

苹果*MpSNAT1*的克隆与表达特性分析

吴成成, 李婷, 赵芮嘉, 李保华, 梁文星, 王彩霞*

青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 以‘富士’和‘嘎啦’苹果(*Malus pumila*)叶片总RNA为模板, 克隆5-羟色胺-*N*-乙酰基转移酶(*SNAT*)基因, 利用DNAMAN、MEGA 5.1等软件对该基因进行生物信息学分析, 采用荧光定量PCR技术测定*SNAT*的表达水平。结果表明, 获得的苹果*SNAT*全长cDNA序列为750 bp, 编码249个氨基酸, 命名为*MpSNAT1* (登录号MF443136)。 *MpSNAT1*编码蛋白的理论分子量约27.8 kDa, 为非分泌型、亲水的不稳定蛋白, 具有乙酰基转移酶(GNAT)功能结构域。序列多重比对及系统进化树分析表明, *MpSNAT1*编码氨基酸序列与桃和拟南芥的同源性高, 一致性分别为91.2%和63.6%。炭疽叶枯病菌接种后, 苹果叶中*MpSNAT1*表达量升高, 但‘富士’和‘嘎啦’中基因上调水平和持续时间存在显著差异。此外, 外源褪黑素处理后, 苹果叶中*MpSNAT1*显著上调表达, 但外源水杨酸(SA)处理后, *MpSNAT1*表达量均不同程度降低, 表明该基因表达不受SA诱导。

关键词: 苹果; *MpSNAT1*; 克隆; 生物信息学; 基因表达

褪黑素(melatonin)化学名称为*N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, 在动物和人体中具有提高机体免疫力、调节睡眠、清除体内自由基、延缓衰老及抗肿瘤等作用, 已被开发成产品应用于人类保健和医疗(Carillo-Vico等2013; Reiter等2013)。在植物中, 褪黑素可作为生长调节剂参与多种生理过程, 如种子发芽、植物开花、叶片衰老及果实成熟(Arno和Hernández-Ruiz 2014; Zhang等2015; Kim等2016), 还可缓解各种生物和非生物胁迫对植物造成的伤害(Tan等2012; Yin等2013; Reiter等2015)。

植物中褪黑素的合成主要由色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)、色胺-5-羟化酶(tryptamine 5-hydroxylase, T5H)、5-羟色胺-*N*-乙酰基转移酶(serotonin *N*-acetyltransferase, *SNAT*)和*N*-乙酰基-5-羟色胺-甲基转移酶(*N*-acetylserotonin methyltransferase, ASMT)共同催化完成, 其中*SNAT*是褪黑素合成途径中的倒数第二个关键酶, 催化5-羟色胺转化成*N*-乙酰-5-羟色胺, 然后由该酶催化形成褪黑素。Kang等(2013)首次从水稻(*Oryza sativa*)中克隆了*OsSNAT1*, 研究发现该蛋白属于GCN5相关*N*-乙酰基转移酶(GCN5-related *N*-acetyltransferase, GNAT)超家族, 蛋白定位于叶绿体。随后, Park等(2014)报道, 克隆自火炬松(*Pinus taeda*)的*PtSNAT*也定位于叶绿体。Lee等(2014, 2015)从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了*AtSNAT*, 研究发现该基因敲除突变体褪黑素含量显著降低, 且更易受丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)侵染, 但*SNAT*在植物抗病中的作用机制尚不清楚。

苹果炭疽叶枯病(*Glomerella leaf spot*, GLS)是近年我国新发现的一种病害, 主要侵染苹果叶片和果实, 导致早期大量落叶并降低果实商品价值, 且该病流行性强, 已成为制约我国苹果产业健康发展的主要限制因子(Wang等2012, 2015)。不同苹果品种对炭疽叶枯病菌(*Glomerella cingulata*)的敏感性差异显著, ‘嘎啦’、‘金冠’、‘乔纳金’等品种高度感病, 而‘富士’、‘红星’等品种高抗, 因此, 利用抗病基因育种是克服苹果炭疽叶枯病的理想策略和有效途径(李保华等2013; Araujo和Stadnik 2013)。本实验室前期的转录组测序结果显示, 接种炭疽叶枯病菌后, 苹果*SNAT*显著上调表达(结果尚未发表), 推测其可能参与了苹果对炭疽叶枯病菌的抗病过程。本研究以‘富士’和‘嘎啦’苹果(*Malus pumila*)为材料, 克隆了*MpSNAT1*全长序列并进行生物信息学分析, 利用荧光定量PCR分析其表达模式, 以期为进一步研究*MpSNAT1*在苹果抗病中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验于2015~2017年在青岛农业大学山东省植物病虫害综合防控重点实验室进行。选用的植

收稿 2018-01-11 修定 2018-04-03

资助 国家重点研发计划(2016YFD0201122)、现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28)、山东省重点研发计划(2017CXGC0214)、山东省“泰山学者”建设工程专项、青岛农业大学大学生创新训练项目。

* 通讯作者(cxwang@qau.edu.cn)。

物材料取自三至四年生‘富士’和‘嘎啦’苹果(*Malus pumila* Mill.)幼树。

1.2 方法

1.2.1 植物总RNA提取和cDNA合成

总RNA提取根据植物柱式总RNA抽提纯化试剂盒(上海生工生物工程公司)的说明书进行, RNA的浓度和质量通过P330超微量分光光度计(德国Implen公司)检测, 保存于 -80°C 备用。反转录参照Prime Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (大连TaKaRa公司)说明书, 以 $5\ \mu\text{g}$ 总RNA为模板, Oligo(dT)₁₈为引物, 反转录成cDNA, 保存于 -20°C 备用。

1.2.2 苹果*MpSNAT1*的克隆

参照转录组测序数据(未发表)和苹果全基因组序列(Daccord等2017), 利用Oligo 7设计*MpSNAT1*的上下游引物(*MpSNAT1*Fwd: 5'-ATGCG-TACGCTCGGTGCTGCC-3'; *MpSNAT1*Rev: 5'-CTAATACTTTGGGTACCAAAACATGCC-3')。PCR扩增体系含 $12.5\ \mu\text{L}$ 2×PrimeSTAR Max DNA Polymerase (大连TaKaRa公司)、*MpSNAT1*Fwd和*MpSNAT1*Rev各 $0.5\ \mu\text{L}$ 、cDNA模板 $0.25\ \mu\text{L}$ 、 ddH_2O $11.25\ \mu\text{L}$ 。反应程序为: 95°C 预变性3 min; 95°C 变性10 s、 59°C 退火15 s、 72°C 延伸4 s, 35个循环; 72°C 延伸10 min。纯化PCR产物, 与载体pMD18T连接, 热击转化大肠杆菌DH5 α , 筛选阳性克隆提取质粒, 委托青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 *MpSNAT1*序列的生物信息学分析

利用ExPASy生物信息学网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)的ProtParam和SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto_mat.pl)在线软件分别预测*MpSNAT1*蛋白质的基本理化性质和二级结构, NetNGlyc 1.0和NetOGlyc 4.0 Server软件分析蛋白的氨基酸序列中N-糖基化位点和O-糖基化位点。将*MpSNAT1*全长序列通过NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中的BLAST进行同源性比对, 选择与其同源性较高的其他物种*SNAT*编码氨基酸序列, 利用DNAMAN和MEGA 5.1软件完成氨基酸序列的多重比对分析及系统发育树构建。

1.2.4 样品处理

选取健康‘富士’和‘嘎啦’完全展开叶片, 分别喷雾接种炭疽叶枯病菌孢子悬浮液(5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)、

$0.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 褪黑素和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸(salicylic acid, SA), 以喷雾无菌水的处理作为对照。于处理后0、6、12、24、48、72 h取样, 每处理设置3个生物学重复, 试验重复3次。

1.2.5 *MpSNAT1*的表达分析

提取样品总RNA, 参照Prime Script™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (大连TaKaRa公司)说明书的方法反转录成cDNA。利用Oligo 7软件设计*MpSNAT1*定量PCR检测引物(qPCR Fwd: 5'-TCTATGCCG-GATTGTTTCGTTTGA-3'; qPCR Rev: 5'-ACCG-GATTTAATGGATTCCCAAAAGC-3')。以苹果*EF1 α* 作为内参基因(Zhang等2016), 采用荧光定量PCR技术检测*MpSNAT1*的表达量。反应体系参照SYBR Premix Ex Taq试剂盒(大连TaKaRa公司)说明书, 含SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) $10.0\ \mu\text{L}$ 、qPCR Fwd和qPCR Rev各 $0.4\ \mu\text{L}$ 、cDNA模板 $1.0\ \mu\text{L}$ 、去离子水 $8.2\ \mu\text{L}$ 。定量PCR反应程序为: 95°C 预变性30 s; 95°C 变性5 s、 60°C 退火20 s、 72°C 延伸15 s, 40个循环。每处理3个生物学重复, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行基因表达量分析(Livak和Schmittgen 2001)。基因相对表达量为3次生物学重复的平均值 \pm 标准差(SD)。

2 实验结果

2.1 苹果*MpSNAT1*的克隆与序列分析

以‘富士’和‘嘎啦’cDNA为模板, 均扩增到一条大小约750 bp的特异性条带, 与预测片段大小相近(图1)。将条带进行克隆测序, 获得的核苷酸序列通过DNAMAN进行比对, 分析发现‘富士’和‘嘎啦’中所克隆的*SNAT*序列完全一致, 大小为750 bp, 编码249个氨基酸。在NCBI数据库中BLASTn比对发现该序列与桃(*Prunus persica*) *SNAT*序列相似性最高, 为89.1%, 与其他植物*SNAT*序列相似性也在60%以上; 通过BLASTp比对氨基酸序列发现, *MpSNAT1*编码的氨基酸序列与其他植物*SNAT*编码的一致性在60%以上。因此, 将苹果中克隆的基因命名为*MpSNAT1*, 并将序列上传至GenBank数据库(ID为MF443136)。

2.2 *MpSNAT1*编码蛋白的理化性质和二级结构预测

*MpSNAT1*编码蛋白的基本理化性质通过ExPASy的ProtParam在线分析软件推测, 结果显示该蛋白质理论分子量约27.8 kDa, 理论等电点6.01, 预

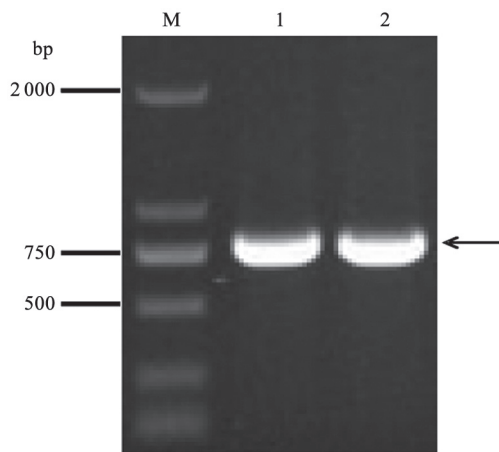


图1 苹果MpSNAT1的PCR扩增

Fig.1 PCR amplification of *MpSNAT1* from *M. pumila*

M: DNA分子量标准; 1: '富士'; 2: '嘎啦'。

测分子式为 $C_{1246}H_{1959}N_{335}O_{367}S_9$, 不稳定系数47.49, 平均疏水系数 -0.304 , 推测为亲水的不稳定蛋白。氨基酸序列中酸性氨基酸(Asp+Glu)多于碱性氨基酸数(Arg+Lys), 说明MpSNAT1蛋白带负电荷。此外, 该基因编码的氨基酸序列没有信号肽, 是一种非分泌型蛋白, 有4个N-糖基化位点, 4个O-糖基化位点, 属于Acetyltransf_7家族, 第165~235氨基酸为其保守结构域(图2)。MpSNAT1蛋白的二级结构主要由 α -螺旋、随机卷曲、 β -折叠和 β -转角4种结构类型组成。其中, α -螺旋含量最高, 占二级结

构中的38.15%, 说明MpSNAT1蛋白的二级结构是稳定的。

2.3 *MpSNAT1*编码氨基酸序列比对及系统进化树分析

将苹果MpSNAT1编码的氨基酸序列与桃和拟南芥SNAT编码的氨基酸序列进行多重比对, 结果显示, MpSNAT1编码的氨基酸序列与桃和拟南芥的同源性均较高, 相似性分别为91.2%和63.6%。通过NCBI保守域分析(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 发现苹果MpSNAT1蛋白具有一个GNAT功能结构域, 具有辅酶A结合位点, 推测该蛋白具有SNAT的功能(图2)。

利用NCBI的BLASTp进行同源性搜索, 对8个来自不同植物的SNAT氨基酸序列, 采用MEGA 5.1软件构建SNAT氨基酸序列系统发育树, 以蓝藻SNAT作为外部对照。结果显示, 苹果与拟南芥和桃聚在一个分支, 说明MpSNAT1与拟南芥、桃中SNAT的亲缘关系较近。高粱(*Sorghum bicolor*)、水稻、玉米(*Zea mays*)单独聚在一个分支, 与MpSNAT1亲缘关系较远, 可能与它们同属于单子叶植物有关。蓝藻单独为一个分支, 说明苹果MpSNAT1和植物来源的SNAT氨基酸同源性更高, 亲缘关系更近(图3)。

2.4 *MpSNAT1*的表达特性

苹果炭疽叶枯病菌孢子悬浮液喷雾接种'富



图2 苹果与其他2种植物SNAT编码的氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *SNAT* from *M. pumila* and other two plants

虚线处为保守结构域, 箭头为N-糖基化位点, 圆点为O-糖基化位点。

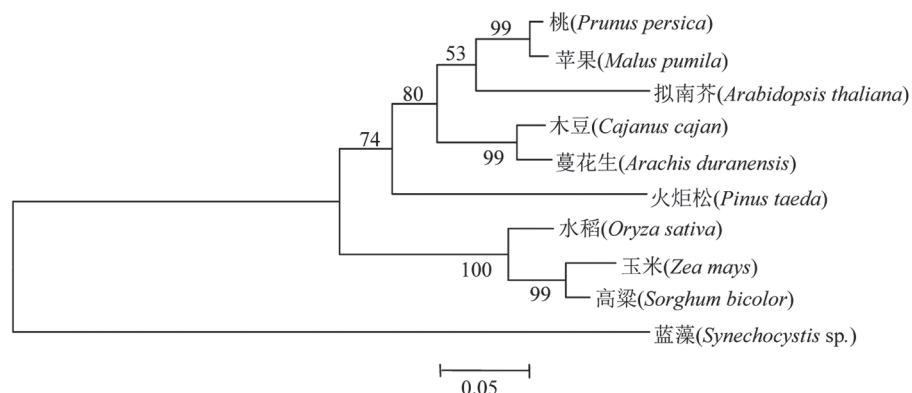


图3 苹果及其他植物SNAT氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of SNAT from *M. pumila* and other plants

分支线上数值表示进化树分支可信度。

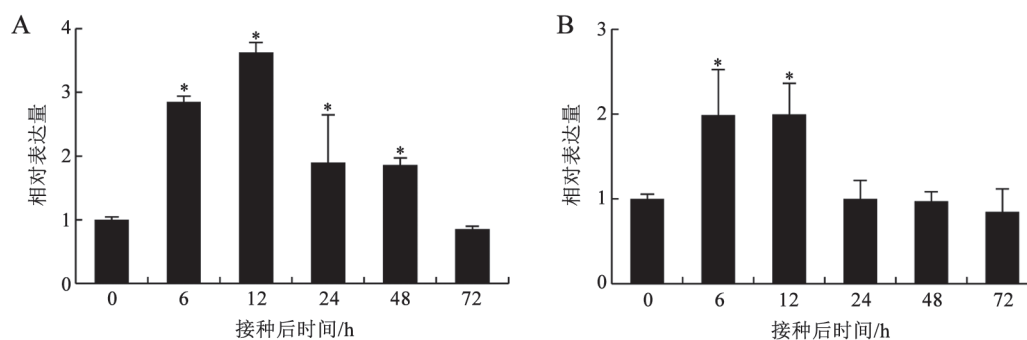
士’和‘嘎啦’叶片后48 h, 在‘嘎啦’叶片上可观察到明显的坏死病斑, 随接种时间的延长, 病斑数增加, 病斑不断扩展, 而‘富士’叶片上未见明显病斑。以喷施无菌水的处理作为对照, 基因表达量设置为1。定量PCR检测结果显示, 炭疽叶枯病菌接种‘富士’叶片后6 h, *MpSNAT1*表达量开始显著升高, 12 h达到峰值, 为对照的3.6倍, 然后表达量逐渐降低, 接种后72 h表达量与对照没有显著差异(图4-A); ‘嘎啦’叶片接种病原菌后6~12 h, *MpSNAT1*表达量显著升高, 为对照的2.0倍, 随后基因表达量快速降低至对照水平(图4-B)。表明炭疽叶枯病菌侵染后, *MpSNAT1*表达量在‘富士’和‘嘎啦’叶片中存在显著差异。

外源褪黑素和SA处理后, ‘富士’和‘嘎啦’叶片均无明显的症状表现, 但叶片中*MpSNAT1*表达量变化趋势存在显著差异(图5和6)。外源褪黑素处

理后, 两个品种叶片中*MpSNAT1*表达量显著升高, 且均呈先升高后降低再升高的趋势。褪黑素处理‘富士’叶片后6 h, 基因表达量开始显著升高, 24 h时出现一个低谷, 随后于48 h达到峰值, 为对照的2.4倍(图5-A); 褪黑素处理‘嘎啦’叶片后6 h, *MpSNAT1*表达量即达到峰值, 为对照的1.8倍, 随后基因表达量略有降低, 但测定时间内均显著高于对照水平(图5-B)。外源SA处理‘富士’和‘嘎啦’叶片后, *MpSNAT1*表达量均不同程度下调。SA处理后12和48 h, ‘富士’叶片中*MpSNAT1*表达量相比对照分别下降66.7%和60.0%, ‘嘎啦’叶片中*MpSNAT1*表达量则分别下降44.4%和50.0% (图6)。说明苹果叶片中*MpSNAT1*表达受褪黑素诱导, 但不受SA的诱导。

3 讨论

褪黑素普遍存在于高等植物中, 因其在植物

图4 苹果炭疽叶枯病菌接种‘富士’(A)和‘嘎啦’(B)叶片后*MpSNAT1*的表达量Fig.4 The expression levels of *MpSNAT1* in ‘Fuji’ (A) and ‘Gala’ (B) leaves inoculated with *G. cingulata*基因相对表达量均为3个生物学重复的平均值±标准差, *表示处理与对照差异显著($P < 0.05$); 图5和6同此。

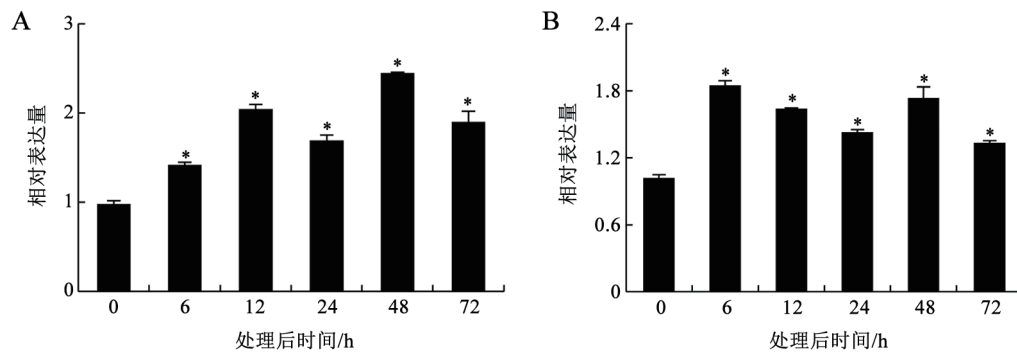


图5 外源褪黑素处理对‘富士’(A)和‘嘎啦’(B)叶中*MpSNAT1*表达的影响

Fig.5 Effects of exogenous melatonin on the expression of *MpSNAT1* in ‘Fuji’ (A) and (B) ‘Gala’ leaves

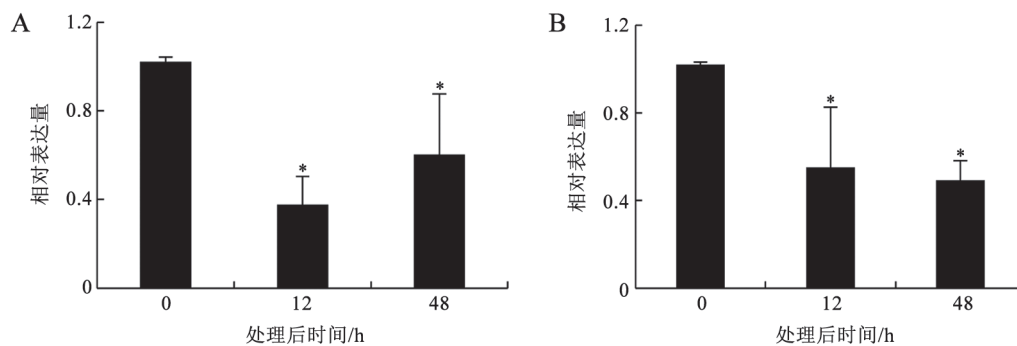


图6 外源SA处理对‘富士’(A)和‘嘎啦’(B)叶中*MpSNAT1*表达的影响

Fig.6 Effects of exogenous SA on the expression of *MpSNAT1* in ‘Fuji’ (A) and ‘Gala’ (B) leaves

中重要的生理调控作用受到人们的广泛关注(王蕊等2016)。大量研究表明,施加一定浓度的外源褪黑素能够增强植物对不良环境的抵抗能力,并能提高植物的抗病性(Wang等2013; Yin等2013; 曹晶晶等2017)。近几年,植物褪黑素合成途径研究取得突破性进展,现已证实由色氨酸生成褪黑素需要经过4个连续的酶促反应,其中SNAT是褪黑素合成的一个关键限速酶,在调节褪黑素积累平衡过程中发挥重要作用(Byeon等2015a; Lee等2015)。目前对于SNAT的研究多集中在拟南芥、水稻等模式植物上,而苹果等木本植物中研究较少。

本研究采用RT-PCR技术从‘富士’和‘嘎啦’叶片中克隆了苹果SNAT基因的全长cDNA序列,通过比对发现两个苹果品种的SNAT序列完全一致,并命名为*MpSNAT1*,该基因开放阅读框为750 bp,编码249个氨基酸,分子量为27.8 kDa。多重序列比对和系统进化树分析发现,苹果*MpSNAT1*编码的氨基酸序列与桃的相似性最高,为91.2%,其次为拟南芥,相似性63.6%,且三者聚在一个分支,表明其亲

缘关系较近,而与单子叶植物水稻、玉米和高粱SNAT编码的氨基酸序列相似性较低,说明其亲缘关系较远。苹果*MpSNAT1*具有一个GNAT功能结构域,推测该蛋白具有SNAT的功能。Byeon等(2013)克隆了蓝藻*cSNAT*,发现该基因在蓝藻中是高度保守的,被认为是高等植物中SNAT的起源。本研究构建了蓝藻和不同植物SNAT的系统发育树,表明苹果*MpSNAT1*与植物来源的SNAT亲缘关系更近,而与蓝藻亲缘关系较远。

已有研究表明,SNAT在植物抗病中发挥重要作用。拟南芥*AtSNAT*敲除突变体中褪黑素含量降低了50%,对病原菌也更加敏感(Lee等2015)。本研究发现,‘富士’和‘嘎啦’中*MpSNAT1*序列完全一致,但接种炭疽叶枯病菌后,基因表达模式有所不同,是否与该基因启动子区域或非翻译区的差异有关尚需深入研究。病原菌接种后,‘富士’中基因表达量峰值是对照的3.6倍,于接种72 h后降低至对照水平,而‘嘎啦’中基因表达量仅升高2.0倍,且持续时间较短,于接种24 h后与对照无显著差异(图

4)。结合‘富士’和‘嘎啦’叶片接种炭疽叶枯病菌后的症状表现,‘嘎啦’于接种48 h后可见明显病斑,随后病斑快速扩展,而‘富士’并无明显发病症状,推测‘富士’对炭疽叶枯病的抗性与*MpSNATI*显著上调表达有关,但褪黑素含量变化趋势还需进一步测定。

此外,本研究还分析了外源褪黑素和SA对*MpSNATI*表达的影响,发现经不同处理的苹果叶片中基因表达趋势存在显著差异。外源褪黑素处理后,‘富士’和‘嘎啦’叶片中*MpSNATI*显著上调表达,基因表达量峰值分别是对照的2.4和1.8倍,且测定时间内一直维持在较高(图5)。外源褪黑素可显著提高苹果叶片和果实对褐斑病和灰霉病的抗性(Yin等2013;曹晶晶等2017),最近,本课题研究发现外源褪黑素也可显著提高‘嘎啦’对炭疽叶枯病的抗性(未发表),说明外源褪黑素可诱导*MpSNATI*上调表达,增加内源褪黑素含量,进而提高植株抗病性。外源SA处理后,苹果叶片中*MpSNATI*表达量相比对照明显降低(图6),表明该基因表达与SA的积累无关;这与Byeon等(2015b)的研究结果一致。本文结果不仅为全面认识*MpSNATI*的生物学功能提供了依据,也为深入解析该基因在苹果抗病中的作用机制奠定了基础。

参考文献(References)

- Araujo L, Stadnik MJ (2013). Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. *Acta Sci Agron*, 35 (3): 287–293
- Arao MB, Hernández-Ruiz J (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci*, 19 (12): 789–797
- Byeon Y, Lee HY, Back K (2015a). Chloroplastic and cytoplasmic overexpression of sheep serotonin *N*-acetyltransferase in transgenic rice plants is associated with low melatonin production despite high enzyme activity. *J Pineal Res*, 58 (4): 461–469
- Byeon Y, Lee HY, Hwang OJ, et al (2015b). Coordinated regulation of melatonin synthesis and degradation genes in rice leaves in response to cadmium treatment. *J Pineal Res*, 58: 470–478
- Byeon Y, Lee K, Park Y, et al (2013). Molecular cloning and function analysis of serotonin *N*-acetyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Pineal Res*, 55: 371–376
- Cao JJ, Yu ZC, Zhang Y, et al (2017). Control efficiency of exogenous melatonin against postharvest apple grey mold and its influence on the activity of defensive enzymes. *Plant Physiol J*, 53 (9): 1753–1760 (in Chinese with English abstract) [曹晶晶, 于子超, 张颖等(2017). 外源褪黑素对苹果采后灰霉病的防效及防御酶活性的影响. *植物生理学报*, 53 (9): 1753–1760
- Carillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, et al (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, 14 (4): 8638–8683
- Daccord N, Celton JM, Linsmith G, et al (2017). High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nat Genet*, 49 (7): 1099–1106
- Kang K, Lee K, Park S, et al (2013). Molecular cloning of rice serotonin *N*-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. *J Pineal Res*, 55: 7–13
- Kim M, Seo H, Park C, et al (2016). Examination of the auxin hypothesis of phytomelatonin action in classical auxin assay systems in maize. *J Pineal Res*, 190: 67–71
- Lee HY, Byeon Y, Back K (2014). Melatonin as a signal molecule triggering defense responses against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco. *J Pineal Res*, 57: 262–268
- Lee HY, Byeon Y, Tan DX, et al (2015). *Arabidopsis* serotonin *N*-acetyltransferase knockout mutant plants exhibit decreased melatonin and salicylic acid levels resulting in susceptibility to an avirulent pathogen. *J Pineal Res*, 58: 291–299
- Li BH, Wang CX, Dong XL (2013). Research progress in apple diseases and problems in the disease management in China. *Plant Prot*, 39 (5): 46–54 (in Chinese with English abstract) [李保华, 王彩霞, 董向丽(2013). 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题. *植物保护*, 39 (5): 46–54]
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Park S, Byeon Y, Lee HY, et al (2014). Cloning and characterization of a serotonin *N*-acetyltransferase from a gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*). *J Pineal Res*, 57: 348–355
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, et al (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 13 (3): 373–384
- Reiter RJ, Tan DX, Zhou Z, et al (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20 (4): 7396–7437
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot*, 63 (2): 577–597
- Wang B, Li BH, Dong XL, et al (2015). Effects of tempera-

- ture, wetness duration and moisture on the conidial germination, infection and disease incubation period of *Glomerella cingulata*. *Plant Dis*, 99 (2): 249–256
- Wang CX, Zhang ZF, Li BH, et al (2012). First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Dis*, 96 (6): 912–912
- Wang P, Sun X, Li C (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *J Pineal Res*, 54: 292–302
- Wang R, Yang XL, Xu H, et al (2016). Advances in research on synthesis and metabolism of melatonin in higher plants. *Plant Physiol J*, 52 (5): 615–627 (in Chinese with English abstract) [王蕊, 杨小龙, 须晖等(2016). 高等植物褪黑素的合成和代谢研究进展. *植物生理学报*, 52 (5): 615–627]
- Yin LH, Wang P, Li MJ, et al (2013). Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. *J Pineal Res*, 54: 426–434
- Zhang N, Sun QQ, Zhang HJ, et al (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp Bot*, 66 (3): 647–656
- Zhang Y, Shi XP, Li BH, et al (2016). Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiol Biochem*, 106: 64–72

Cloning and expression characterization of *MpSNAT1* in *Malus pumila*

WU Cheng-Cheng, LI Ting, ZHAO Rui-Jia, LI Bao-Hua, LIANG Wen-Xing, WANG Cai-Xia*

College of Plant Health and Medicine, Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong, Shandong Province Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: Serotonin *N*-acetyltransferase gene (*MpSNAT1*) was amplified from leaves of *Malus pumila* ‘Fuji’ and ‘Gala’ with cDNA as the templates. Bioinformatics of the gene was analyzed by DNAMAN, MEGA 5.1 and other softwares. Then, the expression characteristics of the gene was detected by the fluorescence quantitative PCR (qPCR). The results showed that the full-length cDNA sequence of *MpSNAT1* is 750 bp (GenBank accession number MF443136). The gene encodes 249 amino acid residues with a theoretical molecular weight of about 27.8 kDa. *MpSNAT1* is a non-secretory and unstable protein with the characteristic conservative domains of acetyltransferase. The encoded protein shares the highest homology with *Prunus persica* and *Arabidopsis thaliana* SNATs, and similarities of amino acid sequences are 91.2% and 63.6%, respectively. The expression level of *MpSNAT1* increased significantly in apple leaves after inoculation with *Glomerella cingulata*, whereas, gene up-regulation level and maintaining times were significantly different in ‘Fuji’ and ‘Gala’ leaves. In addition, the expression of *MpSNAT1* was up-regulated significantly in apple leaves treated with exogenous melatonin, however, gene expression decreased in varying degrees after salicylic acid (SA) treatment, indicating that the expression of *MpSNAT1* is not induced by SA.

Key words: apple; *MpSNAT1*; cloning; bioinformatics; gene expression

Received 2018-01-11 Accepted 2018-04-03

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0201122), the Chinese Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-28), the Key Research and Development Program of Shandong Province (2017CXGC0214), the Taishan Scholar Construction Foundation of Shandong Province, and Undergraduate Student Innovation Program of Qingdao Agricultural University.

*Corresponding author (cxwang@qau.edu.cn).