

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.03.006

# 响应月季花朵衰老的 *RhRRs* 基因 筛选及表达特性分析

吴 林<sup>1</sup>, 刘 燃<sup>2</sup>, 吴冬琴<sup>3</sup>, 刘奕清<sup>4</sup>

1. 重庆文理学院 经济植物生物技术重庆市重点实验室/重庆市特色植物种苗工程技术研究中心, 重庆 永川 402168;
2. 重庆市幅沅农业生物技术研究院有限公司, 重庆 永川 402168;
3. 重庆市永川民进学校, 重庆 永川 402168; 4. 长江大学 园艺园林学院/园艺植物研究院, 湖北 荆州 434025

**摘要:** 为筛选响应月季花朵衰老的 *RhRRs* 基因以及分析其表达特性, 采用 RT-PCR, RACE PCR 以及 MEGA 等生物技术方法, 检测了 *RhRRs* 基因在月季花朵不同开放阶段的表达谱, 克隆了 *Rh39694* 基因全长, 开展了进化树分析。结果表明, *RU39694* 与 *RU12149* 的表达谱受月季花朵衰老显著抑制; 其中 *RU39694* 基因全长 1 292 bp, 开放阅读框(ORF)为 738 bp, 编码 245 个氨基酸, 含有 A 类 *RRs* 蛋白特有的 DDK 基序, 蛋白分子式为  $C_{1176}H_{1912}N_{324}O_{401}S_{12}$ , 分子量为 27.39 kDa, 等电点(pI)为 4.88; *RU39694* 蛋白与拟南芥 *ARR8*, *ARR9* 亲缘关系最近, 被命名为 *RhRR9*; 此外, *RhRR9* 的表达谱受外源细胞分裂素(6-BA)处理显著诱导, 而被脱落酸(ABA)与乙烯( $C_2H_4$ )处理显著抑制, 推测可能在植物激素(细胞分裂素、脱落酸、乙烯)拮抗调控月季花朵衰老中发挥重要功能。

**关键词:** 月季; 响应调节因子; 细胞分裂素; 花朵衰老

**中图分类号:** S685.12; Q945.48

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2020)03-0035-08

月季切花作为世界切花产业的重要组成部分, 年贸易额可达全球切花总贸易额的 30% 以上<sup>[1]</sup>。然而, 在其采后流通过程中, 极易遭受外源乙烯、失水胁迫等不利因素影响, 引起花朵开放异常(僵花、僵蕾、提前衰老等), 造成巨大的采后损耗<sup>[2]</sup>。因此, 如何延长月季切花采后品质已成为国际研究热点。

月季花朵衰老受外源植物激素调控, 其中乙烯( $C_2H_4$ )与脱落酸(ABA)促进衰老, 细胞分裂素(CTKs)与赤霉素(GAs)延缓衰老<sup>[3]</sup>。通过比较不同月季品种的内源细胞分裂素含量发现, 月季切花采后瓶插寿命与内源细胞分裂素含量成正相关, 细胞分裂素含量越高的月季品种, 往往具有更长的瓶插寿命<sup>[4]</sup>。外源细胞分裂素处理可有效延长月季、香石竹、矮牵牛等切花的采后瓶插寿命<sup>[5]</sup>; 此外, 应用 6-甲基嘌呤(一种细胞分裂素脱氢酶/氧化酶抑制剂)也能有效延缓花朵衰老<sup>[6]</sup>。与之相反, 在香石竹衰老的花瓣中发现, 2 个编码细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因的转录本被显著诱导<sup>[7]</sup>。

细胞分裂素信号转导途径首次报道至今, 其转导机制已逐渐被阐明<sup>[8]</sup>。作为细胞分裂素信号转导途径中的重要组成部分, 拟南芥的 22 个响应调节因子(Response Regulators / *RRs*)基于氨基酸序列相似程度, 被划分为 A、B 两大类。其中, *ARR3-9, 15-17* 属于 A 类 *RRs*; *ARR1-2, 10-14, 18-21* 属于 B 类 *RRs*<sup>[9]</sup>。研究发现, *RRs* 基因广泛参与植物生长发育调控。例如, 拟南芥 A 类 *RRs* 基因 *ARR4* 可通过改变红光敏感性进而参与了植物发育调节<sup>[10]</sup>。在根部具有高表达丰度的 A 类狗蔷薇 *RRs* 基因 *RcRR1*, 通过减少外植体的细胞分裂素敏感性以及改变生长素分布, 在细胞分裂素诱导的器官再生中发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。一个杨树的 B

收稿日期: 2018-10-03

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); 重庆文理学院人才引进项目(R2016TZ04); 重庆市园艺学重点学科项目(2017ZDXK017)。

作者简介: 吴 林(1986—), 男, 副教授, 博士, 主要从事园艺作物采后逆境与生理研究。

通信作者: 刘奕清, 教授, 博士。

类 *RRs* 基因 *PtRR13*, 通过改变维管形成负调节基因 *CONTINUOUS VASCULAR RING1*、生长素转运子基因 *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE TRANSPORTER9* 以及 2 个乙烯响应基因 *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* 的表达量, 进而负调控杨树不定根发育<sup>[12]</sup>。拟南芥 B 类 *RRs* 基因 *ARR1*, *ARR10* 与 *ARR12* 三重突变体研究发现, *ARR1*, *ARR10*, *ARR12* 共同通过维持细胞膜完整性、增强色素合成、提高脱落酸(ABA)敏感性以及减少气孔导度进而负调控植物的干旱耐性<sup>[13]</sup>。此外, *ARR2* 基因过表达拟南芥植株表现出促进主根伸长、延缓叶片衰老等表型<sup>[14]</sup>。

然而, 迄今为止, 关于月季 *RhRRs* 基因是否参与了花朵衰老调控仍然未知。本研究以切花月季 *Samantha* 为试材, 明确了细胞分裂素调控月季切花采后瓶插寿命的作用规律; 获得 2 个受月季花朵衰老显著调节的 *RhRRs* 基因 *RU39694* 与 *RU12149*; 克隆 *RU39694* 基因全长序列, 进行同源基因的蛋白序列比对及进化树分析, 并检测该基因对不同植物激素的应答特性, 旨在为解析 *RhRRs* 基因调控月季花朵衰老奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和植物激素处理

试验在中国农业大学进行。月季切花 *Rosa hybrida Samantha* 采自中国农业大学花圃。采摘标准参考 Ma 等<sup>[15]</sup>2005 年制定的标准。

植物激素处理: 植物激素浓度参考 Lyu 等<sup>[16]</sup>的用量标准。将平衡 2 h 后且无病害的 Stage 2 月季切花分别置于含有  $GA_3$  100  $\mu\text{mol/L}$ 、6-BA 100  $\mu\text{mol/L}$  以及 ABA 100  $\mu\text{mol/L}$  的处理液中 24 h, 对照组仅为 SDW。处理结束后, 将月季切花转移至设定好的环境中瓶插, 环境温度( $22 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度 60%, 1 d 中光照设置 16 h、黑暗 8 h。

乙烯处理: 将月季切花置于密闭的 64 L 玻璃箱内, 注入浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  乙烯气体, 处理 24 h。为防止  $\text{CO}_2$  积累, 需在箱内放置 1 mol/L NaOH 溶液。对照组玻璃箱内无乙烯。

### 1.2 总 RNA 提取与 RT-PCR 检测

分别摘取月季花朵的第 3 层花瓣, 液氮速冻后备用。月季花瓣总 RNA 提取参考 Hot Borate 法<sup>[17]</sup>, 并做部分修改。反转录采用 Vazyme 公司 HiScript  $\text{C}^{\circ}$  II Q Select RT Supermix for qPCR 试剂盒, 反应条件为: 25  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 min。RT-PCR 检测采用 CWBIO 公司的 2 $\times$ Taq Master Mix 试剂盒, 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min (循环); 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。月季 *RhActin5* 为内参基因。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行分离。引物及其序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'~3')
RU28916-F	TTGGACTGGAGATGGACCTG
RU28916-R	GCATCGTCGTCCTCATCTTT
RU12149-F	CCCCTTCTTCCAAACACCT
RU12149-R	AGTTCCGAAGAAGCTCACGTC
RU39694-F	TGATAGCAGCATTGACAGTAGC
RU39694-R	ACTATCACACCACGCCAAACC
RU02862-F	TAAGCGTTCCCTTCTCCACCT
RU02862-R	GTAGCCTGGGAGCAAAGTGT
<i>RhActin5</i> -F	CCATGAGACCACATACAATTTCG
<i>RhActin5</i> -R	CAGCAGTAAGCCTACAAGGTCATA
<i>RhRR9</i> -F1	ATCAGAACAAGAGGGCTCAAAAGT
<i>RhRR9</i> -F2	TCTTCTCGTGATAGCAGCATTGAC
<i>RhRR9</i> -R1	CATCCCCAGAGTCCACACAAGT
<i>RhRR9</i> -R2	TGATGGAGTAGTGGGTGTGAGG

### 1.3 基因克隆

基因克隆参考 Wu 等<sup>[18]</sup>的方法, 并稍作修改。

*RhRR9* 基因 3' 端克隆: 通过实验室转录组数据库(<http://bioinfo.bti.cornell.edu/rose>)提供的序列, 设计特异上游引物 *RhRR9*-F1, F2, 分别与 3'-RACE 试剂盒提供的 2 条下游引物进行 2 轮巢式 PCR.

*RhRR9* 基因 5' 端克隆: 根据已获得的 *RhRR9* 基因序列, 设计两条特异下游反向引物 *RhRR9*-R1, R2, 利用 5'-RACE kit 试剂盒提供的 5' RACE outer primer 及 5' RACE inner primer 进行 2 轮巢式 PCR.

扩增产物采用 Takara 公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 连接采用 pGEM T-Easy vector, 转化采用大肠杆菌 *DH5 $\alpha$* , 经蓝白斑筛选后, 阳性克隆送至三博远志公司测序.

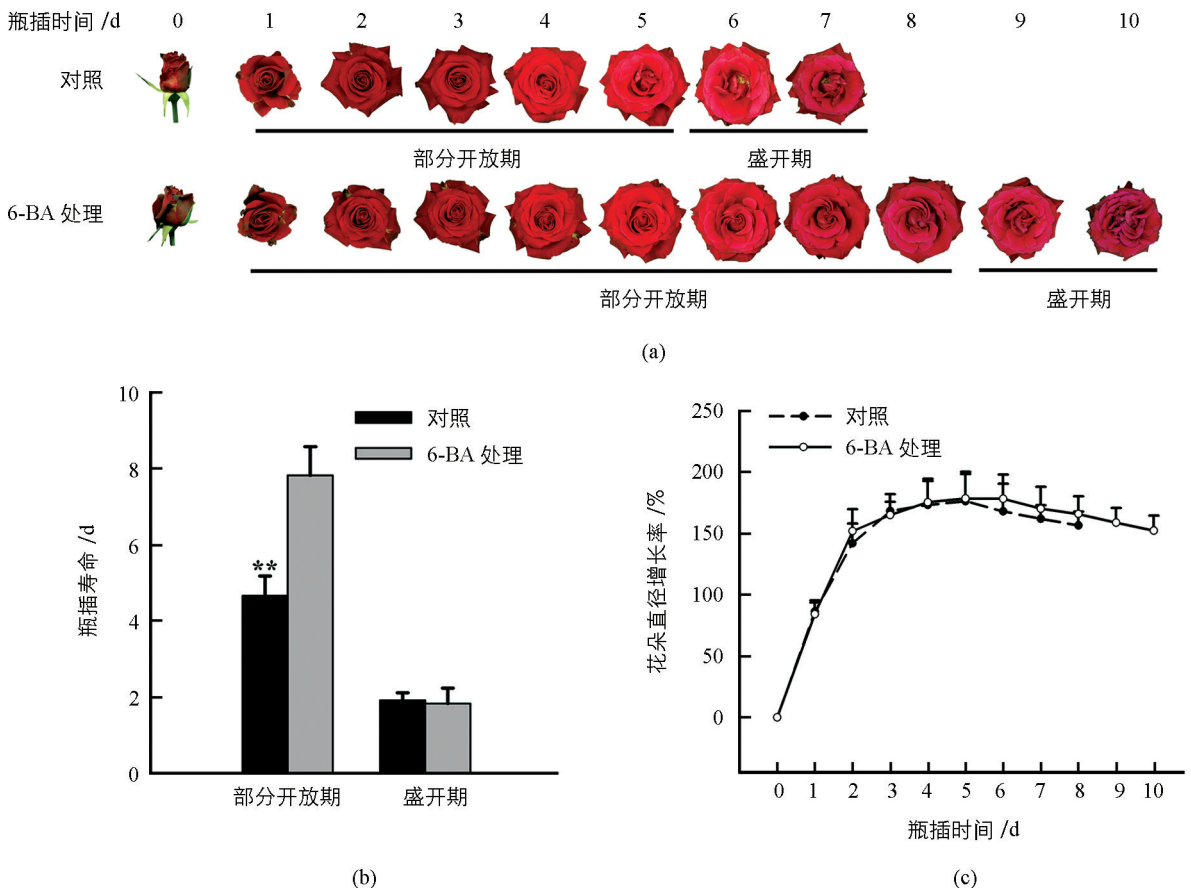
#### 1.4 蛋白特性及系统进化树分析

通过 DNAMAN 5.0 将 *RhRR9* 基因全长 ORF 序列翻译成氨基酸, 并利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)分析其蛋白特性. *RhRR9* 蛋白同源序列分析采用 Clustal 及 BioEdit, 系统进化树分析采用 MEGA 5.0.

## 2 结果与分析

### 2.1 外源细胞分裂素处理对月季切花采后品质保持的作用效果

根据 Ma 等<sup>[15]</sup>以及 Wu 等<sup>[18]</sup>的研究结果, 月季切花采后品质分为 3 个阶段, 2~4 级为部分开放期 (Partially opened stage), 5 级为盛开期 (Fully opened stage), 6 级为衰老期 (Senescent stage). 本试验以 2 级月季切花为试材, 分别观察了外源细胞分裂素处理对月季切花采后品质保持的作用效果(图 1). 如图 1a, 1b 所示, 细胞分裂素处理能显著延长月季切花瓶插寿命, 其作用阶段主要在部分开放期 (Stage 2~4), 瓶插天数由对照组的 4.67 d 延长至 7.83 d; 而盛开期 (Stage 5) 并无显著差异, 处理组和对照组分别为 1.83 d 与 1.91 d. 此外研究表明, 外源细胞分裂素处理对月季切花花朵直径增长率无显著影响(图 1c).

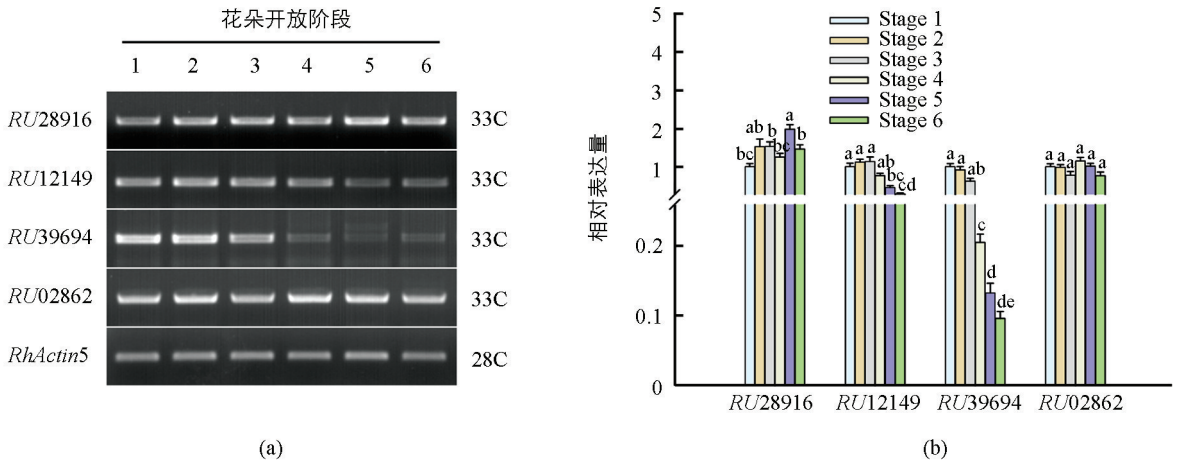


a 为细胞分裂素处理对月季切花开放情况; b 为细胞分裂素处理对月季切花采后不同开放阶段瓶插寿命的影响; c 为细胞分裂素处理对月季切花采后花朵直径增长率的影响. “\*\*”表示对照和处理间差异具有统计学意义 ( $p \leq 0.01$ ).

图 1 细胞分裂素处理对月季切花采后品质的影响

## 2.2 响应月季花朵衰老的 *RhRRs* 基因筛选

为获得响应月季花朵衰老的 *RhRRs* 基因,从实验室月季花朵发育转录组数据库 ([http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/rose\\_454/index.cgi](http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/rose_454/index.cgi))中共筛选获得了 4 条注释为 *RhRRs* 的 EST 序列,分别为: *RU28916*, *RU12149*, *RU39694* 以及 *RU02862*. 根据已知序列分别设计特异引物,利用 RT-PCR 方法对其在月季花朵开放和衰老 (stage 1-6) 进程中的表达谱进行了检测 (图 2a), 并运用 AlphasamplerTM2200 软件进行了数据量化 (图 2b). 如图 2 所示, *RU28916* 与 *RU02862* 两个基因的表达量在月季花朵开放和衰老进程中均无显著变化; *RU12149* 基因从 stage 5 开始呈显著下降趋势,到 stage 6 时其表达量为 Stage 4 级的 1/3; *RU39694* 基因在花朵部分开放阶段 (Stage 1~3) 保持了较高的表达水平,且没有显著差异,然而从 stage 4 开始急剧下降,到 stage 6 时其表达量仅为 Stage 3 的 1/10; 推测 *RU39694* 与 *RU12149* 基因可能参与了月季花朵衰老进程. 基于 4 个 *RhRRs* 基因在月季花朵不同开放阶段的表达谱,选择在月季花朵采后衰老进程中表达变化最为显著的 *RU39694* 作为候选基因进行进一步研究.



a 为 *RhRRs* 基因在月季花朵不同开放阶段的 RT-PCR 检测结果, 33C 表示 33 循环, 28C 表示 28 循环; b 为 *RhRRs* 基因在月季花朵不同开放阶段的表达谱凝胶量化结果, Stages 表示花朵开放阶段, 组内不同小写字母表示不同阶段差异有统计学意义 ( $p \leq 0.05$ ).

图 2 *RhRRs* 基因在月季花朵不同开放阶段的表达谱检测

## 2.3 *RU39694* 基因全长克隆及系统进化树分析

通过 RACE PCR 方法克隆得到 *RU39694* 基因全 1 292 bp, 其中含有 258 bp 5'-UTR, 296 bp 3'-UTR, ORF 序列 738 bp, 共编码 245 个氨基酸序列; 将其与拟南芥 22 个 RRs 蛋白序列进行系统进化树分析发现 (图 3), *RU39694* 蛋白属于 A 类 RRs 蛋白, 且与拟南芥 ARR8 以及 ARR9 亲缘关系最近, 因此命名为 *RhRR9*.

## 2.4 *RhRR9* 蛋白特性及同源序列比对分析

通过 ProtParam 分析发现, *RhRR9* 蛋白分子式为  $C_{1176}H_{1912}N_{324}O_{401}S_{12}$ , 分子量为 27.39 kDa, 半衰期在酵母 (Yeast) 中大于 20 h, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中大于 10 h, 亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.613, 为疏水性蛋白; *RhRR9* 蛋白肽链负电荷残基 (Asp + Glu) 为 39, 正电荷残基 (Arg + Lys) 为 28, 推定的等电点为 4.88.

通过与草莓 (*Fragaria vesca*)、梅花 (*Prunus mume*)、苹果 (*Malus domestica*)、梨 (*Pyrus x bretschneideri*) 等同源基因氨基酸序列比对发现 (图 4), *RhRR9* 序列含有 A 类 RRs 基因特有保守结构域, 含有“DDK”基序, 同时序列中间存在 11~21 个不同的氨基酸残基, 且蛋白序列 C 端均不相同.

## 2.5 *RhRR9* 基因的植物激素诱导特性分析

为进一步明确 *RhRR9* 基因的植物激素诱导特性, 利用 RT-PCR 方法检测了不同植物激素处理后的表达谱 (图 5a), 并运用 AlphasamplerTM 2200 软件进行了量化 (图 5b). 结果显示, *RhRR9* 基因表达谱受外源植物激素中的细胞分裂素显著诱导, 而被 ABA、乙烯显著抑制, 但其表达量不受外源赤霉素的影响.

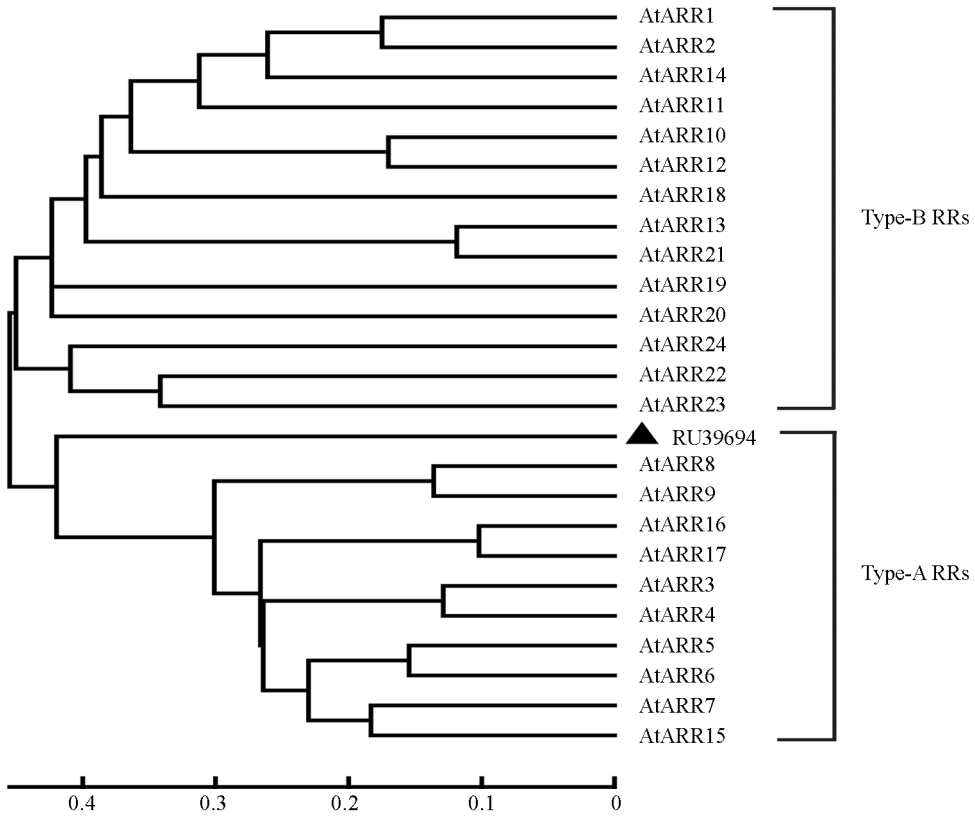
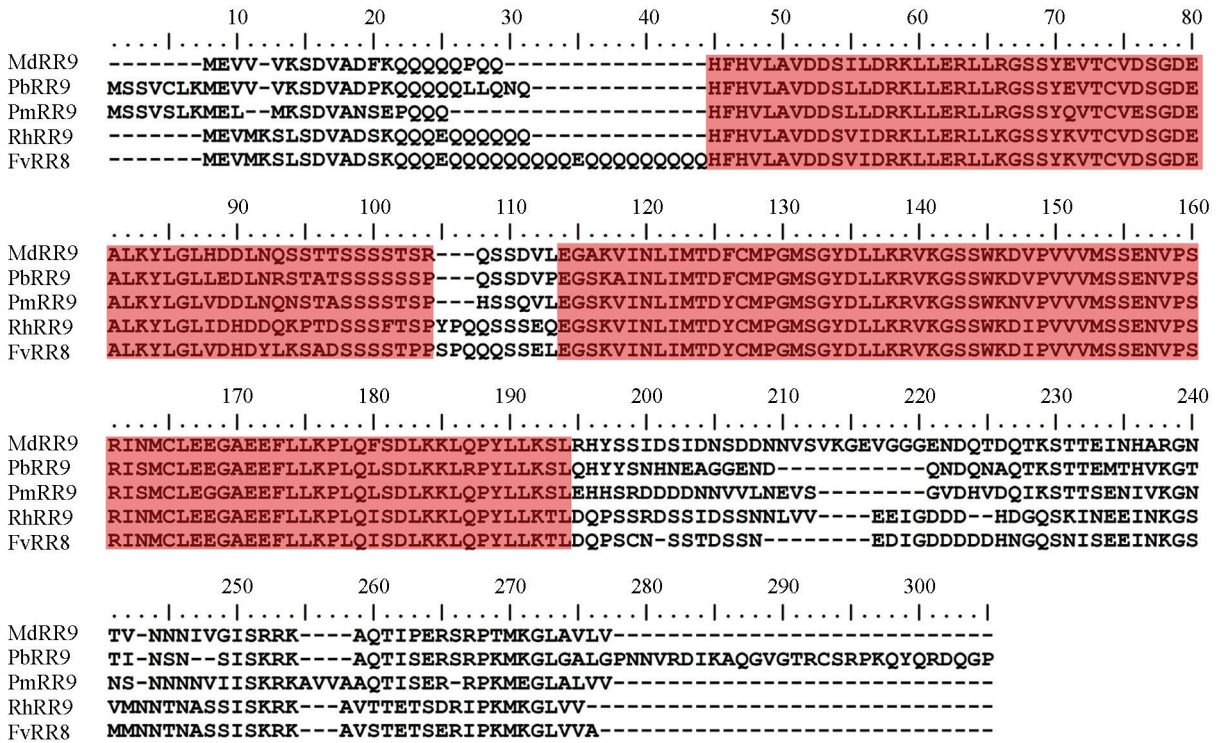
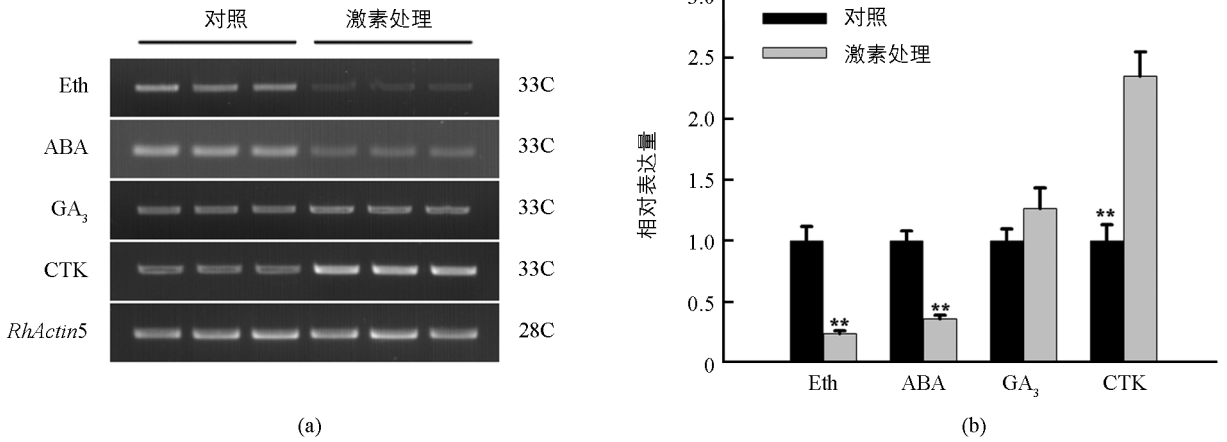


图 3 RU39694 与拟南芥 RRs 蛋白的系统进化树分析



MdRR9 为苹果 MdRR9 (NCBI 登录号: XP\_008382445.1), PbRR9 为梨 PbRR9 (XP\_009351080.1), PmRR9 为梅花 PmRR9 (XP\_008219624.1), FvRR8 为草莓 FvRR8 (XP\_004290880.1), 红色部分表示 A 类 RRs 基因保守结构域。

图 4 月季 PhRR9 与其他植物同源氨基酸序列比对



a 为诱导特性 RT-PCR 检测结果, b 为诱导特性的凝胶量化值. Eth 表示乙烯, ABA 表示脱落酸, GA<sub>3</sub> 表示赤霉素, CTK 表示细胞分裂素, *RhActin5* 表示内参基因, 33C 表示 33 循环, 28C 表示 28 循环; “\*\*”表示对照和处理间差异具有统计学意义( $p \leq 0.01$ ).

图 5 *RhRR9* 基因对不同植物激素的诱导特性检测

### 3 讨论与结论

外源细胞分裂素处理可有效延长月季切花采后瓶插寿命<sup>[19]</sup>, 主要通过减少月季切花离子渗透率, 增强抗氧化酶、过氧化氢酶以及过氧化物酶活性<sup>[20]</sup>. 在分子水平, RhHB6-RhPR10.1 模块通过调控月季花朵内源细胞分裂素含量进而拮抗乙烯诱导的月季花朵衰老<sup>[18]</sup>; 最新研究表明, RhERF113 也通过改变月季花朵内源细胞分裂素含量参与了月季花朵衰老进程<sup>[21]</sup>. 然而, 外源细胞分裂素处理在月季切花采后哪一阶段发挥作用, 及其是否影响花径增长率仍然未知. 本试验以月季 Samantha 为试材, 系统研究了外源细胞分裂素处理对月季切花采后品质保持的作用效果以及作用规律. 结果表明: 外源细胞分裂素处理可有效延长月季切花采后瓶插寿命, 作用效果主要体现在花朵部分开放期(Stage 2-4), 由对照的 4.67 d 延长至 7.83 d, 而花朵盛花期(Stage 5)无显著差异; 此外, 细胞分裂素处理对月季切花采后花朵直径增长率无显著效果.

作为细胞分裂素信号转导途径的重要组成部分, 越来越多的响应调节因子(Response regulators)基于其特有的蛋白结构特性从不同物种中被鉴定, 如拟南芥<sup>[13]</sup>、狗蔷薇<sup>[11]</sup>、杨树<sup>[12]</sup>等. 研究发现, *RRs* 基因可能参与植物衰老调控; 例如, 拟南芥 *ARR5* 基因的表达量受叶片衰老显著抑制<sup>[22]</sup>; 过表达 *ARR2* 的拟南芥叶片的衰老被延迟<sup>[14]</sup>. 为筛选响应月季花朵衰老的 *RhRRs* 基因, 本研究从月季转录组数据中得到 4 条 *RhRRs* 基因的 EST 序列, 并对其在月季花朵开放进程中的表达谱进行了检测. 其中 *RU39694* 基因的表达谱受月季花朵衰老显著抑制; 其全长 ORF(开放阅读框)为 738 bp, 编码 245 个氨基酸序列, 含有 A 类 *RRs* 基因特有的“DDK”保守基序, 属于 A 类 *RRs* 家族基因; 系统进化树分析表明, 该蛋白与拟南芥 *AtARR8*, *AtARR9* 亲缘关系最近. 同时, *RhRR9* 基因的表达谱受外源细胞分裂素处理显著诱导; 该表达特性与前人报道的 A 类 *RRs* 基因表达谱受外源细胞分裂素处理显著诱导相一致<sup>[9]</sup>. 此外, *RhRR9* 基因表达谱可被外源 ABA 和乙烯处理显著抑制, 可能与 ABA、乙烯处理加速月季衰老有关<sup>[16, 18]</sup>.

本研究明确了外源细胞分裂素处理延长月季切花采后品质期的主要作用阶段, 获得了一个响应月季花朵衰老且被外源细胞分裂素显著诱导、ABA 与乙烯显著抑制的 *RhRR9* 基因. 该结果为解析 *RhRRs* 基因在调控月季花朵衰老中的作用机理提供了参考, 但 *RhRR9* 基因的生物学功能仍需进一步阐明.

## 参考文献:

- [1] LUO J, MA N, 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]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 5075-5084.
- [2] 吴林, 李洪雷, 姜玉松, 等. 月季 *RhPR10.2* 基因克隆及生物学功能分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(8): 8-15.
- [3] ROGERS H J. From Models to Ornamentals: How is Flower Senescence Regulated? [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(6): 563-574.
- [4] MAYAK S, HALEVY A H. Cytokinin Activity in Rose Petals and Its Relation to Senescence [J]. *Plant Physiology*, 1970, 46(4): 497-499.
- [5] TAVERNER E, LETHAM D, WANG J, et al. Influence of Ethylene on Cytokinin Metabolism in Relation to Petunia Corolla Senescence [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(3): 341-347.
- [6] TAVERNER E A, LETHAM D S, WANG J, et al. Inhibition of Carnation Petal Inrolling by Growth Retardants and Cytokinins [J]. *Functional Plant Biology*, 2000, 27(4): 357.
- [7] HOEBERICHTS F A, VAN DOORN W G, VORST O, et al. Sucrose Prevents Up-regulation of Senescence Associated Genes in Carnation Petals [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(11): 2873-2885.
- [8] URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Two Component Systems in Plant Signal Transduction [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(2): 67-74.
- [9] HUTCHISON C E, KIEBER J J. Cytokinin Signaling in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(suppl 1): S47-S59.
- [10] SWEERE U. Interaction of the Response Regulator ARR4 with Phytochrome B in Modulating Red Light Signaling [J]. *Science*, 2001, 294(5544): 1108-1111.
- [11] GAO B, FAN L S, LI X X, et al. *RcRR1*, a *Rosa Canina* Type-A Response Regulator Gene, is Involved in Cytokinin-Modulated Rhizoid Organogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72914.
- [12] RAMÍREZ-CARVAJAL G A, MORSE A M, DERVINIS C, et al. The Cytokinin Type-B Response Regulator *PtRR13* is a Negative Regulator of Adventitious Root Development in *Populus* [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(2): 759-771.
- [13] NGUYEN K H, HA C V, NISHIYAMA R, et al. Arabidopsis Type B Cytokinin Response Regulators *ARR1*, *ARR10*, and *ARR12* Negatively Regulate Plant Responses to Drought [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): 3090-3095.
- [14] CHE P, LALL S, HOWELL S H. Acquiring Competence for Shoot Development in Arabidopsis: *ARR2* Directly Targets A-type *ARR* Genes That are Differentially Activated by CIM Preincubation [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3(2): 99-101.
- [15] MA N. 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.
- [16] LYU P, ZHANG C Q, LIU J T, et al. *RhHB1* Mediates the Antagonism of Gibberellins to ABA and Ethylene during Rose (*Rosa hybrida*) Petal Senescence [J]. *The Plant Journal*, 2014, 78(4): 578-590.
- [17] WAN C Y, WILKINS T A. A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L) [J]. *Analytical Biochemistry*, 1994, 223(1): 7-12.
- [18] WU L, MA N, JIA Y C, et al. An Ethylene-Induced Regulatory Module Delays Flower Senescence by Regulating Cytokinin Content [J]. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 853-862.
- [19] ALAEY M, BABALAR M, NADERI R, et al. Effect of Pre-And Postharvest Salicylic Acid Treatment on Physio-chemical Attributes in Relation to Vase-life of Rose Cut Flowers [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 61(1): 91-

94.

- [20] MORTAZAVI N N, NADERI R, KHALIGHI A, et al. The Effect of Cytokinin and Calcium on Cut Flower Quality in Rose (*Rosa hybrida*) cv Illona [J]. J Food Agric Environ, 2015, 5(3-4), 311-313.
- [21] KHASKHELI A J, AHMED W, MA C, et al. RhERF113 Functions in Ethylene-Induced Petal Senescence by Modulating Cytokinin Content in Rose [J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(12): 2442-2451.
- [22] KUDRYAKOVA N V, KUSNETSOV V V, SHTRATNIKOVA V Y, et al. Effects of Cytokinin and Senescence Inducing Factors on Expression of *PARR5-GUS* Gene Construct during Leaf Senescence in Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants [J]. Plant Growth Regulation, 2008, 56(1): 21-30.

## Screening and Expression Analysis of *RhRRs* Responding to Rose Flower Senescence

WU Lin<sup>1</sup>, LIU Ran<sup>2</sup>, WU Dong-qin<sup>3</sup>, LIU Yi-qing<sup>4</sup>

1. Chongqing Key Laboratory of Economic Plant Biotechnology / Chongqing Engineering Research Center for Special Plant Seedlings, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402168, China;
2. Chongqing Fuyuan Agricultural Biotechnology Research Institute Co. LTD, Yongchuan Chongqing 402168, China;
3. Chongqing Yongchuan Democratic Progressive School, Yongchuan Chongqing 402168, China;
4. Institute of Horticulture plants, College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou Hubei 434025, China

**Abstract:** In order to screen *RhRRs* in response to rose flower senescence and to analyze their expression patterns, RT-PCR was used to monitor expression profiles of *RhRRs* in rose flower at different flowering stages and after different plant growth regulators treatments. Additionally, RACE-PCR and MEGA were performed to clone the full length of *Rh39694* and to analyze phylogenetic tree, respectively. The results showed that among four *RhRRs*, the transcripts of both *RU39694* and *RU12149* were significantly repressed during rose flower senescence. The full length of *RU39694* was 1 292 bp, including an open reading frame of 738 bp. It encoded a protein of 245 amino acids with a typical DDK motif, which was conserved in Type-A RRs family. The formula of this protein was C<sub>1176</sub>H<sub>1912</sub>N<sub>324</sub>O<sub>401</sub>S<sub>12</sub> with a molecular weight of 27.39 kDa and a theoretical pI of 4.88. Phylogenetic tree analysis suggested that *RU39694* shared high similarity with *Arabidopsis* ARR8 and ARR9, and was designated *RhRR9*. Additionally, the expression of *RhRR9* was significantly induced by 6-BA treatment, while was strongly repressed by ABA or ethylene treatments. Taken together, these results supported an hypothesis that *RhRR9* may play a critical role in regulation of rose flower senescence via antagonism of cytokinin to ABA and ethylene.

**Key words:** *Rosa hybrida*; response regulator; cytokinin; flower senescence