

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.08.002

# 月季 *RhPR10.2* 基因克隆及生物学功能分析<sup>①</sup>

吴林<sup>1,2</sup>, 李洪雷<sup>1,2</sup>, 姜玉松<sup>1,2</sup>, 李晓英<sup>2</sup>, 王显凤<sup>3</sup>

1. 重庆文理学院 经济植物生物技术重庆市重点实验室, 重庆 永川 402168;

2. 重庆文理学院 特色植物研究院, 重庆 永川 402168; 3. 重庆市永川区经济作物技术推广站, 重庆 永川 402168

**摘要:** 为解析月季 PR-10 家族基因 *RhPR10.2* 在月季花瓣衰老中的生物学功能, 采用 Real-Time PCR、RACE PCR、异源过表达、VIGS(病毒诱导的基因沉默)等生物技术方法, 分析了月季 *RhPR10.2* 基因在月季不同开放阶段花瓣中的表达谱, 克隆了 *RhPR10.2* 基因全长, 构建了 pSuper1300-*RhPR10.2* 异源过表达载体以及 pTRV2-*RhPR10.2* VIGS 载体. 结果表明, *RhPR10.2* 基因的表达受月季花瓣衰老显著诱导, 其开放阅读框为 483 bp, 编码 160 个氨基酸, 含有 PR-10 家族特有的 P-loop 基序; 蛋白分子式为  $C_{796}H_{1250}N_{204}O_{239}S_2$ , 分子量为 17 566.02, 等电点(pI)为 6.07; *RhPR10.2* 蛋白与葡萄 *VvPR10.1* 亲缘关系最近; 与拟南芥野生型植株(WT)相比, 异源过表达 *RhPR10.2* 基因的拟南芥 T2 代纯合子植株表现出显著延迟叶片衰老的表型, 伴随着更高的叶绿素含量以及更低的离子渗透率; 此外, 与 TRV2 对照相比, 沉默 *RhPR10.2* 基因的月季花瓣表现出加速衰老的表型, 伴随着更高的离子渗透率以及衰老 marker 基因 *RhSAG12* 的表达.

**关键词:** 月季; *RhPR10.2*; 基因沉默; 花瓣衰老

**中图分类号:** Q945.48

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)08-0008-08

月季(*Rosa hybrida*)切花作为世界四大切花之首, 年贸易额占世界切花总贸易额的 32%<sup>[1]</sup>. 然而月季切花不耐贮运, 发达国家采后损耗通常在 20%, 我国往往超过 30%, 有时甚至高达 50%, 造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>. 主要表现为月季花朵的不正常开放, 如僵花、僵蕾, 提前衰老等<sup>[3-5]</sup>. 因此, 解析月季切花采后花朵衰老机制始终是国际热点.

目前, 影响月季切花衰老的主要因素分为两大类, 一类是外部因素, 如光照、温度、机械损伤等; 另一类是内部因素, 如水分平衡、大分子物质代谢、生物膜透性变化以及内源植物激素变化等. 月季瓶插期间, 由于次生代谢产物积累以及病菌侵染, 往往造成木质部导管堵塞, 减少水分的吸收与运输, 破坏水分平衡, 最终加速花朵衰老<sup>[6]</sup>. 失水胁迫会显著提高月季萼片中乙烯生物合成酶基因 *RhACS1* 与 *RhACS2* 表达量, 诱导乙烯大量合成<sup>[7]</sup>. 此外, 在蛋白水平, 月季通过精准地调控雌蕊中 *RhMMPK6*-*RhACS1* 级联反应, 进而诱导乙烯大量产生<sup>[8]</sup>. 同时, 膜脂过氧化也是引起月季切花衰老的因素之一<sup>[9]</sup>. 细胞膜透性增加会加剧水分丧失, 引起月季切花提前衰老<sup>[10]</sup>. 相反, 抗坏血酸和  $\beta$ -胡萝卜素处理能够有效抑制月季切花的衰老进程并延长切花瓶插寿命, 可能与提高细胞膜保护酶活性有关<sup>[11]</sup>.

此外, 月季花朵的衰老受植物激素调控. 乙烯处理引起月季花朵加速开放, 花朵开放期(2 至 4 级)较对照的 5 d 缩短为 3.0~3.4 d; 然而, 乙烯抑制剂 1-MCP 处理能显著延长花朵开放期, 达到

① 收稿日期: 2018-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701972); 重庆市科委基础科学与前沿技术项目(cstc2017jcyjAX0233); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1711276); 重庆文理学院人才引进项目(R2016TZ04).

作者简介: 吴林(1986-), 男, 讲师, 博士, 主要从事园艺作物采后逆境与生理研究.

通信作者: 姜玉松, 副教授, 博士.

7.6~8.1 d<sup>[12]</sup>. 在分子水平, 一个月季 HD-Zip I 家族 RhHB1 转录因子介导了 GA<sub>s</sub>、ABA 和乙烯 3 种激素在月季衰老进程中的拮抗调节<sup>[13]</sup>. 总体来说, 乙烯与 ABA 促进月季花朵的衰老, 而细胞分裂素和赤霉素发挥延缓功能<sup>[14]</sup>.

通常, 当植物遭受病菌侵染时会特异诱导某些基因的表达, 其中包括病程相关基因(PR). 基于蛋白结构和功能特性, 将 PR 蛋白划分为 17 不同的家族. 其中, PR-10 蛋白家族包括 100 多个成员, 其开放阅读框(ORF)全长通常包含 456 至 489 bp, 编码 151~162 个氨基酸, 具有一个保守的 P-loop 基序(GxG-GxGxxK), 定位于细胞质中<sup>[15]</sup>. 在前期工作中, 我们证明了一个受月季花朵衰老显著诱导的 PR10 蛋白家族基因 *RhPR10.1*, 通过调控花朵内源细胞分裂素浓度, 进而拮抗乙烯诱导的月季花朵衰老<sup>[16]</sup>. 然而, 月季 PR-10 蛋白家族的其他成员是否也参与了花朵衰老调控仍然未知. 本研究从月季花瓣中分离了另一个 PR-10 蛋白家族基因 *RhPR10.2*, 并对其蛋白特性及生物学功能进行了分析, 以期解析 PR10 蛋白家族基因调控月季花朵衰老的分子机制提供新的理论依据, 为月季花朵品质改良分子育种提供基因储备.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

月季切花采自中国农业大学月季种质资源圃. 按商品月季切花采收标准采收(参考 Ma 等 2005 年制定的标准)<sup>[12]</sup>. 月季切花采收后立即插入水中, 并在 1 h 内运回实验室, 为防止气栓形成, 需在水中复剪至 25~30 cm, 并保留 2~3 片复叶, 平衡 2 h 备用. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为 Columbia (Col)生态型.

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、DNA 片段纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒、5'-Full RACE kit、pMD18-T 载体、M-MLV 反转录酶等购自 Takara 公司; 引物由三博远志公司合成; DNA 测序由天一辉远公司完成; 其他常规试剂均为国产或进口分析纯.

### 1.2 总 RNA 提取与反转录

月季花瓣总 RNA 提取采用 Hot Borate 法, 并做部分修改<sup>[17]</sup>. 拟南芥叶片总 RNA 提取采用 TaKara 公司 TRIzol 试剂盒. RACE cDNA 克隆方法参考 Takara 公司 BD SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 使用方法<sup>[18]</sup>. 引物见表 1.

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')
GSP1	ATTGAAGGTGATGCTATCGGAGAC	GSP5	CAGCTCCTTAATCATCATCATGGGTG
GSP2	TCAAGAGCACCAGCCACTACCATT	GSP6	GGCTTGGTACGATAGTGAAGGAAAT
GSP3	GTCTTTGTCAAGTCCATCAATCTG	GSP7	GCTCTAGAATGGGTGTGTTCACTTATGAACTG
GSP4	AACGATTTCAAGCACTCTTCACAGC	GSP8	CCAAGCTTTTAGTTGTAGGCCTCAGGGTTGGCC

注: 下划线表示酶切位点.

### 1.3 基因全长克隆

基因克隆参考赵福佳等<sup>[19]</sup>以及李胜等<sup>[20]</sup>方法, 并稍作修改.

*RhPR10.2* 基因 3' 端序列克隆: 通过实验室月季花瓣响应乙烯数据库(<http://bioinfo.bti.cornell.edu/rose>)RU05592 提供的已有序列设计正向特异上游引物 GSP1 与 GSP2, 利用 3'-RACE 方法及试剂盒提供的两条下游引物 AP1 与 AP2 进行巢式 PCR 克隆获得 3' 端特异序列; 第一轮 PCR 引物分别为 GSP1 与 AP1, 反应体系为 20  $\mu$ L, 模板为月季 6 级花瓣 cDNA, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环); 72  $^{\circ}$ C 10 min. 第二轮 PCR 引物为 GSP2 与 AP2, 反应体系为 20  $\mu$ L, 以稀释 50 的第一轮产物为模板; 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环); 72  $^{\circ}$ C 10 min.

*RhPR10.2* 基因 5' 端序列克隆: 根据克隆得到的 *RhPR10.2* 基因序列设计两条反向特异下游引物

GSP3 与 GSP4, 利用 5'-RACE kit 试剂盒提供的 5' RACE outer primer 及 5' RACE inner primer 进行巢式 PCR 扩增 5' 端特异序列; 第一轮 PCR 引物为 GSP3 与 5' RACE outer primer, 模板为月季 6 级花瓣 cDNA, 反应体系为 20  $\mu$ L, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环); 72  $^{\circ}$ C 10 min. 第二轮 PCR 引物为 GSP4 与 5' RACE inner primer, 以稀释 50 的第一轮产物为模板, 反应体系为 20  $\mu$ L, 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环), 72  $^{\circ}$ C 10 min.

*RhPR10.2* 基因 ORF(开放阅读框)全长校正: 利用 DNAMAN 5.0 软件进行全长拼接并进行 ORF(开放阅读框)全长预测, 设计两条特异引物 GSP5(正向)、GSP6(反向), 使用高保真性 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶进行 ORF 全长校正, PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环), 72  $^{\circ}$ C 10 min.

基因测序: 将含有目的片段的回收产物连接到 T 载体并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 在添加 AMP(氨苄)的培养基上 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑选阳性单克隆送至天一辉远公司测序.

#### 1.4 qRT-PCR 分析

qRT-PCR 试验采用 ABI PRISM Step ONE Plus Real-time PCR 仪器; 反应体系为 20  $\mu$ L, 即 2  $\times$  Mix 10  $\mu$ L、上下游引物(RhActin5 为内参基因)各 0.4  $\mu$ L、模板 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L; 反应程序为 95  $^{\circ}$ C 10 min  $\rightarrow$  95  $^{\circ}$ C 15 s  $\rightarrow$  60  $^{\circ}$ C 1 min(40 个循环); 数据处理采用双  $\Delta\Delta T$  方法计算.

#### 1.5 蛋白结构及系统进化树分析

通过 DNAMAN 5.0 软件将 ORF 核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 利用 ProtParam 在线工具(<http://web.expasy.org/protparam>)进行蛋白特性分析; 通过 Clustal 软件进行 *RhPR10.2* 同源蛋白序列比对分析; 利用 MEGA 5.0 软件进行系统进化树分析.

#### 1.6 *RhPR10.2* 异源过表达

过表达载体构建: 分别设计带有 *Xba* I 以及 *Hind* III 酶切位点的正反向引物序列 GSP7、GSP8, 使用高保真性 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 模板为月季 6 级花瓣 cDNA, PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min (30 循环), 72  $^{\circ}$ C 10 min; 将获得的条带回收并使用 *Xba* I 以及 *Hind* III 双酶切, 构建到已经双酶切后的 Super 1300 载体上, 获得 pSuper1300-*RhPR10.2* 过表达载体. 农杆菌转化采用冻融法, 拟南芥植株转化采用花序浸蘸法<sup>[18]</sup>.

#### 1.7 VIGS 载体构建及 *RhPR10.2* 基因沉默

VIGS 载体构建: 选择 *RhPR10.2* 基因保守的 318 bp 3'-UTR 片段, 设计带有 *Xba* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶的正反向引物, 构建 pTRV-*RhPR10.2* 沉默载体. 病毒诱导的基因沉默(VIGS)试验参考 Wu 等<sup>[16]</sup>的方法, 并稍加修改.

## 2 结果与分析

### 2.1 月季 *RhPR10.2* 基因表达谱分析

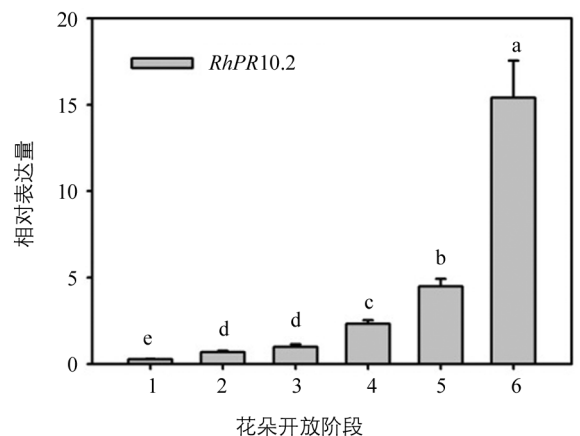
采用 qRT-PCR 方法检测了 *RhPR10.2* 基因在不同开放阶段(1 至 6 级)月季花瓣中的表达谱(图 1). 如图所示, 月季 *RhPR10.2* 基因受花瓣衰老显著诱导.

### 2.2 月季 *RhPR10.2* 基因 ORF 全长克隆

通过 RACE PCR 方法获得 *RhPR10.2* 基因全长 ORF 序列 483 bp, 编码 160 个氨基酸序列(图 2).

### 2.3 月季 *RhPR10.2* 蛋白特性及同源序列比对分析

蛋白特性分析表明月季 *RhPR10.2* 蛋白分子式为 C<sub>796</sub>H<sub>1250</sub>N<sub>204</sub>O<sub>239</sub>S<sub>2</sub>, 分子量为 17 566.02, 半衰期在酵母中大于 20 h, 大肠杆菌中大于 10 h, 亲水



字母表示显著性差异  $p < 0.05$ .

图 1 *RhPR10.2* 基因在 1 至 6 级月季花瓣中的表达分析

性系数(GRAVY)为-0.269,为疏水性蛋白;RhPR10.2蛋白肽链正电荷残基(Asp+Glu)为22,负电荷残基(Arg+Lys)为19,等电点(PI)为6.07. RhPR10.2氨基酸序列与月季(*Rosa hybrida*)、欧洲白桦(*Betula pendula*)、白羽扇豆(*Lupinusluteus*)、唐松草(*Thalictrum aquilegifolium*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的同源基因序列比对表明,月季RhPR10.2具有PR-10家族蛋白相对保守的P-Loop(GxGGxGxxK)基序,可能与其他物种PR-10蛋白具有相似的蛋白特性(图3).

## 2.4 月季 RhPR10.2 蛋白系统进化树分析

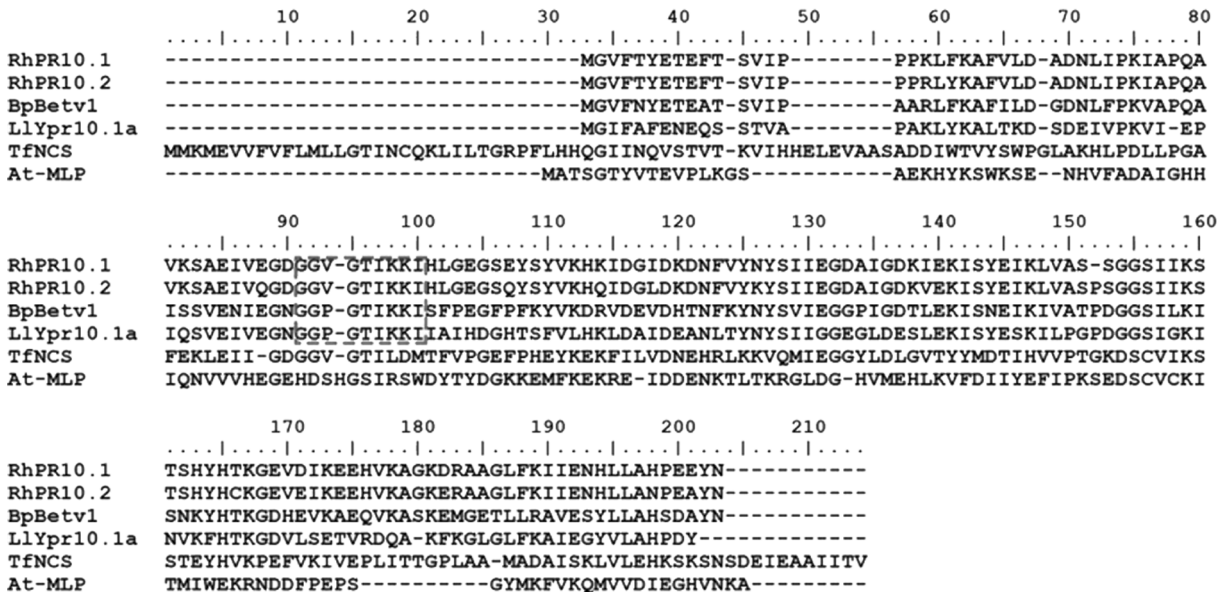
将RhPR10.2蛋白与其他植物,包括白羽扇豆LaPR10、黄羽扇豆LlYpr10.1a、大豆GmPR10、苜蓿MsPR10.1、葡萄VvPR10.1、月季RhPR10.1、甜椒CaPR-10、海岛棉Gb-PR10、陆地棉GhPR10-5、麝香百合LloPR10、水稻JIOsPR10、高粱SbPR-10、白山松PmPR10-1.2、稻谷OsPR10a、罂粟PsPR10等进行系统进化树分析,结果表明RhPR10.2与月季RhPR10.1以及葡萄VvPR10.1亲缘关系最近(图4).

```

ATG GGT GTG TTC ACT TAT GAA ACT GAG TTC ACC TCT GTC
M G V F T Y E T E F T S V
ATC CCA CCA CCA AGA CTC TAC AAG GCC TTT GTT CTT GAT
I P P P R L Y K A F V L D
GCT GAT AAC CTC ATC CCC AAG ATT GCC CCA CAG GCT GTG
A D N L I P K I A P Q A V
AAG AGT GCT GAA ATC GTT CAA GGC GAT GGA GGT GTT GGA
K S A E I V Q G D G G V G
ACC ATC AAG AAG ATT CAC CTT GGT GAA GGA AGC CAA TAC
T I K K I H L G E G S Q Y
AGC TAT GTG AAG CAT CAG ATT GAT GGA CTT GAC AAA GAC
S Y V K H Q I D G L D K D
AAC TTT GTG TAC AAA TAC AGT ATA ATT GAA GGT GAT GCT
N F V Y K A Y S I E E G D A
ATC GGA GAC AAA GTT GAG AAA ATC TCT TAC GAG ATT AAG
I G D K V E K I S Y E I K
TTG GTG GCA TCT CCA AGT GGA GGC TCC ATC ATC AAG AGC
L V A S P S G G S I I K S
ACC AGC CAC TAC CAT TGC AAA GGT GAG GTT GAG ATC AAG
T S H Y H C K G E V E I K
GAA GAG CAT GTC AAG GCC GGA AAA GAA AGA GCC GCT GKT
E E H V K A G K E R A A G
TTG TTC AAG ATC ATT GAG AAC CAC CTT TTG GCC AAC CCT
L F K I I E N H L L A N P
GAG GCC TAC AAC TAA
E A Y N *

```

图2 月季RhPR10.2基因ORF序列及编码的氨基酸序列

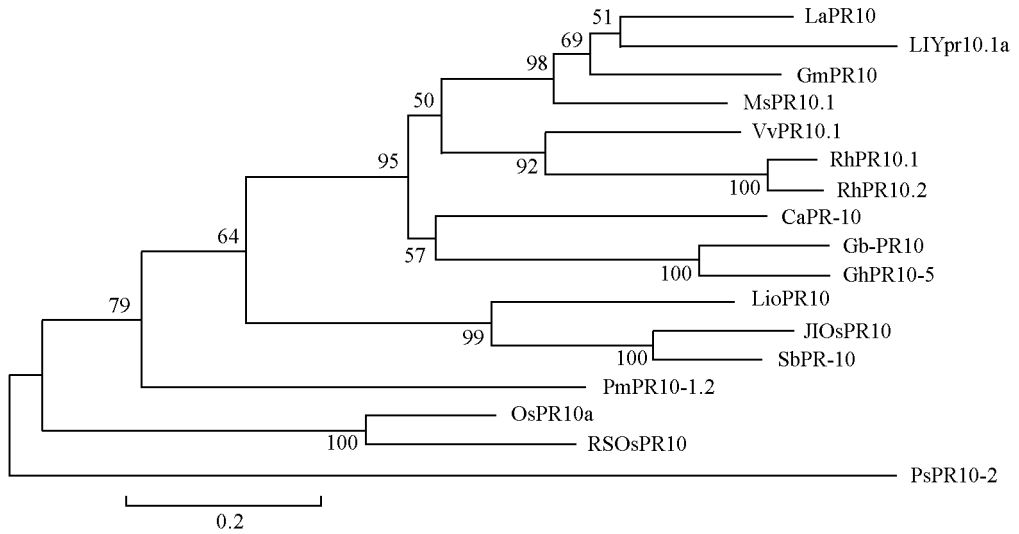


RhPR10.1: 月季RhPR10.1; BpBetv1: 欧洲白桦BpBetv1; LlYpr10.1a: 黄羽扇豆LlYpr10.1a; TfNCS: 唐松草TfNCS; At-MLP: 拟南芥At-MLP; 线框表示P-loop基序.

图3 月季PhPR10.2与其他植物PR-10氨基酸序列同源比对

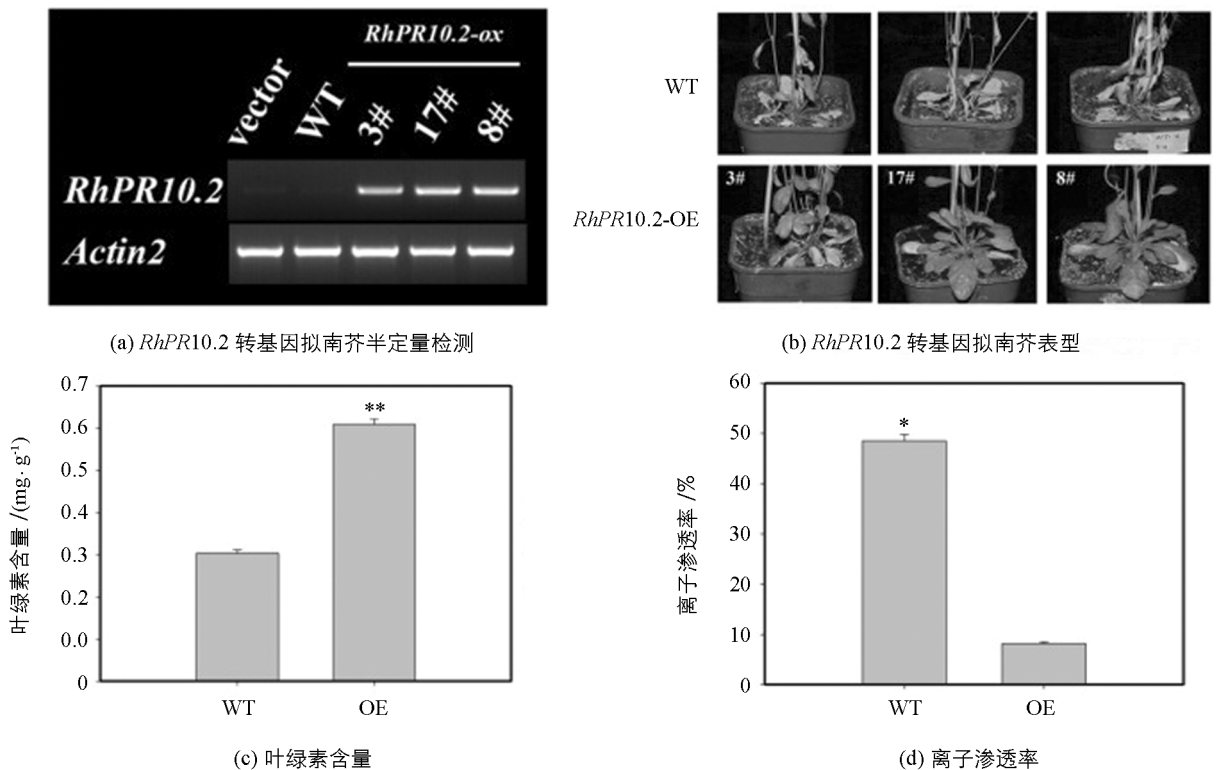
## 2.5 RhPR10.2 基因异源过表达分析

为解析RhPR10.2基因生物学功能,采用花序浸蘸法将pSuper1300-RhPR10.2载体转移进入拟南芥野生型植株,利用潮霉素进行阳性筛选,并进行RT-PCR检测,获得T2代RhPR10.2过表达纯合子株系,分别为3#、17#、8#(图5a).表型分析发现,过表达RhPR10.2转基因拟南芥表现出显著延缓叶片衰老表型(图5b).衰老相关指标检测发现,与野生型植株(WT)相比,转基因株系叶绿素含量显著增加,然而离子渗透率显著降低(图5c,d).



白羽扇豆 LaPR10、黄羽扇豆 LIYpr10.1a、大豆 GmPR10、苜蓿 MsPR10.1、葡萄 VvPR10.1、月季 RhPR10.1、甜椒 CaPR-10、海岛棉 Gb-PR10、陆地棉 GhPR10-5、麝香百合 LloPR10、水稻 JIOsPR10、高粱 SbPR-10、白山松 PmPR10-1.2、稻谷 OsPR10a、罌粟 PsPR10.

图 4 *RhPR10.2* 与其他植物 PR-10 蛋白系统进化树分析

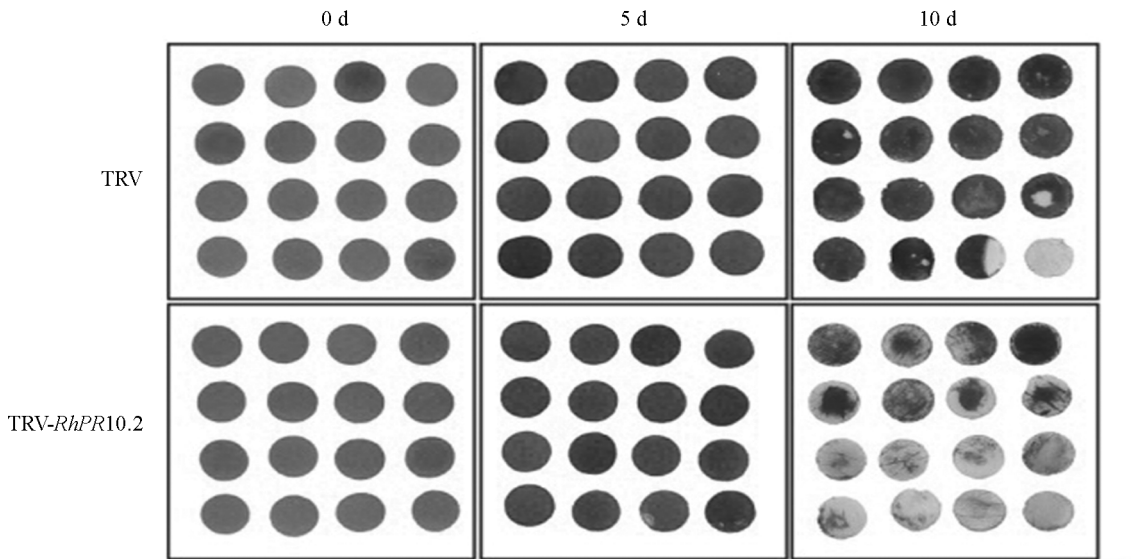
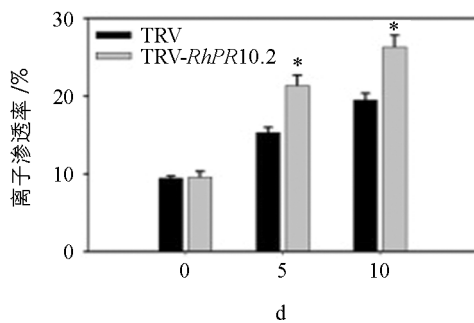


\* 表示显著性差异  $p < 0.05$ , \*\* 表示显著性差异  $p < 0.01$ .

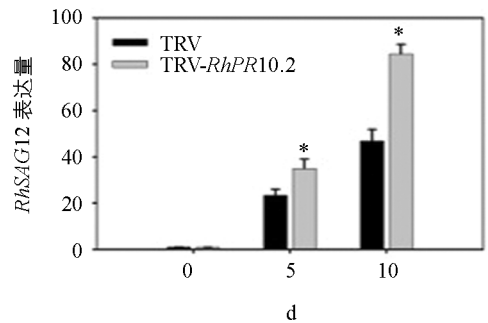
图 5 *RhPR10.2* 基因异位过表达分析

## 2.6 *RhPR10.2* 基因沉默分析

为进一步明确 *RhPR10.2* 在月季花瓣衰老调控中的生物学功能, 我们构建了 VIGS(病毒诱导的基因沉默)载体 pTRV-*RhPR10.2*, 采用 Wu 等<sup>[16]</sup>的方法在月季花瓣 discs 中进行了 *RhPR10.2* 基因沉默处理. 结果表明, 较 TRV 对照相比, 沉默 *RhPR10.2* 基因显著加速月季花瓣 discs 衰老进程(图 6 a), 同时伴随着更高的离子渗透率(图 6 b)以及衰老 marker 基因 *RhSAG12* 的表达(图 6 c).

(a) *RhPR10.2* 基因沉默表型图

(b) 离子渗透率

(c) *RhSAG12* 表达谱

a. *RhPR10.2* 基因沉默表型图; b. 离子渗透率; c. *RhSAG12* 表达谱 (\* 表示显著性差异  $p < 0.05$ ).

图 6 *RhPR10.2* 基因沉默分析

### 3 讨 论

在前期工作中,我们已经证明了一个受衰老和乙烯诱导的月季 *RhPR10.1* 基因,通过影响月季花朵内的细胞分裂素含量进而调控月季花朵衰老<sup>[16]</sup>.为进一步解析 *RhPR10.1* 同源基因在月季花瓣衰老中的作用机制,本研究从月季‘萨曼莎’花瓣中克隆得到一个 *RhPR10.1* 同源基因 *RhPR10.2*,并对其编码蛋白的特性及生物学功能进行了分析.研究表明, *RhPR10.2* 基因表达量受月季花瓣衰老显著诱导,ORF(开放阅读框)为 483 bp,编码 160 个氨基酸,含有 PR-10 家族高度保守的 P-loop 基序,该基序可能与核糖核酸酶活性<sup>[22]</sup>、亲水配基(细胞分裂素与油菜素内酯)绑定功能<sup>[22]</sup>以及次生代谢生物酶功能<sup>[23]</sup>相关.系统进化树分析表明,该蛋白与葡萄 *VvPR10.1* 蛋白亲缘关系最近.

从第一个 PR-10 家族蛋白发现至今<sup>[24]</sup>,人们已对其在不同植物抗病中的功能进行了大量研究<sup>[25-26]</sup>;然而某些植物的 PR-10 家族蛋白呈组成型表达模式,推测可能参与植物的生长发育调控<sup>[21, 30]</sup>.在油菜 (*Brassica napus*)中异源过表达一个豌豆 (*Pisum sativum* L.)的 PR 10 蛋白,转基因植株在盐胁迫条件下的萌发率显著增加<sup>[27]</sup>.在野生型拟南芥中异源过表达 *ABR17* (一个 PR10 蛋白)也能增强盐胁迫以及低温胁迫下的萌发率<sup>[28]</sup>.此外,烟草中过表达一个花生 (*Arachis hypogaea*)的 PR10 蛋白基因 *AhSIPR10* 后, T1 代转基因烟草展现出增强的盐胁迫、重金属胁迫以及干旱胁迫耐受性<sup>[29]</sup>.本研究表明,异源过表达月季 *RhPR10.2* 基因的拟南芥(T2)纯合子植株,叶片衰老被显著延迟,伴随着更高的叶绿素含量及更低的离子渗透率.与之相反,运用 VIGS 方法在月季花瓣中沉默 *RhPR10.2* 基因,其花瓣的衰老进程被显著提前,且伴随着更高的离子渗透率及衰老 marker 基因 *RhSAG12* 的表达.

本研究对月季 *RhPR10.2* 的蛋白特性及生物学功能进行探索, 为解析 PR-10 家族基因在植物衰老中的调控作用提供了参考, 但 *RhPR10.2* 基因上游调控机制仍需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] LUO J, MAN, PEI H X, et al. A DELLA Gene, RhGAI1, Is A Direct Target of EIN3 and Mediates Ethylene-Regulated Rose Petal Cell Expansion via Repressing The Expression of RhCesA2 [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(16): 5075–5084.
- [2] 高俊平, 孙自然, 周山涛. 我国鲜切花远距离流通中减少损耗的基本途径 [J]. *北京农业大学学报* [J], 1995, 21(S1): 84–88.
- [3] JIN J, SHAN N, MA N, et al. Regulation of Ascorbate Peroxidase at The Transcript Level Is Involved in Tolerance to Postharvest Water Deficit Stress in The Cut Rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2006, 40(3): 236–243.
- [4] MA N, TAN H, LIU X, et al. Transcriptional Regulation of Ethylene Receptor and CTR Genes Involved in Ethylene-Induced Flower Opening in Cut Rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2763–2773.
- [5] TAN H, LIU X, MA N, et al. Ethylene-Influenced Flower Opening and Expression of Genes Encoding Etrrs, Ctrs, and Ein3sin Two Cut Rose Cultivars [J]. *Postharvest Biol Tec*, 2006, 40(2): 97–105.
- [6] 高俊平. 观赏植物采后生理与技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002, 14–75.
- [7] LIU D, LIU X, MENG Y, et al. An Organ-Specific Role for Ethylene in Rose Petal Expansion during Dehydration and Rehydration [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(8): 2333–2344.
- [8] MENG Y, MA N, ZHANG Q, et al. Precise Spatio-Temporal Modulation of ACC Synthase by MPK6 Cascade Mediates the Response of Rose Flowers to Rehydration [J]. *Plant J*, 2014, 79(6): 941–950.
- [9] MAYAK S, LEGGE RL, THOMPSON JE. Superoxide Radical Production by Microsomal Membranes from Senescing Carnation Flowers: An Effect of Membrane Fluidity [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(6): 1375–1380.
- [10] 白双义, 刘青林. 月季切花不同品种衰老征兆及瓶插寿命的比较 [J]. *园艺学报*, 2001, 28(4): 364–366.
- [11] 李永红, 张常青, 谭 辉, 等. 抗氧化剂对月季切花失水胁迫耐性和 SOD、POD 活性的影响 [J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(5): 14–17.
- [12] MA N, CAI L, LU W J, et al. Exogenous Ethylene Influences Flower Opening of Cut Roses (*Rosa hybrida*) by Regulating The Genes Encoding Ethylene Biosynthesis Enzymes [J]. *Science in China Series C*, 2005, 48(5): 434–444.
- [13] LÜ P T, ZHANG C Q, LIU J, et al. RhHb1 Mediates The Antagonism of Gibberellins to ABA and Ethylene during Rose (*Rosa hybrida*) Petal Senescence [J]. *Plant J*, 2014, 78(4): 578–590.
- [14] ROGERS H J. From Models to Ornamentals: How Is Flower Senescence Regulated? [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 82(6): 563–574.
- [15] HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, VANEK-KREBITZ M, RADAUER C, et al. Genomic Characterization of Members of The Bet v 1 Family: Genes Coding For Allergens and Pathogenesis-Related Proteins Share Intron Positions [J]. *Gene*, 1997, 197(1–2): 91–100.
- [16] WU L, MA N, JIA Y C, et al. An Ethylene-Induced Regulatory Module Delays Flower Senescence by Regulating Cytokinin Content [J]. *Plant Physiol*, 2016, 173(1), pp. 01064.
- [17] WAN C, WILKINS T A. A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances The Yield of High-Quality RNA From Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Anal Chem*, 1994, 223(1): 7–12.
- [18] CLOUGH S H, BENT A F. Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2010, 16(6): 735–743.
- [19] 赵佳福, 苟维胜, 段志强, 等. 从江香猪 LMF1 基因的克隆、亚细胞定位及组织表达研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(12): 38–43.
- [20] 李 胜, 黄时海, 张 艳, 等. 水牛 STAT5a 和 STAT5b 基因启动子克隆及其活性分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(1): 1–8.
- [21] WALLTER M H, LIU J, WUNN J, et al. Bean Ribonuclease-Like Pathogenesis-Related Protein Genes (Yprl0) Display Complex Patterns of Developmental, Dark-Induced and Exogenous-Stimulus-Dependent Expression [J]. *Eur. J. Biochem*, 2010, 239(2): 281–293.
- [22] PASTERNAK O, BUJACZ G D, FUJIMOTO Y, et al. Crystal Structure of *Vigna radiata* Cytokinin-Specific Binding Protein in Complex with Zeatin [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2622–2634.
- [23] LIU J, EKRAMODDOULLAH A K M. The Family 10 of Plant Pathogenesis-Related proteins: Their Structure, Regu-

- lation, and Function in Response to Biotic and Abiotic Stresses [J]. *PhysiolMol Plant P*, 2006, 68(1): 3–13.
- [24] BUFE A, SPANGFORT M D, KAHLERT H, et al. The Major Birch Pollen Allergen, Bet v 1, Shows Ribonuclease Activity [J]. *Planta*, 1996, 199(3): 413–415.
- [25] CHOI D S, HWANG I S, HWANG B K. Requirement of The Cytosolic Interaction Between PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN10 and LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN1 for Cell Death and Defense Signaling in Pepper [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(4): 1675–1690.
- [26] XU T, ZHAO X, JIAO Y, et al. A Pathogenesis Related Protein, VpPR-10. 1, From *VitisPseudoreticulata*: An Insight of Its Mode of Antifungal Activity [J]. *Plos One*, 2014, 9(4): e95102.
- [27] SRIVASTAVA S, EMERY R J N, KUREPIN L V, et al. PeaPR 10. 1Is ARibonucleaseand Its Transgenic Expression Elevates CytokininLevels [J]. *Plant Growth Regul*, 2006, 49(1): 17–25.
- [28] SRIVASTAVA S, EMERY R J N, RAHMAN M H, et al. A Crucial Role for Cytokininsin Pea ABR17-Mediated Enhanced Germination and Early Seedling Growth of *Arabidopsis thaliana* under Saline and Low-Temperature Stresses [J]. *J Plant Growth Regul*, 2007, 26(1): 26–37.
- [29] JAIN S, SRIVASTAVA S, SARIN N B, et al. Proteomics Reveals Elevated Levels of PR 10 Proteins in Saline-Tolerant Peanut (*Arachishypogaea*) Calli [J]. *Plant PhysiolBiochem*, 2006, 44(4): 253–259.
- [30] FERNANDES H, PASTERNAK O, BUJACZ G, et al. *LupinusLuteus*Pathogenesis-Related Protein as AReservoir for Cytokinin [J]. *J MolBiol*, 2008, 378(5): 1040–1051.

## Cloning and Biology Functional Characteristic of *RhPR10. 2* in Rose (*Rosa hybrida*)

WU Lin<sup>1,2</sup>, LI Hong-lei<sup>1,2</sup>, JIANG Yu-song<sup>1,2</sup>,  
LI Xiao-ying<sup>2</sup>, WANG Xian-feng<sup>3</sup>

1. *Chongqing Key Laboratory of Economic Plant Biotechnology, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402168, China;*

2. *Institute of Special Plants, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402168, China;*

3. *Economic Crop Technology Promotion Station of Yongchuan, Yongchuan Chongqing 402168, China*

**Abstract:** In order to understand the role of PR-10 family gene *RhPR10. 2* in the regulation of rose petal senescence, real time PCR was used to explore the expression of *RhPR10. 2* in rose petals of different opening stages, RACE PCR was used for cloning the full length of *RhPR10. 2*. In addition, pSuper1300-*RhPR10. 2* and pTRV2-*RhPR10. 2* vectors were constructed for the analysis of the biological function of *RhPR10. 2*. The results showed that the expression of *RhPR10. 2* was significantly induced by rose petal senescence. Its open reading frame was 483 bp, encoding a protein of 160 amino acids. RhPR10. 2 protein had a typical P-loop motif which was conserved in PR-10 protein family. The molecular formula of this protein was C<sub>796</sub>H<sub>1250</sub>N<sub>204</sub>O<sub>239</sub>S<sub>2</sub>, with a molecular weight of 17 566. 02, and a theoretical pI of 6. 07. Phylogenetic tree analysis suggested that *RhPR10. 2* had the highest similarity with *Vitisvinifera* VvPR10. 1. To evaluate the biological role of *RhPR10. 2*, transgenic arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) was observed. Compared with wild type (WT), *RhPR10. 2* transgenic T2 plants showed that the senescence of leaves was significantly delayed, accompanying with marked higher content of chlorophyll and significant lower ion leakage. On the contrary, compared with TRV2 control, *RhPR10. 2* gene silence markedly promoted rose petal senescence, accompanying with significant higher ion leakage and senescence marker gene Rh-SAG12 expression.

**Key words:** rose (*Rosa hybrida*); *RhPR10. 2*; gene silence; petal senescence

责任编辑 欧 宾