、WzPLV7 等节肢动物来源的病毒聚集成一个独立的进化分支, 且该分支在系统发育上与海洋 RNA 病毒科成员表现出较近的亲缘关系。序列同源性分析结果与此一致, 表明该分支可能代表一个与海洋 RNA 病毒科相近但尚未被正式分类的新病毒谱系, 其系统发育地位及分类归属有待更多基因组数据与比较分析加以明确。

vsRNA 分析是判断 RNA 病毒是否在宿主主体内进行活跃复制的重要证据之一^[19]。本研究发现, 拟穴青蟹呼肠孤病毒和温州蟹病毒 5 可诱导宿主产生具有典型 RNAi 产物特征的 vsRNA, 其长度以 22 nt 为主, 且正、负链分布均衡。这些特征与昆虫等节肢动物中由 *dicer-2* 介导的 siRNA 通路产物高度吻合^[30], 表明其在宿主主体内处于活跃复制状态, 且宿主 RNAi 抗病毒免疫通路可能被这两种病毒激活。相比之下, SpPLV1 来源的 sRNA 数量极少, 该现象可能与病毒复制水平、感染阶段、组织特异性表达差异或样品中病毒丰度较低等因素相关, 其与宿主 RNAi 抗病毒通路之间的关系仍需进一步研究。值得注意的是, 由于本研究在 sRNA 比对中采用了不允许错配的比对策略, 可能导致实际产生的 vsRNA 数量被低估。

目前, 拟穴青蟹中已报道的 RNA 病毒种类相对有限, 且相关研究多集中于致病性较为明确的病毒类型^[1, 8], 而对可能与宿主长期共存的低致病性或隐性感染病毒关注较少。本研究发现的 SpPLV1 及另 2 种已知病毒均来源于外观健康个体, 表明这些病毒在拟穴青蟹自然种群中可能以非显性感染方式存在。需要指出的是, 本研究在宏转录组测序文库构建过程中未进行核糖体 RNA 去除处理, 样品中宿主 RNA 比例较高, 可能在一定程度上影响病毒序列的检出深度, 从而低估病毒的实际丰度。未来研究中可采用 rRNA 去除或病毒富集策略, 以进一步提高病毒序列的检出灵敏度。此外, 本研究基于单一样本的宏转录组数据开展分析, 病毒在自然种群中的流行情况仍有待进一

步调查。后续可通过扩大样本量、开展流行率监测及实验感染研究,进一步阐明病毒的遗传多样性及其与宿主健康状况之间的潜在关联。

综上所述,本研究在拟穴青蟹中鉴定到一种新的类微小核糖核酸病毒 SpPLV1,明确了其基因组全长为 9 596 nt;并对 SpPLV1 的基因组结构特点及分类地位进行了分析和研究。SpPLV1 的鉴定和分析丰富了拟穴青蟹微小核糖核酸病毒的多样性,为进一步开展该病毒的生物学特性及其在宿主生理调控与病害发生中的潜在作用研究提供了理论依据。

(作者声明本文无利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Kong T, Gong Y, Liu Y, *et al.* Scavenger receptor B promotes bacteria clearance by enhancing phagocytosis and attenuates white spot syndrome virus proliferation in *Scylla paramamosian*[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2018, 78: 79-90.
- [2] Li Y Y, Xia X A, Wu Q Y, *et al.* Infection with Hematodinium sp. in mud crabs *Scylla serrata* cultured in low salinity water in southern China[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 82(2): 145-150.
- [3] Guo Z X, Weng S P, Li G, *et al.* Development of an RT-PCR detection method for mud crab reovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 151(2): 237-241.
- [4] Gao Y, Liu S, Huang J, *et al.* Cryo-electron microscopy structures of novel viruses from mud crab *Scylla paramamosain* with multiple infections[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93: e02255-e2318.
- [5] Jithendran K P, Poornima M H, Balasubramanian C P, *et al.* Diseases of mud crabs (*Scylla* spp.): an overview [J]. *Indian Journal of Fisheries*, 2010, 57: 55-63.
- [6] Weng S P, Guo Z X, Sun J J, *et al.* A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2007, 30(3): 133-139.
- [7] Huang, Deng X, Li Y, *et al.* Structural insights into the classification of mud crab reovirus[J]. *Virus Research*, 2012, 166(1-2): 116-120.
- [8] Guo Z X, He J G, Xu H D, *et al.* Pathogenicity and complete genome sequence analysis of the mud crab dicistrovirus-1[J]. *Virus Research*, 2013, 171(1): 8-14.
- [9] 李晶, 杨洪一, 刘崇. 病毒宏基因组学的研究概况及应用 [J]. *黑龙江农业科学*, 2015, (12): 182-185.
- Li J, Yang H, Liu C. Research overview and applications of viral metagenomics [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2015, (12): 182-185 (in Chinese).
- [10] Shi M, Lin X D, Tian J H, *et al.* Redefining the invertebrate RNA virosphere[J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 539-543.
- [11] Zhang Y Y, Liao M E, Wu F, *et al.* Comparative study of the Malacostraca viromes between deep sea and shallow water[J]. *Science Bulletin*, 2021, 66(24): 2458-2461.
- [12] Zhang Y Y, Chen Y, Wei X, *et al.* Viromes in marine ecosystems reveal remarkable invertebrate RNA virus diversity[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(2): 426-437.
- [13] He W T, Hou X, Zhao J, *et al.* Virome characterization of game animals in China reveals a spectrum of emerging pathogens [J]. *Cell*, 2022, 185(7): 1117-1129 e8.
- [14] Dong X, Meng F, Zhou C, *et al.* Enormous diversity of RNA viruses in economic crustaceans[J]. *mSystems*, 2024, 9(10): e0101624.
- [15] Valles S M, Chen Y, Firth A E, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Dicistroviridae*[J]. *Journal Of General Virology*, 2017, 98(3): 355-356.
- [16] Valles S M, Chen Y, Firth A E, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: *Iflaviridae*[J]. *Journal Of General Virology*, 2017, 98(4): 527-528.
- [17] Wang X H, Aliyari R, Li W X, *et al.* RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 452-454.
- [18] Saleh M C, Tassetto M, Van Rij R P, *et al.* Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread[J]. *Nature*, 2009, 458(7236): 346-350.
- [19] Ding S W, Volinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs[J]. *Cell*, 2007, 130(3): 413-426.
- [20] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [21] Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-780.
- [23] Darriba D, Posada D, Kozlov A M, *et al.* ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(1): 291-294.
- [24] Nguyen L T, Schmidt H A, Von Haeseller A, *et al.* IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [25] Clwley J P, Arnold C M. The multiple alignment module of LASERGENE[J]. *Methods Molecular Biology* (Clifton, NJ),

- 1997, 70: 119-129.
- [26] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nuclc Acids Symposium Series*, 1999, 41(41): 95-98.
- [27] Culley A I, Lang A S, Suttle C A. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities[J]. *Science*, 2006, 312(5781): 1795-1798.
- [28] Ren P P, Ye Z X, Wang S N, *et al.* Complete genome analysis of a novel chuvirus from a southern green stink bug (*Nezara viridula*)[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(11): 2423-2427.
- [29] Zhang X D, Lu G, Ye Z X, *et al.* Complete genome analysis of a nege-like virus in aphids (*Astegopteryx formosana*)[J]. *Archives of Virology*, 2022, 167(1): 267-270.
- [30] Webster C L, Waldron F M, Robertson S, *et al.* The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS Biology*, 2015, 13(7): e1002210.

Molecular identification and analysis of a novel picorna-like virus

QI Yuhua¹, GAO Jie¹, REN Pengpeng², YE Zhuangxin², LI Yuanning³,
SUN Lei¹, LI Junmin², WANG Xianwei^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Development and Regeneration, School of Life Sciences, Shandong University, Qingdao 266237, China;

2. State Key Laboratory for Quality and Safety of Agro-Products, Key Laboratory of Biotechnology in Plant Protection of MARA, Zhejiang Key Laboratory of Green Plant Protection, Institute of Plant Virology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

3. Institute of Marine Science and Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China)

Abstract: *Scylla paramamosain*, commonly known as the mud crab, is an economically important crustacean species. However, the diversity and molecular characteristics of RNA viruses infecting *S. paramamosain* remain largely unexplored. This study aimed to identify RNA viruses in *S. paramamosain* and to characterize the genomic features, phylogenetic position, and virus-derived small interfering RNA (vsiRNA) profiles of a newly discovered virus. In this study, high-throughput sequencing and de novo transcriptome assembly were performed on *S. paramamosain* collected from a market in Zhejiang, China. Among the assembled contigs, three RNA viruses were identified, including two previously reported viruses (a reovirus and a toti-like virus), as well as a novel picorna-like virus designated *Scylla paramamosain picorna-like virus 1* (SpPLV1). The complete genome was obtained by RT-PCR, rapid amplification of cDNA ends (RACE), and Sanger sequencing. Bioinformatic analyses were conducted for open reading frame prediction, conserved domain annotation, and phylogenetic reconstruction. Small RNA sequencing was further performed to analyze the length distribution and strand bias of vsiRNAs. The complete genome of SpPLV1 is 9 596 nucleotides in length and contains two open reading frames (ORFs), encoding conserved structural and non-structural domains characteristic of the order Picornavirales. Mapping coverage analysis showed a higher accumulation of viral reads in the 3' region, particularly within ORF2, suggesting active transcription or replication. Phylogenetic analysis based on the RNA-dependent RNA polymerase domain revealed that SpPLV1 clusters with Wenzhou picorna-like viruses 6 and 7, forming an unclassified group closely related to the family Marnaviridae. Small RNA analysis revealed that 125 720 and 226 399 vsiRNAs were derived from the toti-like virus and the reovirus, respectively, with a predominant length of 22 nt and balanced sense and antisense strand distribution. In contrast, only 44 small RNAs were mapped to SpPLV1, without a clear length peak or strand bias. SpPLV1 represents a novel picorna-like virus identified in *S. paramamosain*, exhibiting typical genomic features of the order Picornavirales and forming a distinct lineage closely related to members of the family Marnaviridae. The identification of SpPLV1 provides new insights into the RNA virome of *S. paramamosain* and highlights the need for further studies on its potential role in host-virus interactions.

Key words: *Scylla paramamosain*; picorna-like virus; virus discovery; metagenomic sequencing; sRNA sequencing

Corresponding author: WANG Xianwei. E-mail: wangxianwei@sdu.edu.cn

Funding projects: National Nature Science Foundation of China (32525058)