



## 茉莉 C 病毒侵染性克隆的构建及 CP 基序分析

朱丽娟<sup>1#</sup>, 张崇涛<sup>2#</sup>, 白雅妮<sup>1</sup>, 陈梓茵<sup>2</sup>, 解晓盈<sup>1</sup>, 韩艳红<sup>1\*</sup>

1 福建农林大学植物保护学院媒介病毒研究中心, 福建 福州 350002

2 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

朱丽娟, 张崇涛, 白雅妮, 陈梓茵, 解晓盈, 韩艳红. 茉莉 C 病毒侵染性克隆的构建及 CP 基序分析. 微生物学报, 2022, 62(10): 3813–3824.

Zhu Lijuan, Zhang Chongtao, Bai Yani, Chen Ziyin, Xie Xiaoying, Han Yanhong. Infectious clone construction of Jasmine virus C and motif analysis of CP. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 3813–3824.

**摘要:**【目的】构建茉莉 C 病毒(JaVC)福建分离物基因组全长 cDNA 侵染性克隆, 克隆 9 省 JaVC 分离物的 CP 基因并比较分析基序差异, 调查 JaVC 在我国茉莉产区的分布和传播情况。

【方法】提取 JaVC 检测呈阳性的茉莉叶片总 RNA, 以反转录后的 cDNA 为模板扩增获得 JaVC 基因组全长序列并构建全长 cDNA 克隆 pXT-JaVC-FJ; 同时构建了外壳蛋白(coat protein, CP)融合红色荧光蛋白 mCherry 的克隆(pXT-JaVC CP-mCherry)。利用农杆菌浸润法侵染本生烟, 通过 RT-PCR 检测法和激光共聚焦扫描显微镜观察法验证 JaVC 侵染性。克隆其他 8 省 JaVC 分离物的 3'末端包含 CP 的片段并测序分析 CP 基序差异。通过田间调查明确 JaVC 在茉莉上的发生情况和其传播介体。【结果】pXT-JaVC-FJ 浸润本生烟可引起系统侵染, 说明该克隆具有侵染活性。所有 JaVC 分离物的 CP 均编码 296 个氨基酸, JaVC 中国台湾分离物的 CP 与各分离物核苷酸序列相似性为 82.27%–91.36%, 与广东分离物相似性最高; 氨基酸序列相似性为 92.23%–96.82%, 与云南分离物相似性最高; 各分离物 CP 的氨基酸序列在 32–35 位点上差异显著, 具有 6 种不同的氨基酸基序排列, 分别为 SEHA、GENA、REGT、SENA、GGDA 和 GGNA。田间调查显示, JaVC 在中国茉莉植株上广泛分布且可在蓟马中检测到 JaVC。【结论】成功构建了 JaVC-FJ 的侵染性克隆, 这为该病毒的基因功能、致病机理等研究奠定了基础; 通过我国茉

**基金项目:** 福建省自然科学基金(2017J01600); 国家自然科学基金(31900153)

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2017J01600) and by the National Natural Science Foundation of China (31900153)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: yan-hong@fafu.edu.cn

Received: 17 February 2022; Revised: 9 April 2022; Published online: 6 June 2022

茉莉产区 JaVC 的发生及变异情况分析, 为 JaVC 引起的病毒病的防治提供了理论依据。

**关键词:** 茉莉 C 病毒; 外壳蛋白; 侵染性 cDNA 克隆

## Infectious clone construction of jasmine virus C and motif analysis of CP

ZHU Lijuan<sup>1#</sup>, ZHANG Chongtao<sup>2#</sup>, BAI Yani<sup>1</sup>, CHEN Ziyin<sup>2</sup>, XIE Xiaoying<sup>1</sup>, HAN Yanhong<sup>1\*</sup>

1 Vector-Borne Virus Research Center, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** [Objective] The full-length cDNA infectious clone of jasmine virus C (JaVC), from Fujian Province was constructed. Coat protein (CP) genes of JaVC isolates from 9 provinces/autonomous regions in China were cloned and the motif difference was analyzed. Thereby, the distribution and transmission of JaVC in jasmine producing areas in China were investigated. [Methods] Total RNA of jasmine leaves which tested positive for JaVC was extracted and then reverse-transcribed to cDNA. The cDNA was then used as template for amplification to obtain the full-length genome sequence of JaVC, followed by the construction of full-length cDNA clone pXT-JaVC-FJ and the CP-fused red fluorescent protein mCherry clone pXT-JaVC CP-mCherry. Both of them were then transformed into *Agrobacterium tumefaciens* for *Nicotiana benthamiana* infiltration and verified through RT-PCR and confocal laser scanning electron microscopy. Samples collected from eight other provinces/autonomous regions of China positive for JaVC were then used for cloning and sequencing of the 3' end containing CP. Field investigation was conducted to identify the occurrence and transmission vector of JaVC. [Results] pXT-JaVC-FJ induced systemic infection on *N. benthamiana* by agro-infiltration, which demonstrated that it was biologically active. CPs of all isolates encoded 296 amino acids. The CP of isolate from Taiwan of China shared 82.27%–91.36% nucleotide sequences and 92.23%–96.82% amino acid sequences with those of isolates from the 9 provinces/autonomous regions. It showed the highest similarity to that from Guangdong and Yunnan Province at nucleotide level and amino acid level, respectively. The CP from different isolates mainly showed difference at aa 32–35 and six motif arrangements of SEHA, GENA, REGT, SENA, GGDA, and GGNA were identified. Field investigation suggested that JaVC was widely distributed on jasmine plants and could be detected in thrips. [Conclusion] An infectious clone of JaVC-FJ is developed, which lays a foundation for the study of gene function and pathogenic mechanism of JaVC. The analysis of occurrence and variation of JaVC in indifferent jasmine producing areas in China is helpful for the prevention and control of JaVC diseases.

**Keywords:** jasmine virus C; coat protein; infectious cDNA clone

茉莉 [*Jasminum sambac* (L.) Aiton] 属于木犀科 (*Oleaceae*) 素馨属 (*Jasminum*), 广泛植栽于亚热带地区, 其价值功效多样, 不仅可以观赏, 还可用来制作茉莉花茶、提炼精油、药用和食

用等<sup>[1-2]</sup>,但茉莉的生长常受到多种病原物的侵害<sup>[3-9]</sup>,尤其普遍受到多种病毒的复合侵染。茉莉 C 病毒(jasmine virus C, JaVC)是一种香石竹潜隐病毒属(*Carlavirus*)病毒,该病毒首次在中国台湾报道(JaVC-TW)<sup>[3]</sup>,后在意大利黄色花叶症状的素方花(*J. officinale*)中也发现了该病毒(JaVC-Bari)<sup>[4]</sup>。茉莉 C 病毒通常与茉莉 T 病毒(jasmine virus T, JaVT)<sup>[5-7]</sup>和茉莉 H 病毒(jasmine virus H, JaVH)<sup>[8-9]</sup>复合侵染茉莉,引发茉莉叶片黄化嵌纹病症,对茉莉的产量和质量造成巨大威胁<sup>[8]</sup>。JaVC 是一种正单链 RNA 病毒,基因组由 8 490 个核苷酸组成,含有 5'帽子和 3'多聚腺苷酸尾巴结构,基因组编码 6 个开放阅读框(open reading frames, ORFs),5'和 3'非编码区(untranslated region, UTR)分别由 71 和 72 个核苷酸组成。ORF1 编码复制相关蛋白;ORF2-4 编码一个三重基因块运动蛋白,参与病毒的细胞间运动以及长距离运动;ORF5 编码一个参与包装病毒粒子的外壳蛋白(coat protein, CP);ORF6 编码一个富含半胱氨酸的蛋白,功能上认为是一个 RNA 沉默抑制子<sup>[10]</sup>。

近年来,通过各种不同的策略,越来越多正链或负链 RNA 病毒的侵染性互补 DNA (complementary DNA, cDNA)克隆被构建,并广泛应用于分子生物学、致病机理以及宿主-病毒-介体之间相互作用的研究<sup>[11-14]</sup>。此外,利用 cDNA 克隆系统还成功构建了病毒诱导的基因沉默载体和基于病毒的表达载体<sup>[15-16]</sup>,侵染性克隆的构建推动了动植物病毒研究的快速发展<sup>[17-20]</sup>。

大多数植物病毒通过介体昆虫、螨类、线虫、菟丝子和真菌等在植物寄主个体间传播<sup>[21]</sup>,最主要的传播介体是昆虫<sup>[22]</sup>。研究报道约 80%植物病毒是由昆虫介体分别以非持久性、半持久性和持久性方式进行传播。蚜虫、粉虱、叶蝉、

飞虱、蓟马和木虱等昆虫是植物病毒病的主要传播介体<sup>[23]</sup>。

本研究首次克隆了 JaVC 福建分离物基因组全长并构建其侵染性 cDNA 克隆 pXT-JaVC-FJ。基于 pXT-JaVC-FJ 构建了 CP 融合表达红色荧光蛋白 mCherry 的 pXT-JaVC CP-mCherry,利于更直观地观察病毒在宿主体内的分布。为了明确我国其他茉莉产区 JaVC 的发生及变异情况,克隆了包括四川、云南、广西、湖南、广东、福建、江苏、山东和吉林共 9 个地区茉莉叶片中 JaVC 的 CP,分析比对与中国台湾 JaVC CP 的差异,明确不同地区 JaVC 的分子变异情况。通过对田间茉莉病毒病的调查,摸清 JaVC 的普遍性和危害性,寻找传播介体和最可能的传播方式。目前,关于茉莉 C 病毒的研究报道较少,仅有中国台湾分离物(NC\_030926.1)和意大利巴里分离物(OL828237.1)的序列被报道,本文对 JaVC 的研究为更好地了解该病毒的分子特征以及进化关系提供了理论基础,对进一步研究其致病机制和载体改造具有重大意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料、载体和菌株

2016 年夏从福建福州、广东普宁、广西横县、江苏宿迁、吉林长春、湖南长沙、四川犍为、云南元江以及山东青州 9 个地区采摘获得茉莉样品(每个省至少 3 棵以上,混合)。本生烟(*Nicotiana benthamiana*)种子由福建农林大学媒介病毒研究中心实验室(以下简称本实验室)保存,培养条件:温度(24±1) °C,光照 16 h,黑暗 8 h,湿度 50%。二元表达载体 pXT 由南京农业大学陶小荣教授惠赠<sup>[24]</sup>;含 mCherry 基因的质粒由福建农林大学陈栩教授提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 由本实验保存。

## 1.2 试剂与引物

克隆载体 pTOPO-Blunt Simple 购自艾德莱生物公司; 2×Taq PCR Master Mix 购自 BBI Life Sciences 公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; DNA marker、EasyScript® Reverse Transcriptase 反转录酶购自 TransGen Biotech 公司; 高保真酶 Phusion® High-Fidelity PCR Kit、Gibson Assmby Master Mix 购自 NEW ENGLAND BioLabs (NEB)公司。本研究引物均由福建铂尚生物技术公司合成, 检测及扩增 JaVC 全长的引物设计基于 GenBank 登录号为 NC\_030926.1 的序列(JaVC-TW), JaVH 检测引物 JaVH360F

和 800R 基于 NC\_055545.1, JaVT 检测引物 JaVT9234F 和 9510R 基于 NC\_029051.1 (表 1)。

## 1.3 获得 JaVC-FJ 全基因组序列并构建其侵染性克隆

根据 GenBank 登录号为 NC\_030926.1 的序列设计引物, 利用引物对 Carla8198F/Carla3R 对福州黄化嵌纹病症的茉莉叶片进行 JaVC 的检测, 并以检测阳性的茉莉叶片 RNA 为模板扩增 JaVC 全长。由于 JaVC 病毒较长, 难以一次性扩增到全长, 将 JaVC 福建分离物全基因组分为 3 个片段进行扩增, 相邻片段之间有部分重叠序列。首先, 利用热酚法提取福建茉莉病叶总 RNA, 以此 RNA 为模板, 分别加入 3 个片

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Note
Carla8198F	CGTAGGGCCATGTGTGAATAA	Detection of JaVC
Carla3R	GCGGAAAAATAGTTAAAACAC	Detection of JaVC
JC001F	GATAAACATACTATACCTCATTATAACGC	Full-length cDNA clone
JC3903R	TCGCAGTCATAGTCACTTTGGC	Full-length cDNA clone
JC3881F	GCCAAAGTGACTATGACTGCGA	Full-length cDNA clone
JC6686R	TCAGGAGGTGGTGTAAAGTGGC	Full-length cDNA clone
JC6668F	CCAGATGCCACTTACACCACCTC	Full-length cDNA clone
XTJC001F	CATTTTCATTTGGAGAGGGATAAACATACTATACCTCATTATAACGC	Full-length cDNA clone
XTCarla3R	GCCATGCCGACCCGGGGCGGAAAAATAGTTAAAACAC	Full-length cDNA clone
XTmC-F	TTCATTTGGAGAGGATGGTGTGAGCAAGGGCGC	PCR amplification
XTmC-R	CCATGCCGACCCGGGGATCTTACTTGTACA	PCR amplification
JC4476F	CGCATAGGGAAGGATGAGGG	PCR amplification
JC8086F	GGAATTTGAAACGAGGGGGCCCATATCTAGATGAGGTACGAGCTTGAAGT	PCR amplification
JC8085R	TCTTTCGATTTCCGGCCCCGATGTGGCC	PCR amplification
mCL-F	GGAATTTGAAACGAGGGGGCCCTAGTTGTAGTAGTCCTAGTCCTATGGTGA GCAAGGGCGAGGAG	PCR amplification
mCL-R	TACTTCAAGCTCGTACCTCATCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGC	PCR amplification
XTJcmC-F	CAGAGTCTGATTATGAGGCCTTTGATTCGTCACAGGACC	PCR amplification
XTJcmC-R	ATGCCATGCCGACCCGGGGCGGAAAAATAGTTAAAACAC	PCR amplification
Car2	ATGAGTTCCACATCGGATGAC	PCR amplification
JaVH360F	GCTGATGCCAAGAACCACTTTG	Detection of JaVH
JaVH800R	ACGAGATTCAGTTACCCAAT	Detection of JaVH
JaVT9234F	AGGACACGGAGAGACATACA	Detection of JaVT
JaVT9510R	CGAAAGCATAACGAGGTTCC	Detection of JaVT

段的 3'端下游引物反转录,各自合成 3 个片段的第一链 cDNA。然后,以 cDNA 为模板,利用引物对 JC001F/JC3903R、JC3881F/JC6686R 和 JC6668F/Carla3R 扩增获得 3 个 DNA 片段 A1、A2 和 A3,产物经胶回收纯化后,分别克隆至 pTOPO-Blunt 载体获得重组质粒 pTOPO-A1、pTOPO-A2 和 pTOPO-A3,经测序拼接获得 JaVC-FJ 全基因组序列并提交至 GenBank (序列号见表 2)。在 A1 的 5'端和 A3 的 3'端加入部分 pXT 载体序列,设计特异性引物 XTJC001F 和 XTCarla3R。以重组质粒 pTOPO-A1、pTOPO-A2 和 pTOPO-A3 为模板,扩增片段 XTA1、A2 和 XTA3,将纯化的目的片段采用无缝克隆的方法构建至经 *Stu* I 和 *Bam*H I 线性化的 pXT 载体上,获得重组质粒 pXT-JaVC-FJ,测序正确。

#### 1.4 农杆菌浸润(agro-infiltration)本生烟

将上述重组质粒 pXT-JaVC-FJ 转化农杆菌 GV3101,筛选阳性克隆摇菌浸润本生烟<sup>[14]</sup>。首先挑取含质粒 pXT-JaVC-FJ 农杆菌单菌落于含有卡那(kanamycin, Kan)和利福平(rifampicin, Rif)双抗性的液体培养基(LB),28 °C 过夜培养活化;次日将活化菌液以 1:100 接种于额外添加有 2-(N-吗啉基)乙磺酸(2-N-morpholino ethanesulfonic

acid, MES)和乙酰丁香酮(acetosyringone, As)的双抗性液体 LB,28 °C 培养至  $OD_{600}$  0.6–1.0;将菌液在室温条件下 3 500 r/min 离心 5 min,弃上清;菌体沉淀中加入适量农杆菌重悬缓冲液,悬浮菌体后,调节  $OD_{600}$  至 0.6–0.8,室温避光静置 4 h 以上。最后使用 1 mL 无菌注射器,吸取混合浸润液,去掉针头后将注射器轻轻抵住叶片背面,稍用力但不使叶片破损,缓慢注射,尽量将叶片注满浸润液,一片叶尽量少于 2 个针孔,减少对叶片的伤害。

#### 1.5 融合红色荧光蛋白(mCherry) JaVC-FJ 侵染性克隆的构建

首先以含 mCherry 质粒为模板,用引物对 XTmC-F/XTmC-R 扩增目的片段,扩增产物经胶回收后连接至经 *Stu* I 和 *Bam*H I 线性化的 pXT 载体,转化大肠杆菌 JM109,菌落聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)筛选阳性克隆获得重组质粒 pXT-mCherry,作为阳性对照。以重组质粒 pXT-JaVC-FJ 为模板,用引物对 JC4476F/XTCarla3R 扩增 3'末端包含 CP 全长的目的片段,将扩增产物胶回收后连至 pTOPO 载体获得重组质粒 pTOPO-CP,以该质粒为模板,利用引物对 JC8086F/JC8085R 进行反向 PCR,在 CP 末端加入 *Apa* I 和 *Xba* I 酶切位点,产生重组质粒 pTOPO-CP-M。随后以该质粒为模板,利用引物对 JC4476F/XTCarla3R 扩增获得目的片段,将 PCR 产物经 *Stu* I 和 *Sma* I 酶切后纯化回收,与经相同酶线性化的 pXT 载体连接,得到阳性克隆 pXT-CP-M。以 mCherry DNA 为模板,利用引物对 mCL-F/mCL-R 扩增获得含有多肽链 DGGPSCSSPSP (linker)的 mCherry 片段,将其纯化回收后与经 *Apa* I 和 *Xba* I 线性化的 pXT-CP-M 载体连接,得到阳性克隆 pXT-CP-mCherry。最后用 CP-mCherry 融合基因替换 JaVC cDNA 中的 CP 片段,以

表 2 本研究提交至 GenBank 的序列登录号

Table 2 GenBank accession numbers submitted in this study

Isolate	Length/bp	GenBank No.
JaVC-FJ	8 487	MH231174
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> FJ	1 276	MH389787
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> GD	1 276	MH389788
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> GX	1 275	MH389789
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> HN	1 275	MH389790
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> JL	1 276	MH389791
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> JS	1 275	MH389792
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> SC	1 276	MH389793
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> SD	1 275	MH389794
JaVC-CP <sup>3'utr+</sup> YN	1 275	MH389795

pXT-CP-mCherry 质粒为模板, 利用引物对 XTJcM-C-F/XTJcM-C-R 进行扩增, PCR 产物经 *Stu* I 和 *Sma* I 酶切后纯化回收与经相同酶线性化的 pXT-JaVC-FJ 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 随后进行菌落 PCR 鉴定获得阳性质粒 pXT-JaVC CP-mCherry (图 1)。

将构建成功的 pXT-mCherry、pXT-CP-mCherry 和 pXT-JaVC CP-mCherry 3 个重组质粒转入农杆菌 GV3101, 挑取阳性克隆摇菌浸润本生烟, 空载体 pXT 作为阴性对照(EV), pXT-mCherry 作为阳性对照。从浸润 2 d 后开始取样, 之后每隔 2 d 取浸润叶制片, 在激光共聚焦显微镜下倒置观察细胞内荧光发光情况。

### 1.6 JaVC 九个省分离物 CP 基因的克隆

采用热酚法<sup>[25]</sup>提取各省茉莉叶片总 RNA, 利用引物对 Carla8198F/Carla3R 通过 RT-PCR 检测叶片是否含有 JaVC, 以 JaVC 检测呈阳性样品的 RNA 为模板, 3'端特异性引物 Carla3R 通过反转录(reverse transcription, RT)合成第一链 cDNA, 再以引物对 Car2/Carla3R 进行 PCR 扩

增, 回收纯化 PCR 产物(CP3'utr+)克隆至 pTOPO-Blunt 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 经菌落 PCR 鉴定筛选阳性克隆获得重组质粒 pTOPO-CP3'utr+-FJ (GD/GX/HN/JS/JL/SC/SD/YN), 送至福州铂尚生物有限公司测序分析并提交至 GenBank (序列号见表 2)。

### 1.7 福州茉莉产区的田间调查

2017 年 11 月对福州市永泰县梧桐镇春光村、椿阳村和坂埕村的茉莉种植基地进行田间调查并采集样品, 每个村随机采样 15 份, 共计 45 份叶片, 采用热酚法提取样品总 RNA 进行反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)鉴定病毒发生情况。田间调查时发现每个村的茉莉叶片上均有大量蓟马和白粉虱存在, 捕获春光村的蓟马和白粉虱进行 JaVC 以及已报道的另两种病毒 JaVH 和 JaVT 的检测, 约每 10 只为 1 组, 加 1 mL TRIzol 提取总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 为模板, 以随机引物进行反转录, 随后取 1 μL 的 cDNA 用特异性检测引物进行 30 个循环多重 PCR 检测。

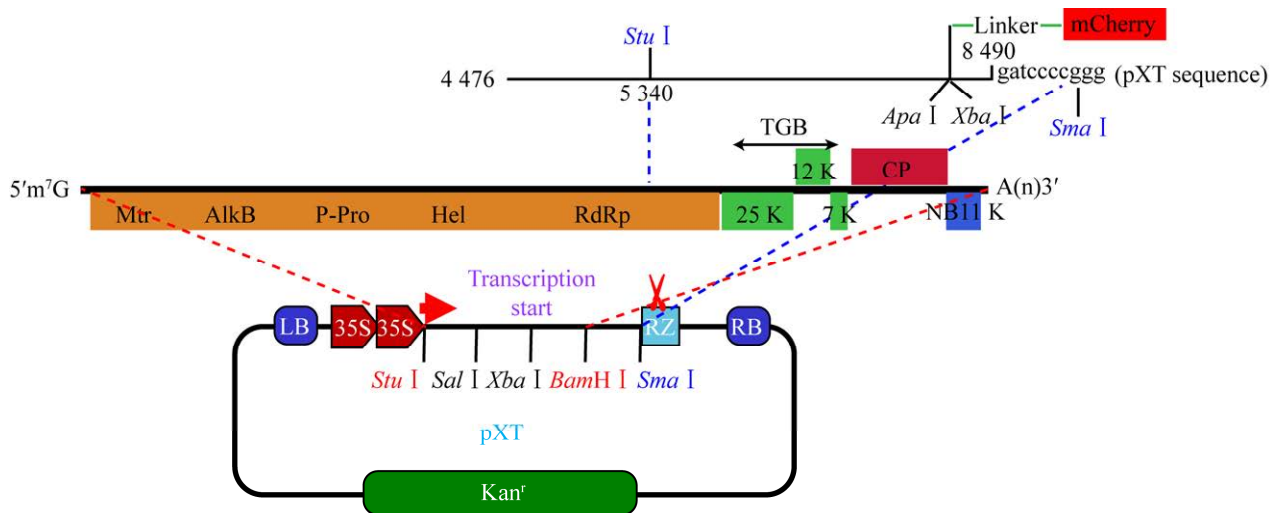


图 1 pXT-JaVC CP-mCherry 重组质粒构建策略

Figure 1 Strategy of recombinant plasmid pXT-JaVC CP-mCherry.

## 2 结果与分析

### 2.1 JaVC-FJ 全基因组序列的确定

由于 JaVC 病毒大于 8 kb, 一次性扩增全长序列较困难, 故采用分段扩增策略获得基因组全长, 将 JaVC-FJ 全基因组分为 3 个片段进行扩增, 相邻片段之间有部分重叠序列。经 RT-PCR 扩增获得 3 个目的片段 A1、A2 和 A3, 大小分别为 3 909、2 809 和 1 818 bp, 如图 2 所示。将扩增产物经胶回收纯化后, 分别克隆至 pTOPO-Blunt 载体获得重组质粒 pTOPO-A1、pTOPO-A2 和 pTOPO-A3, 每个片段挑取至少 3 个阳性克隆进行测序, 结果通过 DNAMAN 10.0 软件进行分析对比, 保证相同片段每个克隆间的相似性大于 99%, 并利用 DNAMAN 软件对其进行拼接, 得到全长为 8 487 nt 的序列。将该序列与 JaVC-TW 进行相似性比较分析, 结果表明两者核苷酸序列相似性为 88.5%, 将该分离物命名为 JaVC-FJ。

### 2.2 pXT-JaVC-FJ 侵染性的鉴定

将 JaVC-FJ 基因组 cDNA 全长构建在含 35S 启动子的双元载体 pXT 上进而获得重组克隆 pXT-JaVC-FJ, 将其转化农杆菌 GV3101, 获得含 pXT-JaVC-FJ 质粒的农杆菌。利用农杆菌浸润的方法侵染本生烟, 浸润第 3 天, 在侵染叶和系统叶上都未发现明显症状。浸润第 5 天,

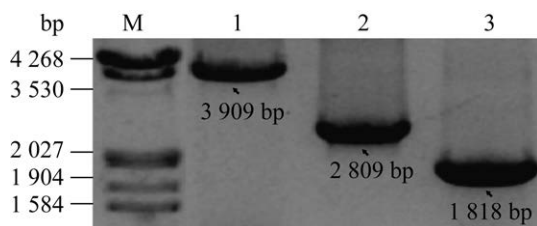


图 2 JaVC 基因组全长 3 个片段扩增的结果  
Figure 2 Agarose gel electrophoresis of three amplification products of JaVC. M: marker; lane 1: A1; lane 2: A2; lane 3: A3.

经 RT-PCR 检测, 侵染叶和系统叶均可以检测出 289 bp 的 JaVC 特异性片段(图 3), 说明构建的 pXT-JaVC-FJ 具有侵染性, 能成功系统侵染本生烟。对系统叶进行病毒序列的再测定, 发现与侵染性克隆序列一致, 并无变异情况的发生。

将重组质粒 pXT-mCherry、pXT-CP-mCherry 和 pXT-JaVC CP-mCherry 分别转化农杆菌 GV3101 并侵染本生烟, pXT-mCherry 作为阳性对照, 空载体 pXT 作为阴性对照(EV)。侵染 2 d 后取浸润叶制片, 在激光共聚焦显微镜下倒置观察发现 EV 不表达荧光, 而 3 种插入红色荧光基因 mCherry 的质粒均能够在本生烟细胞内表达, 如图 4 所示, 且 CP 可能定位于胞间连丝。后期观察了 pXT-JaVC CP-mCherry 的系统叶, 却并未看到与浸润叶类似的荧光。RT-PCR 鉴定系统叶可检测到病毒, 却检测不到 mCherry 基因序列。

### 2.3 JaVC 九个省分离物 CP 基因的克隆

热酚法提取 9 个省茉莉叶片总 RNA, 经 RT-PCR 检测发现所有样品均含有 JaVC (结果未显示)。利用引物对 Car2/Carla3R 经 RT-PCR 扩增获得每个省分离物 CP3<sup>mut</sup> 序列, 大小约 1 200 bp (图 5), PCR 产物经回收纯化后, 克隆到 pTOPO

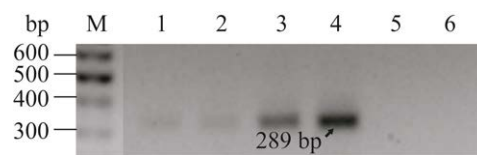


图 3 JaVC-FJ 侵染性的 RT-PCR 检测

Figure 3 RT-PCR detection of JaVC-FJ infection. M: marker; lane 1-2: agro-infiltrated leaves; lane 3-4: systemic leaves; lane 5: PCR detection of total RNA from agro-infiltrated leaves with genomic DNA removal as control to eliminate plasmid contamination from agrobacterium; lane 6: negative control.

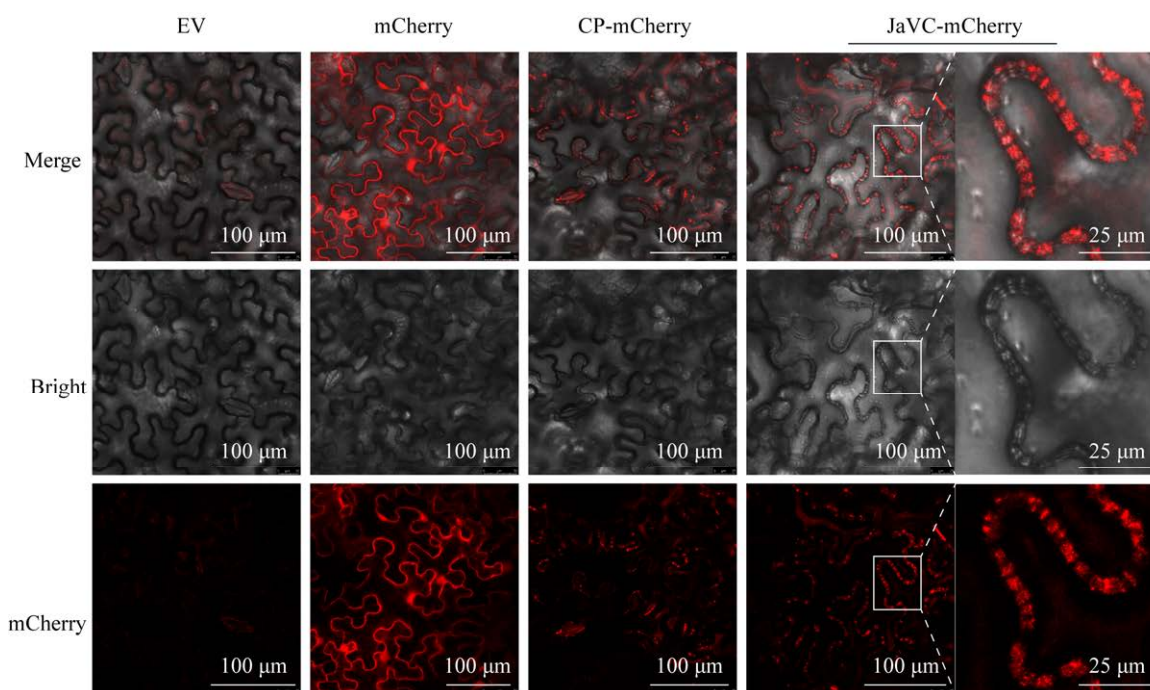


图 4 红色荧光蛋白 mCherry 在烟草中的表达情况

Figure 4 Expression of red fluorescent protein mCherry in *N. benthamiana*. 100/25  $\mu\text{m}$ : scale bar; white square: a partial zoomed-in view of this part.

载体上, 获得重组质粒分别命名为 pTOPO-JaVC-CP3<sup>utr+</sup>-FJ (GD/GX/HN/JS/JL/SC/SD/YN)。

#### 2.4 JaVC 分离物 CP 序列分析

使用 DNAMAN 10.0 软件拼接获得 9 个省 CP 基因, 测序结果表明 CP 基因全长均为 891 bp, 编码 296 个氨基酸。将其与 JaVC 中国台湾分离物的 CP 基因序列进行对比, 核苷酸和氨基酸序列的相似性分别为 82.27%–91.36% 和

92.23%–96.82%, 核苷酸序列与广东相似性最高, 氨基酸序列与云南相似性最高。具体见表 3。

利用 MEGA-X<sup>[26]</sup> 将 JaVC 所有已知分离物 CP 氨基酸进一步比对, 发现在 32–35 位点上的氨基酸序列差异很大, 具体如图 6 所示。

中国各分离物这 4 个位点的氨基酸排列方式共有 6 种, 分别是 SEHA (中国台湾)、GENA (福建和广东)、REGT (广西、湖南、江苏和山东)、SENA (吉林)、GGDA (四川) 和 GGNA (云南), 其中按 REGT 顺序排列的省最多。意大利巴里分离物与中国各省分离物的主要差异也集中在 32–35 基序区, 为 NAGA (巴里)。

为了进一步研究 JaVC 分离物 CP 之间的系统进化关系, 利用 MEGA X 中的最大似然法构建系统进化树, 其中 bootstrap method 循环数为 1 000 次, 小于 50% 的节点被隐藏。CP 基因的核苷酸系统进化树(图 7A)将其分为 3 组, 中国

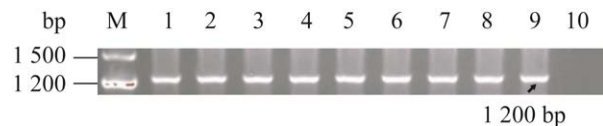


图 5 JaVC 九个省分离物 CP<sup>3utr+</sup> 的 PCR 扩增

Figure 5 PCR amplification of CP<sup>3utr+</sup> from nine provinces. M: marker; lane 1: Fujian; lane 2: Guangdong; lane 3: Guangxi; lane 4: Hunan; lane 5: Jilin; lane 6: Jiangsu; lane 7: Sichuan; lane 8: Shandong; lane 9: Yunnan; lane 10: negative control.



表 3 JaVC 九个省分离物 CP 基因与中国台湾核苷酸序列和氨基酸序列相似性比较

Table 3 Comparison of nucleotide and amino acid sequences between Taiwan of China and isolates from nine other provinces

Isolate	FJ	GD	GX	HN	JL	JS	SC	SD	YN
Nucleotide/%	87.77	91.36	82.38	82.27	87.21	82.60	87.32	82.60	86.87
Amino acid/%	95.61	96.28	92.23	92.23	95.95	92.23	95.95	92.23	96.82

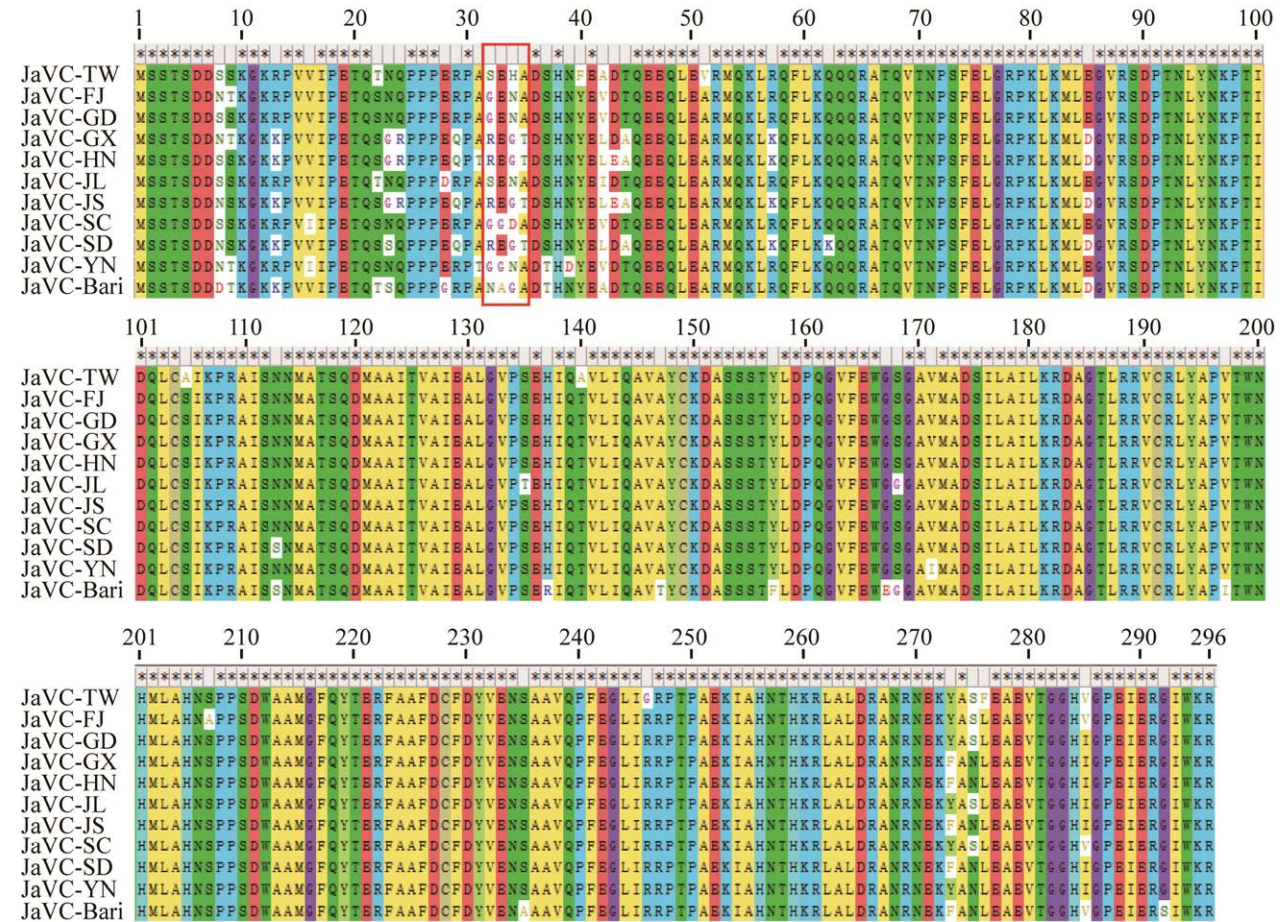


图 6 中国台湾分离物与 10 个分离物 CP 的氨基酸比对

Figure 6 Amino acids alignments of coat protein between Taiwan of China and other known isolates. Red square: amino acid at residue 32–35.

台湾、广东、四川、福建、吉林、云南一组，山东、广西、湖南、江苏一组，意大利巴里一组，氨基酸系统进化树(图 7B)将其分为 2 组，第一组为中国台湾、广东、四川、福建、吉林、云南，第二组为山东、广西、湖南、江苏、意大利巴里。

### 2.5 JaVC 田间调查

通过对来自永泰县梧桐镇 3 个村子的 45 份茉莉叶片样品 JaVC、JaVT 和 JaVH 三种病毒的 RT-PCR 检测，统计发现田间取样的 45 份样品中均同时携带有 3 种病毒，3 种病毒的发生率为 100% (表 4)。

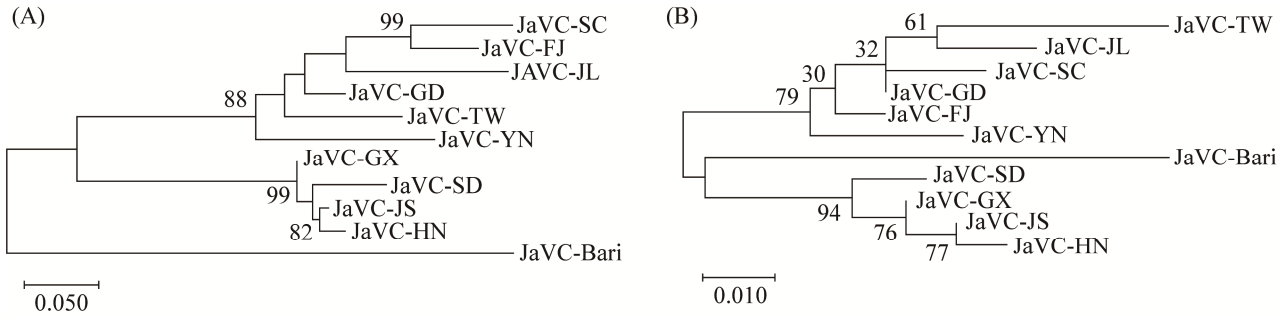


图 7 JaVC 十一个分离物 CP 核苷酸(A)和氨基酸(B)序列的系统进化树

Figure 7 Phylogenetic tree analysis on complete nucleotide (A) and amino acid (B) sequences of eleven isolates of JaVC CP.

表 4 统计 45 份样品 3 种病毒的感染情况

Table 4 To count the infection of three viruses in 45 samples

Samples	JaVT	JaVC	JaVH
Village of Chuanguan (1–15)	+	+	+
Village of Chuanyang (1–15)	+	+	+
Village of Bancheng (1–15)	+	+	+

同时对茉莉上蓟马和白粉虱进行了 3 种病毒的 RT-PCR 检测, 结果表明, 在蓟马中可以检测到 JaVC 和 JaVT 两种病毒的存在, 在白粉虱中只能检测到 JaVT 病毒, JaVT 和 JaVC 特异条带大小分别是 186 bp 和 289 bp (图 8)。

### 3 讨论

本研究将 JaVC 全基因组克隆到含花椰菜花叶病毒双 35S 启动子的 pXT 双元载体而获得

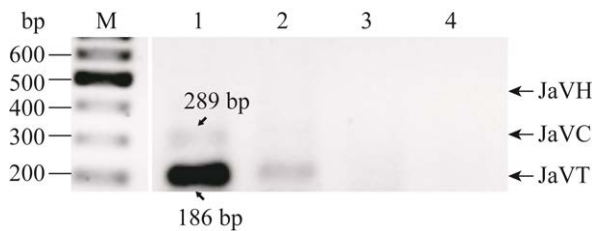


图 8 检测蓟马和白粉虱中 3 种病毒感染情况

Figure 8 Detection of three virus infections in thrips and whiteflies. M: marker; lane 1: thrips; lane 2: whiteflies; lane 3: negative control of thrips; lane 4: negative control of whiteflies.

侵染性克隆 pXT-JaVC-FJ, 并在其基础上获得融合了红色荧光蛋白的 pXT-JaVC-mCherry 克隆。通过农杆菌浸润的方法, 将构建的 pXT-JaVC 以及 pXT-JaVC CP-mCherry 克隆侵染本生烟, 侵染第 5 天时, 本生烟的浸润叶和系统叶均可检测到 JaVC 的基因组且侵染率达到 100%。侵染第 2 天时, 在激光扫描显微镜下, 可以在侵染叶上观察到红色荧光蛋白, 同时 RT-PCR 可以检测到 JaVC 和 mCherry 的基因片段, 2 个实验结果共同说明了 JaVC 在烟草中成功表达且具有侵染性。在激光共聚焦显微镜下未观察到系统叶上红色荧光蛋白的表达, RT-PCR 也只能检测到 JaVC, 检测不到 mCherry, 猜测在病毒复制过程中, 与 JaVC 相连的 mCherry 基因发生了丢失。多肽链的长短对融合蛋白的表达和稳定性均有一定的影响<sup>[27]</sup>, 多肽链长度不够可导致红色荧光蛋白在病毒运动的过程中出现不稳定表达。本研究首次成功构建了 JaVC-FJ 的侵染性克隆, 为该病毒的基因功能、致病分子机理等研究奠定了基础, 进而为利用基因工程手段进行茉莉上的抗病育种提供了理论依据。

来自 9 个不同省的茉莉叶片均能检测到 JaVC 的存在, 以及来自福州永泰县梧桐镇 3 个村子的 45 份茉莉叶片样品均同时携带有 JaVC、JaVT 和 JaVH 三种病毒, 说明 JaVC 在中国的

茉莉植株上广泛分布且通常与 JaVT 和 JaVH 复合感染茉莉。无论是在核苷酸还是在氨基酸水平上, 9 个不同省病毒的 CP 都与 JaVC-TW 表现出较高的同源性, 说明各分离物之间分子差异较小, 该病毒尚处于进化的初期, 还未出现明显的变异, 由此减小了对 JaVC 致病机制研究的困难, 有助于实现病毒的预防和控制。11 个 JaVC CP 的核苷酸序列在 32–35 位点的相似性很低, 共有 7 种不同的氨基酸序列排列, 推测在该范围发生基因变异的可能性较高, 这可能与长期地理隔离有关。并且值得注意的是, 氨基酸序列按 REGT 顺序排列的省最多, 包括广西、湖南、江苏和山东 4 个地区, 与进化树分析后的分组情况一致, 这说明了该范围的氨基酸序列极有可能是划分 JaVC 不同分离物的依据。另外该病毒外壳蛋白的氨基酸在 90–270 位点区间序列保守性很高, 这与 Martelli GP 等<sup>[28]</sup>发现香石竹潜隐病毒属的外壳蛋白在 160–260 位点具有保守氨基酸结构的结果相符合。根据进化树的结论, JaVC CP 分成 2 个分支群体, 其中中国台湾、广东、四川、福建、吉林、云南分为一组, 山东、广西、湖南、江苏为另一组。若从南北地理位置分析出发, 并未找到分组规律, 因此考虑到福建茉莉繁殖方式和病毒传播方式, 各种植地的茉莉自何处引种也是影响病毒分组的因素。

田间茉莉叶片上发现有大量蓟马和白粉虱的存在, 检测结果发现在蓟马中可以检测到 JaVC 和 JaVT 两种病毒的存在, 在白粉虱中只能检测到 JaVT 病毒, 可初步认为蓟马可传播 JaVC, 蓟马和白粉虱可传播 JaVT, 该研究可为茉莉病毒的防治奠定基础。但在田间调查过程中我们发现, 茉莉的自然结实率非常低, 据韦昌联等<sup>[29]</sup>报道, 茉莉的自然结实率平均只有 0.19%, 它的繁育方式常以扦插、分株和压条

等无性繁殖的方式为主。本实验室在福州永泰的茉莉基地中发现一颗茉莉种子, 播种培育后成功长出茉莉植株, RT-PCR 检测后发现该植株没有感染这 3 种病毒, 因此我们猜测茉莉上的病毒更可能以无性繁殖的方式进行传播。

## 参考文献

- [1] Wang HD, Qi XY, Chen SS, Feng J, Chen HJ, Qin ZY, Deng YM. An integrated transcriptomic and proteomic approach to dynamically study the mechanism of pollen-pistil interactions during jasmine crossing. *Journal of Proteomics*, 2021, 249: 104380.
- [2] Zhang YZ, Sun LL, Lai XF, Peng XJ, Wen S, Zhang ZB, Xie YZ, Li QH, Chen RH, Zheng X, Zhang K, Sun SL, Li DL. Gastroprotective effects of extract of *Jasminum grandiflorum* L. flower in HCl/EtOH-induced gastric mucosal ulceration mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 144: 112268.
- [3] 林毅忠. 感染茉莉花之一种新 carlavirus 之鉴定及其与黄化病征关系之探讨. 朝阳科技大学生化科技研究所的硕士学位论文, 2012.
- [4] Amoia SS, Minafra A, Nicoloso V, Loconsole G, Chiumenti M. A new jasmine virus C isolate identified by nanopore sequencing is associated to yellow mosaic symptoms of *Jasminum officinale* in Italy. *Plants*, 2022, 11(3): 309.
- [5] Tang YJ, Gao FL, Yang Z, Wu ZJ, Yang L. Complete genome analysis of jasmine virus T from *Jasminum sambac* in China. *Archives of Virology*, 2016, 161(7): 2033–2036.
- [6] 林宜清, 陈沧海, 张清安. 由茉莉花 (*Jasminum sambac*) 分离之一种新 *Potyvirus* 之特性研究. 植物病理学会刊, 2004, 13: 69–84.  
Lin YQ, Chen CH, Zhang QA. Characterization of a new *Potyvirus* isolated from jasmine (*Jasminum sambac* (L.) Ait) in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 2004, 13: 69–84. (in Chinese)
- [7] Sudheera Y, Vishnu Vardhan GP, Hema M, Krishna Reddy M, Sreenivasulu P. Characterization of a *Potyvirus* associated with yellow mosaic disease of jasmine (*Jasminum sambac* L.) in Andhra Pradesh, India. *Virusdisease*, 2014, 25(3): 394–397.
- [8] Zhuo T, Zhu LJ, Lu CC, Jiang CY, Chen ZY, Zhang GZ, Wang ZH, Jovel J, Han YH. Complete nucleotide sequence of jasmine virus H, a new member of the family *Tombusviridae*. *Archives of Virology*, 2018, 163(3): 731–735.

- [9] Dey KK, Leite M, Hu JS, Jordan R, Melzer MJ. Detection of jasmine virus H and characterization of a second *Pelarspovirus* infecting star jasmine (*Jasminum multiflorum*) and angelwing jasmine (*J. nitidum*) plants displaying virus-like symptoms. *Archives of Virology*, 2018, 163(11): 3051–3058.
- [10] Senshu H, Yamaji Y, Minato N, Shiraishi T, Maejima K, Hashimoto M, Miura C, Neriya Y, Namba S. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *Journal of Virology*, 2011, 85(19): 10269–10278.
- [11] Bordat A, Houvenaghel MC, German-Retana S. Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virology Journal*, 2015, 12: 89.
- [12] Balasuriya UBR, Zhang JQ, Go YY, MacLachlan NJ. Experiences with infectious cDNA clones of equine arteritis virus: lessons learned and insights gained. *Virology*, 2014, 462/463: 388–403.
- [13] Lomonosoff GP. So what have plant viruses ever done for virology and molecular biology? *Advances in Virus Research*, 2018, 100: 145–162.
- [14] Han YH, Xiang HY, Wang Q, Li YY, Wu WQ, Han CG, Li DW, Yu JL. Ring structure amino acids affect the suppressor activity of melon aphid-borne yellows virus P0 protein. *Virology*, 2010, 406(1): 21–27.
- [15] Liao JJ, Wang CH, Xing QJ, Li YP, Liu XF, Qi HY. Overexpression and VIGS system for functional gene validation in oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: PCTOC*, 2019, 137(2): 275–284.
- [16] Schachtsiek J, Hussain T, Azzouhri K, Kayser O, Stehle F. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Cannabis sativa* L. *Plant Methods*, 2019, 15: 157.
- [17] Qiao WJ, Falk BW. Efficient protein expression and virus-induced gene silencing in plants using a *Crinivirus*-derived vector. *Viruses*, 2018, 10(5): 216.
- [18] Hefferon K. Plant virus expression vectors: a powerhouse for global health. *Biomedicines*, 2017, 5(3): 44.
- [19] Dickmeis C, Honickel MMA, Fischer R, Commandeur U. Production of hybrid chimeric PVX particles using a combination of TMV and PVX-based expression vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 189.
- [20] Tian J, Pei HX, Zhang S, Chen JW, Chen W, Yang RY, Meng YL, You J, Gao JP, Ma N. TRV-GFP: a modified tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 65(1): 311–322.
- [21] Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 2015, 479/480: 278–289.
- [22] Dietzgen RG, Mann KS, Johnson KN. Plant virus-insect vector interactions: current and potential future research directions. *Viruses*, 2016, 8(11): 303.
- [23] 何海芳, 李静静, 张泽龙, 张蓓蓓, 闫明辉, 史保争, 闫凤鸣. 我国植物病毒病及其昆虫介体研究概况. *华中昆虫研究*, 2020, 16(00): 3–21.  
He HF, Li JJ, Zhang ZL, Zhang BB, Yan MH, Shi BZ, Yan FM. Research progress of plant virus diseases and insect vectors in China. *Huazhong Entomological Research*, 2020, 16(00): 3–21. (in Chinese)
- [24] 姚敏, 张天奇, 田志超, 王源超, 陶小荣. 农杆菌介导的 CMV 侵染性克隆及 2b 缺失突变体构建. *中国农业科学*, 2011, 44(14): 3060–3068.  
Yao M, Zhang TQ, Tian ZC, Wang YC, Tao XR. Construction of *Agrobacterium*-mediated cucumber mosaic virus infectious cDNA clones and 2b deletion viral vector. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(14): 3060–3068. (in Chinese)
- [25] Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(6): 2362.
- [26] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [27] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65(10): 1357–1369.
- [28] Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF, Dolja VV. Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 73–100.
- [29] 韦昌联, 陈伯伦, 黄诚梅, 邓智年, 邱长玉, 高国庆. 茉莉种子发芽率及实生苗大田生长试验研究. *广东农业科学*, 2008, 35(10): 33–36.  
Wei CL, Chen BL, Huang CM, Deng ZN, Qiu CY, Gao GQ. Study on the seed Germination and seedling growth of *Jasminum sambac* L. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2008, 35(10): 33–36. (in Chinese)