果 树 学 报 2022,39(12):2217-2224
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20220211

基于特征性SNP鉴定mRNA在柑橘砧穗间的转移

邓立乐,周凡沁,潘志勇*

(华中农业大学园艺林学学院·园艺植物生物学教育部重点实验室,武汉 430070)

摘 要:【目的】以红夏橙和枳为试材鉴定柑橘砧穗间mRNA的可传递性。**【方法】**对建立的红夏橙/枳和枳/枳2个砧穗嫁接组合的接穗和砧木分别进行转录组测序;然后将组装的枳转录组与前人发布的红夏橙转录组进行比对分析,以获得的红夏橙和枳基因组各自的特征性SNP为评判标准,获得从红夏橙转移到枳和从枳转移到红夏橙的候选mRNA;对这些候选mRNA进行SNP-RT-PCR验证。**【结果】**通过比对红夏橙和枳的转录组与基因组数据得到两者间的特征性SNP位点共254 580个,并以此为标准选出30个可从红夏橙转移到枳候选mRNA,及24个可从枳转移到红夏橙的候选mRNA。对候选mRNA进一步验证得到3个可转移的mRNA,随后进行功能预测发现从红夏橙转移到枳的mRNA其基因*Cs2g16070.1*编码1个邻甲基转移酶;从枳转移到红夏橙中的mRNA其基因*Pt2g028010.4*编码1个泛素蛋白连接酶UPL5;另一个从枳转移到红夏橙中的mRNA其基因*Pt3g020940.1*编码1个尿苷二磷酸糖基转移酶。**【结论】**枳砧木中有2个基因(*Pt2g028010.4*和*Pt3g020940.1*)编码的mRNA可转移到红夏橙接穗;红夏橙接穗中有1个基因(*Cs2g16070.1*)编码的mRNA可转移到枳砧木。

关键词:柑橘;砧穗互作;SNP;可传递mRNA

中图分类号:S666 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2022)12-2217-08

Identification of mRNA transfer between citrus rootstock and scion based on characteristic SNP

DENG Lile, ZHOU Fanqin, PAN Zhiyong*

(College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Wuhan 430070, Hubei, China)

Abstract:【Objective**】** Grafting has been an ancient technique widely used to improve and reproduce horticultural crops for at least 1500 years. Citrus plants with a seed-to-seed cycle of 5 – 15 years, are among the fruit crops that were probably domesticated by grafting. Citrus trees propagated by grafting are composed of scions and rootstocks. Exchange of materials between the rootstocks and scions occur frequently. The interaction directly affects the horticultural characters of citrus, the nutrient absorption of the underground part and the relative resistance of the aboveground part, thus affecting the production and economic benefit of citrus orchards. With the development of molecular biology, a growing number of studies have shown that small molecules such as mRNA can transmit between the rootstocks and the scions and regulate related agronomic traits. This study aimed to screen and validate candidate mRNAs that can be transmitted between the rootstocks and scions in citrus plants.【Methods】 The 2-year-old seedlings of *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata* with the same growth potential in the specimen garden of Huazhong Agricultural University were selected for producing nursery trees of *C. sinensis*/*P. trifoliata* and *P. trifoliata*/*P. trifoliata*. The samples were taken 5 months after removal of grafted plastic wrap and were put in the ice box and were brought to the laboratory. The samples were cleaned and three tissues of each grafting combination were collected, and 3 samples were collected from each part (the sample length was 1 cm). Then the RNA was extracted from the samples. By comparing the transcript sequences between the *C. sinensis* and the *P. trifoliata*, we obtained a set of species specific SNP sites. The mRNAs that might be transmitted between the rootstock and the scion were screened,

收稿日期:2022-05-24 **接受日期:**2022-08-31

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD1000103、2020YFD1000102);国家柑橘产业技术体系(CARS-26);国家自然科学基金(32172515)

作者简介:邓立乐,男,在读博士研究生,研究方向为果树学。Tel:13163299006,E-mail:dll917823@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:18627913580,E-mail:zypan@mail.hzau.edu.cn

and then the candidate mRNAs were verified by RT-PCR based on the characteristic SNP sites.【Results】The transcriptome sequencing was performed for the grafting interface, rootstock and scion of the grafted citrus plants, and 18 sets of data were obtained. Combined with the previously published transcription data of sweet orange, 254 580 SNP were obtained by analyzing the data of grafting data analysis. Some transmissible candidate mRNAs were detected based on these characteristic SNP sites. The results showed that 24 candidate mRNAs could be transmitted from rootstocks to scions, and 30 candidate mRNAs could be transmitted from scions to rootstocks in the *C. sinensis*/*P. trifoliata* grafted nursery trees. The candidate mRNAs were further confirmed by species specific SNP-based PCR amplification and sequencing. The mRNAs of two genes (*Pt2g028010.4* and *Pt3g020940.1*) were found to be surely transferred from the *P. trifoliata* to the *C. sinensis*, and the mRNA of one gene (*Cs2g16070.1*) from the *C. sinensis* to the *P. trifoliata*.【Conclusion】By analyzing and comparing the characteristic single nucleotide polymorphisms (SNPs) of sweet orange and trifoliate orange, the mRNAs that could be transmitted between citrus rootstocks and scions were screened out. These mRNAs were further verified by SNP-PCR and three reliable transmissible mRNAs were obtained. The mRNAs transmitted between the rootstocks and scions were identified.

Key words: Citrus; Rootstock-scion interaction; SNP; Transmitted mRNA

嫁接于园艺作物，尤其在园艺作物生产上应用广泛。在嫁接过程中选择根系相对发达的砧木，能够显著促进植株营养吸收、增强植株的抗性[1-2]，而品质优良的接穗能改善植株活力、提高果实产量和品质[3-4]。因此，开展砧穗互作研究，对选择性状优良的砧木或接穗品种、获得优势互补的砧穗组合及促进嫁接技术在果树生产中的高效运用具有重要意义。

砧穗互作一直是园艺学领域研究的热点。在砧穗互作生理层面，前人主要从植物激素对嫁接体愈合的调控、砧木对植物抗性的影响以及砧木改善植株对水分和矿质离子的吸收等方面进行了探究。例如：植物内源激素如生长素（IAAs）、赤霉素（GAs）、茉莉酸（JAs）等作为信号物质参与嫁接过程愈伤组织的形成和嫁接体的生长发育[5-6]；砧木能够通过调节抗氧化酶的活性，来缓解盐逆境对植株的损伤[7]；在缺水条件下，根系发达的砧木能够显著提高植株对水分的吸收效率[8]。接穗对砧木的影响报道并不多，已有的研究主要集中在对根系各项生理指标的测定方面，如一般情况下柑橘的同一种砧木嫁接接穗后其根系活力、POD和SOD活性低于未嫁接接穗的砧木或与其差异不显著，此结果与葡萄上的研究相似[9]。在砧穗互作分子层面，前人主要从影响嫁接愈合相关基因的鉴定、砧穗间mRNA、siRNA等低分子的传递及其生物学功能等方面开展了研究。研究发现，烟草中的*NbGH9B3*基因可通过促进细胞壁形成影响嫁接组织创面的愈合，从而显著提高嫁接的成功率[10]；植物在缺磷的条件下能将地上部合成的miR399转运至根系调节根系磷酸盐的吸收和维持植株体内磷酸盐平衡[11]；值得关注的是，越来越多的研究表明mRNA等低分子可在砧穗间传递并调控相关农艺性状。

研究已证实拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、甘蓝（*Brassica oleracea*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）、杜梨（*Pyrus betulaefolia*）、葡萄（*Vitis vinifera*）等植物的韧皮部汁液中存在可移动的mRNA，它们所编码的蛋白质功能广泛[12-18]。但并非所有韧皮部中的mRNA均能在嫁接体中长距离运输，目前已知的可在砧穗间相互移动的mRNA仍然较少。前人发现，拟南芥*IAA18*和*IAA28*基因在成熟叶片的维管束细胞转录后，其mRNA向下运输至根部从而抑制侧根的发生[19]；拟南芥*TCTP1/HSC70.1*等基因的mRNA经m^5C甲基化修饰后可移动到根部促进根系的发育[20]；苹果*GAI*（*GAINTENSIVE*）基因的mRNA能由根系长距离运输至叶片来调控植株矮化[21]；苹果调节侧根形成的*MpSLR/IAAI4*基因的mRNA可由砧木转移至接穗进而影响其生长发育[22]；梨*PbWoxT1*基因的mRNA能在砧木和接穗间双向移动并调控植株的形态[23]。

柑橘是我国栽培面积最大的果树，但由于其童期较长的特点，故生产中需运用嫁接技术缩短生长和育种周期。迄今柑橘砧穗互作的研究主要停留在生理层面，诸如砧穗间mRNA传递的分子层面的

研究鲜有报道。目前鉴定mRNA运输性采用的主要方法有：根据候选基因的SNPs位点设计dCAPS引物，然后将SNP位点转化为dCAPS标记进行酶切验证。但由于SNP-dCAPS敏感度较低，故无法验证SNP位点是否杂交存在一定缺陷；研究表明，在拟南芥中大部分可传递mRNA具有修饰碱基5-甲基胞嘧啶（m^5C）的特点，因此可以根据该特点初步鉴定砧穗mRNA的运输性；环剥树体侧枝后对韧皮部汁液进行检测，可以发现韧皮部中一些基因的信号消失了，从而判断其mRNA可能由其他部位转移而来。由于红夏橙与枳壳的韧皮部汁液较难提取，故笔者在本研究中通过分析比对柑橘红夏橙接穗（*Citrus sinensis*）和枳砧木（*Poncirus trifoliate*）的特征性单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs），筛选出了可在柑橘砧穗间传递的mRNA分子，进一步采用SNP-PCR对这些mRNA进行了验证。笔者在本研究中鉴定了柑橘砧穗间传递的mRNA，为深入探究这些mRNA的功能、推进砧穗互作分子机制研究提供了候选基因。

1　材料和方法

1.1　材料

以红夏橙（*Citrus sinensis* Osbeck）和枳（*Poncirus trifoliata* L. Raf）的实生苗为主要材料，选取生长2年且生长量一致的枳作砧木，红夏橙芽和枳芽作接穗，分别将红夏橙和枳接穗芽接到枳砧木上（图1）。

A为红夏橙，B、C、D为枳。标尺1格代表1 cm。

A is *Citrus sinensis*; B, C, D is *Poncirus trifoliata*. One square of ruler represents 1 cm.

图1　红夏橙/枳嫁接组合（左）、枳/枳的嫁接组合（右）

Fig. 1　The grafted combination of *Citrus sinensis*/*Poncirus trifoliata* (on the left) and the grafted combination of *Poncirus trifoliata*/*Poncirus trifoliata* (on the right)

1.2　取样及预处理

2016年5月在华中农业大学果树标本园内采集2种嫁接组合的长势一致的苗木清洗干净后置于保温袋中带回实验室，然后对每个样品的接穗、交界面和砧木3个部位进行采集，每个部位采3个样品并保证每个样品长度为1 cm，液氮速冻后放于−80 ℃保存。

1.3　柑橘组织RNA的提取

部位（接穗、砧木、交界面）采集样本各1 cm，将样品立即放入液氮彻底研磨，然后分装到1.5 mL离心管中，保证每管包含0.1 g样品；每管加入1 mL Trizol试剂迅速混匀后室温静置10 min；加入200 μL氯仿，盖严离心管盖剧烈振荡15 s后室温静置10 min，4 ℃，12 000 r·min^{-1}条件下离心15 min，将离心后上清液转移至新的1.5 mL RNase free的离心管中，加入0.5 mL异丙醇后室温放置10 min；4 ℃，12 000 r·min^{-1}条件下离心10 min，弃上清液后加入1 mL 75%乙醇溶液，短暂涡旋；4 ℃，7500 r·min^{-1}的条件下离心5 min；弃上清液后室温静置5~10 min，使RNA沉淀干燥，加入30 μL无RNase水溶解后60 ℃水浴10~15 min；取1 μL RNA进行琼脂凝胶电泳检测RNA完整性，同时检测RNA浓度，将剩余RNA保存在−80 ℃冰箱内。

1.4 无参转录组的组装

对2个不同组合的柑橘嫁接组合的3个部位的样品进行转录组测序，得到转录组数据后对所有测序数据用拼接软件Trinity进行组装，具体参数见附录（Trinity组装的命令）。

1.5 红夏橙与枳的特征性SNP分析及可传递mRNA判断

使用GATK处理组装好的枳转录组，同时结合NCBI中红夏橙的基因组数据筛选鉴定二者的特征性SNP，具体参数见附录（鉴定SNP的命令）。对比红夏橙和枳各自的特征性SNP位点，可区分红夏橙和枳的转录子，即在红夏橙该位点为纯合子且不同于枳的类型。若在红夏橙接穗样品中检测到杂合的特征性SNP位点且在3个生物学重复的样本中均出现此情况，即证明该转录子能够由砧木转移至接穗；同理在枳砧木样品中检测到杂合特征性SNP位点，即证明该转录子能够由接穗转移至砧木。

1.6 基于特征性SNP位点的RT-PCR验证

选取包含特征性SNP位点的候选基因片段，使用SnapGene软件设计引物，候选可传递mRNA引物序列（表1）。以柑橘异源嫁接组合的cDNA为模板进行扩增，纯化后测序，每一候选基因选取3个不同单株样本进行多次验证。

表1 SNP-RT-PCR引物

Table 1 Primer sequences of SNP-RT-PCR

基因 Gene	引物序列（5’－3’） Primer sequence (5’－3’)	退火温度 Tm/℃	条带大小 Size of fragment/bp
Cs2g16070.1	F:GCAGATGCAGTTCTACTCAAGTG	59.6	311
	R:AGAGACCTCAGACCCAAAGTAGA	59.9	
Pt2g028010.4	F:AGTTGGCTGCTAGGATATCTAGG	58.9	344
	R:CAAAATCGTCAGATACTGCGACC	60.0	
Pt3g020940.1	F:GTGGAGGTTCTGTCACATGAAG	58.9	360
	R:CTTGCTGGTGCTAAAGTCATCA	58.9	

2 结果与分析

2.1 红夏橙与枳基因组间特征性SNP位点的筛选

对枳/枳嫁接组合的转录组数据进行组装后，共得到216 656个枳的基因和253 978个枳的转录本（表2），且其中有5381个基因在4个数据库中都有注释信息（表3）。得到可信的枳参考序列后，使用枳/枳嫁接组合中的枳的转录组数据、红夏橙/枳嫁接组合中红夏橙接穗转录组数据以及在NCBI上已报道的红夏橙转录组数据和红夏橙基因组数据，通过比对分析来确定红夏橙和枳间的特征性SNP位点，最终得到共254 580个特征性SNP位点。

2.2 基于特征性SNP筛选柑橘砧穗间可传递mRNA

红夏橙和枳的特征性SNP位点作为红夏橙/枳砧穗间mRNA是否传递的判断依据，共筛选出30个可从红夏橙转移到枳候选mRNA（表4），以及24个可从枳转移到红夏橙的候选mRNA（表5）。

表2 枳转录本组装结果

Table 2 Assembly results of trifoliate transcript

样本 Sample	基因数 Total gene	转录本数 Total transcripts	GC百分比 Percent GC/%	Contig N50/bp	平均Contig长度 Average contig/bp	组装数据库 Total assemble bases
枳*Poncirus trifoliate*	216 656	253 978	39.53	1610	723.98	183 874 744
红夏橙/枳的接穗 Sion of *Citrus sinensis/Poncirus trifoliate*	126 579	171 850	39.37	1601	878.78	151 018 481
红夏橙/枳的交界面 Junction of *Citrus sinensis/Poncirus trifoliate*	171 365	232 048	39.67	1156	718.57	166 743 310
红夏橙/枳的砧木 Rootstock of *Citrus sinensis/Poncirus trifoliate*	104 551	136 932	39.51	1862	1 012.85	138 691 022

表3　注释结果

Table 3　The result of annotation

总数 Total	NR数据库 NR database	COG数据库 COG database	Swiss-Prot数据库 Swiss-Prot database	TrEMBL数据库 TrEMBL database	4个都有 All have
77 635	15 338	26 727	56 565	77 464	5381

表4　基于物种特征性SNP筛选的从红夏橙转移到枳的候选mRNA

Table 4　The candidate mRNAs screened by comparative transcriptome analysis can be Transmitted from sweet orange to trifoliate orange

序列ID Sequence ID	特异性SNP类型 Specific SNP styles	测序长度 Length/bp
Cs1g03980.1	Cs: G Ptr: C	324
Cs1g10970.1	Cs: A Ptr: G	182
Cs1g26670.1	Cs: G Ptr: C	271
Cs2g16070.1	Cs: G Ptr: T	3334
Cs2g20330.1	Cs: C Ptr: T	143
Cs2g24730.1	Cs: C Ptr: G	297
Cs3g03470.1	Cs: A Ptr: G	541
Cs3g26500.1	Cs: T Ptr: A	194
Cs4g16920.1	Cs: A Ptr: C	793
Cs5g10380.4	Cs: A Ptr: G	178
Cs8g08590.1	Cs: T Ptr: G	106
Cs8g12170.1	Cs: G/T Ptr: A/A	177/182
Cs9g04920.1	Cs: G Ptr: A	252
orange1.1t01342	Cs: A Ptr: T	202
orange1.1t00475.3	Cs: C Ptr: T	174
orange1.1t01747.1	Cs: A Ptr: G	1494
orange1.1t05059.1	Cs: C Ptr: T	688
>chr4:12869180...12870650	Cs: T/G Ptr: A/T	1217/1210
Cs1g19680.2	Cs: T Ptr: C	105
orange1.1t04679	Cs: C Ptr: T	220
Cs9g19310.1	Cs: A Ptr: T	6363
orange1.1t04907.1	Cs: T Ptr: C	1839
orange1.1t04909.1	Cs: T/C Ptr: C/A	1947/2319
Cs6g16730.1	Cs: C Ptr: T	4749
Cs5g21830.1	Cs: G Ptr: A	6012
Cs6g11700.1	Cs: T Ptr: C	10 695
Cs7g19090.1	Cs: T Ptr: G	5164
Cs3g10690.1	Cs: G Ptr: A	3428
Cs1g14550.1	Cs: A Ptr: T	1584
orange1.1t03077.1	Cs: T Ptr: C	1604

2.3　利用SNP-RT-PCR验证柑橘砧穗间可传递mRNA

通过SNP-RT-PCR的方法，对候选的可传递mRNA进行验证。为确保结果的可信度，选择同一种嫁接组合的3个单株样品作为模板对特征性SNP位点进行3次反复验证。对24个由枳转移到红夏橙候选基因扩增产物双向测序的结果表明，有2组杂合SNP位点处在特征性SNP位点的位置且SNP类型与特征性SNP类型一致，证明这2个mRNA（对应基因编号*Pt2g028010.4*和*Pt3g020940.1*）可从枳转移到红夏橙。同样对30个由红夏橙转移至枳的候选基因扩增产物双向测序的结果表明，有1组杂合SNP位点处在特征性SNP位点的位置且SNP类型与特征性SNP类型一致，证明该mRNA（对应基因编号*Cs2g16070.1*）从红夏橙转移到枳中（表6）。基于已确定的特异性SNP位点进行PCR扩增后，扩增产物双向测序的结果表明（图2）。

表5　基于物种特征性SNP分析筛选的从枳转移到红夏橙的候选mRNA

Table 5　The candidate mRNAs screened by comparative transcriptome analysis can be Transmitted from trifoliate orange to sweet orange

序列ID Sequence ID	特异性SNP类型 Specific SNP styles	测序长度 Length/bp
Pt7g010320.1	Cs: C/T/C/C/A Ptr: A/A/T/G/C	2711/3457/3391/3360/3292
Pt2g028010.4	Cs: G Ptr: A	6080
Pt2g009090.1	Cs: A Ptr: G	11 700
Pt5g022680.1	Cs: C/G Ptr: T/T	799/1016
Pt3g021050.1	Cs: A Ptr: C	1594
Pt5g020570.1	Cs: T Ptr: C	4751
Pt5g006030.2	Cs: G/A Ptr: A/G	6529/5947
Pt1g014530.1	Cs: C Ptr: G	1432
Pt3g004160.1	Cs: T Ptr: G	1125
Pt3g005620.2	Cs: G Ptr: A	3173
Pt3g005430.1	Cs: C Ptr: G	2898
Pt3g007590.1	Cs: A Ptr: T	1516
Pt3g021870.2	Cs: C Ptr: T	5462
Pt3g020940.1	Cs: A Ptr: G	8736
PtUn023860.3	Cs: G/C/A/A Ptr: C/A/T/C	1271/1365/1304/1303
Pt6g018000.1	Cs: A Ptr: G	7481
Pt6g003120.1	Cs: T Ptr: G	8265
Pt6g003360.1	Cs: C Ptr: G	2630
Pt4g012460.1	Cs: T/C Ptr: C/T	12 884/10 565
Pt8g003160.1	Cs: T Ptr: G	5537
Pt9g017320.1	Cs: A Ptr: G	9608
Cs9g04560.1	Cs: C Ptr: G	11 692
Pt1g015050.1	Cs: C/T/T/T Ptr: T/A/C/G	1205/1215/1193/1083

表6 测序所得的SNP位点类型及位置

Table 6 The SNP styles and site by sequencing

序列ID Sequence ID	SNP类型 SNP styles	SNP位置 SNP site	特异性SNP类型 Specific SNP styles	特异性SNP位置 Specific SNP site
Pt2g028010.4	Cs: G	1268	Cs: G	1268
	Ptr: A		Ptr: A	
Pt3g020940.1	Cs: A	1212	Cs: A	1212
	Ptr: G		Ptr: G	
Cs2g16070.1	Cs: A/A/G	885/908/992	Cs: G	992
	Ptr: G/G/T		Ptr: T	

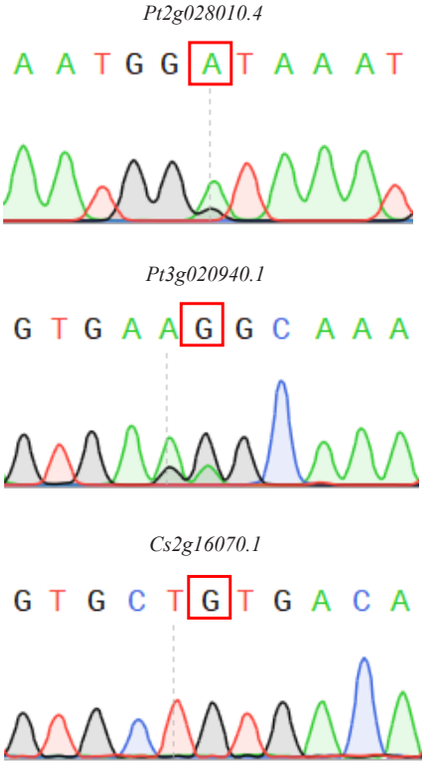

图2 *Pt2g028010.4*、*Pt3g020940.1*、*Cs2g16070.1* 在特异性SNP位点处出现重叠峰

Fig. 2 The overlapping peak of the specific SNP in *Pt2g028010.4*, *Pt3g020940.1* and *Cs2g16070.1*

3 讨 论

为了探究mRNA分子能否在砧木和接穗之间传递，此前的研究采用的主要方法有：(1)不少可传递mRNA具有修饰碱基5-甲基胞嘧啶(m^5C)的特点，因此根据该特点可筛选砧穗间可传递mRNA[21]；(2)前人研究发现南瓜、苹果、梨等韧皮部汁液中存在可长距离运输的RNP(ribonucleoprotein complexes)核糖核蛋白复合体，由此鉴定到*PP16-1*、*GAIP*、*GAI*、*SCL14P*、*STMP*、*PbWoxT1*、*ERFP*、和*MybP*等可传递的mRNA[24]。但采用这种方法也有局限性，即只能鉴定到与该复合体特异结合的mRNA，从而忽视了以其他形式运输的mRNA；(3)前人对杜梨的侧枝环剥后发现其韧皮部中一些基因的信号消失了，从而判断其mRNA可能由其他部位转移而来[17]。此方法比较直观，但具有一定的随机性且无法准确的判断mRNA消失的具体原因。由于采用的红夏橙和枳的韧皮部汁液都较难提取，故很难采用检测韧皮部运输物质的方法来筛选砧穗间传递的mRNA分子。所以笔者采用异源嫁接红夏橙和枳的方法，以物种特征性SNP作为判断依据对红夏橙与枳间可传递的mRNA进行鉴定。

笔者在本研究中基于红夏橙和枳各自的特征性SNP分析及SNP-RT-PCR验证，最终鉴定了3个可靠的能在柑橘砧穗间传递的mRNA分子。与前人相关研究相比，这个数目是比较少的，推测有以下可能原因：(1)柑橘为多年生木本作物，木质部发达、韧皮部汁液少，相比于韧皮部汁液丰富的草本植物，其体内可传递的mRNA相对较少；(2)分析比对不同物种间的特征性SNP是本研究筛选可传递mRNA的前提，但研究发现并不是所有SNP都能稳定遗传，能够从父母本稳定遗传下来的SNP仅占基因组的30%左右[25]，那些不能稳定遗传的SNP位点可能受各种因素如季节、环境胁迫、生长周期的影响，这可能导致大多数可传递的mRNA被遗漏；(3)相比前人在葡萄砧穗互作研究中将2个样本同时出现杂合SNP位点定义为可传递的mRNA[19]，笔者设置了更为严格的筛选条件，即只有在3个植株个体中均出现杂合的同一SNP位点，才视其为可在砧穗间传递的mRNA，尽管这样得到的候选可传递mRNA数量较少，但更为可靠；同时在筛选SNP位点时保证3个生物学重复的枳转录本均为相同的纯合子且与枳基因型一致，红夏橙转录本均为另一纯合子且与红夏橙基因组基因型一致，即可排除因为单株植物之间的差异。

对这3个可传递mRNA的功能预测发现：从红夏橙转移到枳中的mRNA其基因*Cs2g16070.1*编码1个邻甲基转移酶，在MP(methoxypyrazines)的合成过程中发挥重要作用[26]；从枳转移到红夏橙中的mRNA其基因*Pt2g028010.4*编码1个泛素蛋白连接酶*UPL5*(ubiquitin protein ligase)，有研究表明拟南

芥的*UPL5*可以直接与植物细胞质中转录因子WRKY53相互作用从而参与叶片衰老的调控[27]；另一个从枳转移到红夏橙中的mRNA其基因*Pt3g020940.1*编码1个尿苷二磷酸糖基转移酶，在植物中该酶通过将碳水化合物从活化的单糖供体转移到醇、酸、胺或硫醇上来催化低分子糖苷的产生[28]。但这3个基因在柑橘砧穗间传递的意义是什么，具体发挥什么功能，还有待进一步研究。前人研究发现，在韧皮部长距离运输的一些mRNA分子中含有PTB基序（UUCUCUCUCUU）[29]，PTB基序能够高度亲和且特异地结合PTB蛋白形成RNP（ribonucleoprotein）复合体，进而在韧皮部中远距离传递[30-31]。但本研究得到的这3个可在柑橘砧穗间传递的mRNA分子没有PTB基序，说明该结构可能不是mRNA传递的必需条件。

4　结　论

笔者在本研究中通过分析比对柑橘红夏橙接穗（*Citrus sinensis*）和枳砧木（*Poncirus trifoliate*）各自特征性单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs），筛选出了可在柑橘砧穗间传递的mRNA分子，进一步采用SNP-PCR对这些mRNA进行了验证得到3个可靠的可传递mRNA，鉴定了柑橘砧穗间传递的mRNA，为深入探究这些mRNA的功能、推进砧穗互作分子机制研究提供了候选基因。

参考文献 References:

[1] GOLDSCHMIDT E E. Plant grafting：New mechanisms，evolutionary implications[J]. Frontiers in Plant Science，2014，5：727.

[2] STOVER E，INCH S，RICHARDSON M L，HALL D G. Conventional citrus of some scion/rootstock combinations show field tolerance under high huanglongbing disease pressure[J]. Scientia Horticulturae，2016，51(2)：127-132.

[3] LAINO P，RUSSO M P，GUARDO M，REFORGIATO-RECUPERO G，VALÈ G，CATTIVELLI L，MOLITERNI V M. Rootstock-scion interaction affecting citrus response to CTV infection：A proteomic view[J]. Plant Physiology，2016，156(4)：444-467.

[4] SOUZA J，SILVA E M，FILHO M A，MORILLON R，BONATTO D，MICHELI F，DA SILVA G A. Different adaptation strategies of two citrus scion/rootstock combinations in response to drought stress[J]. PLoS One，2017，12：e0177993.

[5] TEDESCO S，PINA A，FEVEREIRO P，KRAGLER F. A phenotypic search on graft compatibility in grapevine[J]. Agronomy，2020，10(5)：706.

[6] NANDA A K，MELNYK C W. The role of plant hormones during grafting[J]. Journal of Plant Research，2017，131(1)：49-58.

[7] SHAHID M A，BALAL R M，KHAN N，SIMÓN-GRAO S，ALFOSEA-SIMÓN M，CÁMARA-ZAPATA J M，MATTSON N S，GARCIA-SANCHEZ F. Rootstocks influence the salt tolerance of Kinnow mandarin trees by altering the antioxidant defense system，osmolyte concentration，and toxic ion accumulation[J]. Scientia Horticulturae，2019，250：1-11.

[8] 张志焕，韩敏，张逸，王允，刘灿玉，曹逼力，徐坤 . 水分胁迫对不同抗旱性砧木嫁接番茄生长发育及水气交换参数的影响[J]. 中国农业科学，2017，50（2）：391-398.
ZHANG Zhihuan，HAN Min，ZHANG Yi，WANG Yun，LIU Canyu，CAO Bili，XU Kun. Effect of water stress on development and H_2O and CO_2 exchange in leaves of tomato grafted with different drought resistant rootstocks[J]. Scientia Agricultura Sinica，2017，50(2)：391-398.

[9] 周开兵，夏仁学 . 柑橘砧穗生理互作研究进展与展望[J]. 中国农学通报，2006，22（2）：239-245.
ZHOU Kaibing，XIA Renxue. The development and tendencies in the study on the physiological interaction between scions and rootstocks for citrus[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2006，22(2)：239-245.

[10] NOTAGUCHI M，KUROTANI K I，SATO Y，TABATA R，KAWAKATSU Y，OKAYASU K，HIGASHIYAMA T. Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by β-1，4-glucanases[J]. Science，2020，369(6504)：698-702.

[11] HUANG T K，HAN C L，LIN S I，CHEN Y J，TSAI Y C，CHEN Y R，CHEN J W，LIN W Y，CHEN P M，LIU T Y，CHEN Y S，SUN C M，CHIOU T J. Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots[J]. The Plant Cell，2013，25(10)：4044-4060.

[12] DEEKEN R，ACHE P，KAJAHN I，KLINKENBERG J，BRINGMANN G，HEDRICH R. Identification of *Arabidopsis thaliana* phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments[J]. The Plant Journal，2008，55(5)：746-759.

[13] GAUPELS F，BUHTZ A，KNAUER T，DESHMUKH S，WALLER F，VAN BEL A J，KEHR J. Adaption of aphid stylectomy for analyses of proteins and mRNA in barley phloem sap[J]. Journal of Experimental Botany，2008，59(12)：3297-3306.

[14] OMID A，KEILIN T，GLASS A，LESHKOWITZ D，WOLF S. Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants[J]. Journal of Experimental Botany，2007，58(13)：3645-3656.

[15] YANG H W，YU T S. Arabidopsis floral regulators FVE and AGL24 are phloem-mobile RNAs[J]. Botanical Studies，2010，51(1)：17-26.

[16] MAHAJAN A，BHOGALE S，KANG I H，HANNAPEL D J，BANERJEE A K. The mRNA of a Knotted 1-like transcription factor of potato is phloem mobile[J]. Plant Molecular Biology，2012，79(6)：595-608.

[17] DUAN X W，ZHANG W N，HUANG J，ZHAO L M，MA C，HAO L，YUAN H，HARADA T，LI T Z. KNOTTED1 mRNA undergoes long-distance transport and interacts with movement protein binding protein 2C in pear (*Pyrus betulaefolia*)[J]. Plant Cell，Tissue and Organ Culture (PCTOC)，2015，121(1)：109-119.

[18] YANG Y Z，MAO L Y，JITTAYASOTHORN Y，KANG Y M，JIAO C，FEI Z J，ZHONG G Y. Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines[J]. BMC Plant Biology，2015，15(1)：251-264.

[19] NOTAGUCHI M，WOLF S，LUCAS W J. Phloem-mobile Aux/IAA transcripts target to the root tip and modify root architecture[J]. Journal of Integrative Plant Biology，2012，54(10)：760-772.

[20] YANG L，PERRERA V，SAPLAOURA E，APELT F，BAHIN M，KRAMDI A，OLAS J，MUELLER-ROEBER B，SOKOLOWSKA E，ZHANG W N，LI R S，PITZALIS N，HEINLEIN M，ZHANG S D，GENOVESIO A，COLOT V，KRAGLER，F. m5C methylation guides systemic transport of messenger RNA over graft junctions in plants[J]. Current Biology，2019，29(15)：2465-2476.

[21] XU H Y，ZHANG W N，LI M F，HARADA T，HAN Z H，LI T Z. Gibberellic acid inensive mRNA transport in both directions between stock and scion in *Malus*[J]. Tree Genetics & Genomes，2010，6(6)：1013-1019.

[22] KANEHIRA A，YAMADA K，IWAYA T，TSUWAMOTO R，KASAI A，NAKAZONO M，HARADA T. Apple phloem cell contains some mRNAs transported over long distances[J]. Tree Genetics & Genomes，2010，6(5)：635-645.

[23] DUAN X W，ZHANG W N，HUANG J，HAO L，WANG S N，WANG A D，MENG D，ZHANG Q L，CHEN Q J，LI T Z. PbWoxT1 mRNA from pear (*Pyrus betulaefolia*) undergoes long-distance transport assisted by a polypyrimidine tract binding protein[J]. The New Phytologist，2016，210(2)：511-524.

[24] CHO S K，KANG I H，CARR T，HANNAPEL D J. Using the yeast three-hybrid system to identify proteins that interact with a phloem-mobile mRNA[J]. Frontiers in Plant Science，2012，3：189.

[25] 陈发毅 . 利用转录组分析研究柑橘砧穗间 mRNA 的移动[D]. 武汉：华中农业大学，2017.
CHEN Fayi. Using transcriptome analysis to investigate the movement of mRNA between citrus rootstook and scion[D]. Wuhan：Huazhong Agricultural University，2017.

[26] GREGAN S M，JORDAN B. Methoxypyrazine accumulation and O-Methyltransferase gene expression in sauvignon blanc grapes：The role of leaf removal，light exposure，and berry development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2016，64(11)：2200-2208.

[27] MIAO Y，ZENTGRAF U. A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53[J]. The Plant Journal：For Cell and Molecular Biology，2010，63(2)：179-188.

[28] SUN G X，PUTKARADZE N，BOHNACKER S，JONCZYK R，FIDA T，HOFFMANN T，BERNHARDT R，HäRTL K，SCHWAB W. Six uridine-diphosphate glycosyltransferases catalyze the glycosylation of bioactive C13-apocarotenols[J]. Plant Physiology，2020，184(4)：1744-1761.

[29] HAM B K，BRANDOM J L，XOCONOSTLE-CÁZARES B，RINGGOLD V，LOUGH T J，LUCAS W J. A polypyrimidine tract binding protein pumpkin RBP50 forms the basis of phloem mobile ribonicleoprotein complex[J]. The Plant Cell，2009，21(1)：197-215.

[30] LUCAS W J，BOUCHÉ-PILLON S，JACKSON D P，NGUYEN L，BAKER L，DING B，HAKE S. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata[J]. Science，1995，270(5244)：1980-1983.

[31] LI P F，HAM B K，LUCAS W J. CmRBP50 protein phosphorylation is essential for assembly of a stable phloem-mobile high-affinity ribonucleoprotein complex[J]. Journal of Biological Chemistry，2011，286(26)：23142-23149.