

· 药材与资源 ·

白木香 *AsNINJAI* 基因全长 cDNA 克隆及其在愈伤组织中的茉莉酸甲酯诱导表达

廖永翠¹, 徐艳红¹, 张争^{1,2}, 隋春¹, 梁良^{1,3}, 魏建和^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所, 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 万宁 571533

3. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250012

摘要: 目的 克隆国产沉香基原植物白木香 *Aquilaria sinensis* 互作蛋白 (jasmonate Zim-domain, JAZ) 基因 (*NINJA*), 为深入研究其在沉香倍半萜合成途径中的功能奠定基础。方法 以白木香总 RNA 为模板, 采用 RACE 法和 RT-PCR 方法, 克隆白木香 *NINJA* 基因 cDNA 全长, 并进行生物信息学的分析; 采用实时荧光定量 (qRT-PCR) 方法分析经茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理的白木香愈伤组织中 *AsNINJAI* 基因的表达模式。结果 获得白木香 *NINJA* 基因全长 cDNA, 命名为 *AsNINJAI*。序列分析表明, 该基因的序列全长为 1 982 bp, 包含一个 1 221 bp 的开放阅读框, 编码 406 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 43 697, 等电点为 6.02。qRT-PCR 结果显示, 经 MeJA 处理 4 h 后 *AsNINJAI* 基因相对表达量最高, 是对照 (未经 MeJA 处理的白木香愈伤组织) 的近 100 倍, 随后显著下降。结论 获得 *AsNINJAI* 基因全长 cDNA 序列, 该基因对 MeJA 诱导极为敏感, 且能在伤害早期响应。

关键词: 白木香; *AsNINJAI* 基因; cDNA 快速末端扩增; 序列分析; 表达分析; 茉莉酸甲酯

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2968-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.019

Full-length cDNA cloning of *AsNINJAI* gene in *Aquilaria sinensis* and MeJA-induced expression in callus

LIAO Yong-cui¹, XU Yan-hong¹, ZHANG Zheng^{1,2}, SUI Chun¹, LIANG Liang^{1,3}, WEI Jian-he^{1,2}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine Hainan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Wanning 571533, China

3. College of Pharmacy, Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA of interacting protein of JAZ (*NINJA*) gene in *Aquilaria sinensis*, and to provide the basic information for further study on gene function in sesquiterpenes biosynthesis pathway. **Methods** With the total RNA as template, the full-length cDNA of *NINJA* in *A. sinensis* was cloned through RACE technique and RT-PCR method. The bioinformatics of cloning *NINJA* gene was analyzed as well. The expression mode of this gene was with MeJA treatment in *A. sinensis* callus detected by qRT-PCR method. **Results** The full-length cDNA (1 982 bp) of *NINJA* gene in *A. sinensis*, named as *AsNINJAI* was obtained with an open reading frame of 1 221 bp and encoding 406 amino acids. The relative molecular mass of *AsNINJAI* protein calculated was 43 697, and the isoelectric point was 6.02. The qRT-PCR results indicated that MeJA treatment could stimulate the increase of mRNA expression of *AsNINJAI*; There was a sharp rise at 4 h with nearly 100 times higher than the control (without MeJA treatment), then dropped significantly. **Conclusion** The full-length cDNA sequence of *AsNINJAI* gene is obtained; *AsNINJAI* is extremely sensitive to MeJA treatment, and responded to the early damage.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; *AsNINJAI* gene; rapid amplification of cDNA ends; sequence analysis; expression analysis; MeJA

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173481, 31100220, 31000136); 协和学者特聘教授 [医科人发(2012)282号]; 科技部国家创新人才计划重点领域创新团队 (2013); 中组部“万人计划” (2014)

作者简介: 廖永翠 (1985—), 女, 博士在读, 研究方向为诱导型药用植物形成机理研究。Tel: (010)57833359 E-mail: liao.yong.cui@163.com

*通信作者 魏建和 (1970—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事药用植物基因资源和次生代谢调控研究。

Tel: (010)57833358/57833016 E-mail: wjianh@263.net

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 又称土沉香, 属瑞香科沉香属植物, 是我国生产名贵芳香类药材沉香的唯一正品植物来源, 现已被列为国家二级濒危保护植物。沉香味辛、苦, 性微温, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效^[1]。白木香是一种典型的伤害诱导型药用植物, 只有在受到伤害后才能在其伤口周围木质部产生倍半萜等沉香类物质。研究表明, 伤害诱导沉香形成是白木香防御反应的产物^[2]。

为研究伤害诱导沉香形成的分子机制, 课题组前期对健康和伤害处理的白木香进行了转录组分析, 并重点分析了参与倍半萜合成与调控的关键基因; 发现外源茉莉酸 (JA) 处理显著诱导倍半萜合酶基因的表达, 经茉莉酸酯 (MeJA) 处理的愈伤组织中倍半萜成分的含量相对于健康组织升高了 70 多倍^[3]。白木香悬浮细胞经 MeJA 处理后, 可增加 5 个 δ -愈创木烯合酶基因的表达量, 同时增加倍半萜 δ -愈创木烯的量^[4]。此外, 白木香树经机械伤害和外施 MeJA 处理, 内源茉莉酸素 (JAs) 量显著增加, 同时产生 3 种倍半萜物质^[5-6]。这些结果表明, JA 信号在白木香诱导结香中扮演重要角色。

大量的研究表明, JA 是伤信号转导途径中远距离运输的重要信号分子, 依赖于 JA 作为调节反应信号的防御应答也是植物次生代谢物质积累的前提^[7-9]。NINJA (Novel Interactor of JAZ) 是 JA 信号途径中的负调控因子; 在拟南芥中, Pauwels 等^[10]发现了互作蛋白 (jasmonate Zim-domain, JAZ) 抑制蛋白与协同抑制因子 TOPLESS (TPL) 和 TPL 相关蛋白 (TPLs) 的结合需要 NINJA 蛋白的参与, 共同调控着 JA 信号途径相关次生代谢物的合成并达到植物防御的目的。本实验首次报道了白木香 NINJA (*AsNINJA1*) 基因 cDNA 全长的克隆及表达分析, 为进一步研究 *AsNINJA1* 蛋白的功能及揭示 JA 信号在白木香倍半萜形成中的作用机制奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

中国医学科学院药用植物研究所温室栽培的 3 年生白木香茎诱导产生, 生长良好且基本一致的白木香愈伤组织, 转接到含有 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 MeJA 的 MS 固体培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养, 8 个不同时间段 (0.5、1、2、4、6、8、16、24 h) 取样, 分别设置 3 个生物学重复。以同一批生长一致的白木香愈伤组织同时转接到不含 MeJA 的 MS 培养基中 25

$^{\circ}\text{C}$ 暗培养, 分别在相同时间段 (0.5、1、2、4、6、8、16、24 h) 取样, 均设 3 个重复, 作为对照。所有的材料取样后均置于液氮中速冻后, -80°C 冰箱保存备用。

1.2 试剂

植物总 RNA 提取试剂盒、Fast HiFidelity Polymerase 高保真酶、大肠杆菌 DH5 α 感受态、多聚酶链反应 (PCR) 产物胶回收试剂盒、pZeroBack/blunt 零背景连接试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司。pUC-T 载体 UltraSYBR Mixture 购于北京康为世纪生物科技有限公司。SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒购于日本宝生物公司产品。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 ThermoFisher SCIENTIFIC 公司。其他试剂均为国产分析纯。本研究所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 产物测序由英潍捷基贸易有限公司完成。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

将经 MeJA 化学处理的白木香愈伤组织材料及未处理的健康白木香愈伤组织材料置于液氮中研磨, 依据天根生化科技(北京)有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 利用 NanoDrop 2000 进行测定和 1% 琼脂糖电泳检测。健康的不经 MeJA 处理不同时间段的白木香愈伤组织混样提取总 RNA, 利用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 试剂盒合成 5'-和 3'-RACE cDNA, 反转录的条件及程序均按照试剂盒说明书进行, 用于 *AsNINJA1* 基因全长的克隆。经 MeJA 化学处理的和健康不经 MeJA 处理白木香愈伤组织提取总 RNA, 利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC 公司) 反转录成 cDNA 第一链, 作为 qRT-PCR 的模板。

1.4 *AsNINJA1* 基因全长克隆

基于白木香转录组数据库得到 *AsNINJA1* 基因的 UniGene 片段, 通过 NCBI Blast 比对发现该序列并不是全长, 运用引物设计软件 Primer 5.0 分别设计 *AsNINJA1* 基因 5'-和 3'-末端的扩增的特异性引物 GSP1、GSP2。以健康的不经 MeJA 处理不同时间段的白木香愈伤组织混样提取的总 RNA 反转录得到的 RACE cDNA 为模板, 反应体系和 PCR 程序按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 试剂盒说明书进行操作。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 切胶, 用天根公司琼脂

糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的 PCR 目的产物与 pUC-T 载体连接, 转化 DH5 α 菌株, 在含有氨苄的 LB 平板上进行培养, 挑取单克隆摇菌, 经菌液 PCR 扩增和电泳检测后选择阳性克隆送英潍捷基贸易有限公司测序。将测序结果在 NCBI 基因预测工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 上寻找一个完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 通过设计全长引物扩增全长 (表 1)。反应体

系: 快速高产聚合酶 0.5 μ L, 5 \times 快速高产 PCR 缓冲液 5 μ L, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, *NINJA-LF* (10 μ mol/L) 1 μ L, *NINJA-LR* (10 μ mol/L) 1 μ L, cDNA 1.0 μ L, ddH₂O 14.5 μ L, 终体系为 25 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 62 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物回收后用 pZeroBack/blunt 零背景连接试剂盒进行连接、转化、涂平板, 菌液 PCR 如前。

表 1 基因克隆及实时荧光定量 PCR 检测引物

Table 1 Primers for gene cloning and real-time PCR detection

引物用途	引物名称	引物序列 (3'-5')
5'-RACE 扩增引物	GSP1	CACAGACTTGTGGGAACCCCC
3'-RACE 扩增引物	GSP2	CCACAGGATCTGGCCACATGGGAGAAC
基因克隆	<i>NINJA-LF</i>	ATGGTAGAGGGGTTGGGGGTTCT
	<i>NINJA-LR</i>	TCAGCTCTGAGTCAGACGCTTGC
内参基因实时荧光定量 PCR 引物	<i>TUA-f</i>	GCCAAGTGACACAAGCGTAGGT
	<i>TUA-r</i>	TCCTTGCCAGAAATAAGTTGCTC
<i>AsNINJA1</i> 基因实时荧光定量 PCR 引物	<i>NINJA-1f</i>	CACAGCCATTACTTGCCT
	<i>NINJA-1r</i>	CCTACCCTTTACAGTTTCACC

1.5 *AsNINJA1* 基因的序列分析

AsNINJA1 基因编码蛋白的理化性质预测采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 和 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>) 进行分析。利用在线工具 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 对 *AsNINJA1* 蛋白结构域进行分析。使用 SignalP3.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 进行分泌蛋白预测。利用 WOLF PSORT (<http://wolffpsort.org/>) 分析亚细胞定位, TRMHMM server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行跨膜域分析。氨基酸序列比对利用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行, 通过 MEGA 5 构建 NJ 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

利用 qRT-PCR (美国伯乐公司的 iQTM5 实时 PCR 检测系统) 的方法检测经 MeJA 处理的白木香愈伤组织中 *AsNINJA1* 基因不同时间段的表达量。反应体系如下: 2 \times UltraSYBR 预混液 20 μ L, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, cDNA 模板 0.8 μ L, 加水至终体积 20 μ L, 每个反应体系设置

3 个重复。实时 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C、10 min; 95 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、1 min, 40 个循环; RT-PCR 反应以 α 微管蛋白基因 *TUA* 为内参^[11], 不同时间段基因的表达以健康的不进行 MeJA 处理的白木香愈伤组织中的表达量为对照。将 Real-time PCR 仪所得的样品 C_t 值, 利用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法转化为基因相对表达量值。应用 Excel 软件进行数据录入及表的绘制, 采用 SPSS16.0 软件进行统计与 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Duncan 检验法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 白木香 *AsNINJA1* 基因全长的克隆

根据前期转录组测序得到的 *AsNINJA1* 基因的 UniGene 序列设计特异引物, 通过 RACE-PCR 技术获得 5' 端序列和 3' 端序列克隆测序的结果与已知的序列片段拼接得到全长 cDNA 序列为 1 982 bp。为验证全长的结果, 根据拼接后得到的全长序列设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增白木香 *AsNINJA1* 基因全长序列并测序, 与预计的片段大小一致, 克隆后测序, 结果与拼接结果一致。

从得到的白木香 *AsNINJA1* 基因 cDNA 序列全长, 通过 NCBI 基因预测工具 (ORF Finding) 获得一个长为 1 221 bp 完整的开放阅读框 (ORF)。5'

端存在为 525 bp 的非翻译区 (UTR)，3'端的 UTR 区长为 255 bp，其中含为 18 bp 的 poly (A) 尾，命名为 *AsNINJA1* 基因。图 1 为经过 PCR 扩增得到的 *AsNINJA1* 基因编码区 (CDS) 序列检测电泳图。

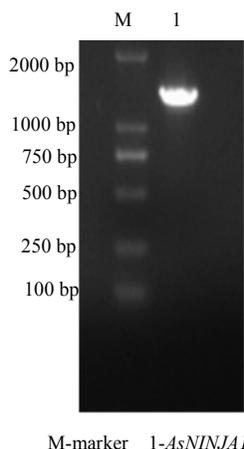


图 1 *AsNINJA1* 基因 CDS 的扩增

Fig. 1 CDS amplification of *AsNINJA1* gene

2.2 白木香 *AsNINJA1* 基因编码蛋白特性分析

2.2.1 理化性质分析 *AsNINJA1* 蛋白的分子式为 $C_{1886}H_{2971}N_{553}O_{624}S_{10}$ ，编码 406 个氨基酸，相对分子质量为 43 697。等电点 pI 为 6.02，带负电残基 (Asp+Glu) 为 46，带正电残基为 37 (图 2)。该蛋白的不稳定系数为 47.64，属于不稳定蛋白；脂肪系数为 68.45，亲水性系数为 -0.617，表明其为疏水性蛋白；摩尔消光系数为 24 200，在哺乳动物体内的半衰期为 30 h，酵母体内大于 20 h，菌内大于 10 h。整个 *AsNINJA1* 中疏水性最大值是 1.678，最小值是

-2.589；其中 145~155、175~194、306~322 和 358~367 出现强烈的疏水性，其他为亲水性区域，平均亲水系数小于 -0.6，此结果表明 *AsNINJA1* 可能是一种水合能力较强的蛋白。

2.2.2 信号肽、跨膜区及亚细胞定位预测分析 TargetP 1.1 Server 预测结果显示，线粒体信号肽 (mitochondrial targeting peptide, mTP) 为 0.051，分泌通路信号肽 (secretory pathway signalpeptide, SP) 为 0.049，其他为 0.956。SignalP 4.0 Server 预测结果显示 *AsNINJA1* 蛋白为非分泌蛋白，不具有信号肽。TRMHMM server v2.0 跨膜区预测 *AsNINJA1* 编码的蛋白没有跨膜区域，为非膜蛋白。亚细胞定位结果表明该蛋白定位于细胞核中。

2.2.3 结构域预测 InterProScan 在线工具预测 *AsNINJA1* 蛋白保守结构域，共有 3 个结构域 (图 2)。*AsNINJA1* 蛋白的保守结构域主要含 Ninja 结构域，以及 2 个未明确分类的保守结构域。Ninja 结构域位于 331~380 (PF07897)，是植物响应胁迫过程中 JA 信号通路的负调控因子 NINJA 特有的结构域；还有一类保守结构域在 IPR 中没有明确分类，位于 (PTHR31413 和 PTHR31413: SFO) 331~379 两个结构域仍未命名。

2.3 *AsNINJA1* 氨基酸序列的分子系统进化分析

通过 NCBI 在线工具 Blast 进行数据比对，结合相关文献的查阅，筛选出包括白木香 *AsNINJA1* 在内的 17 个物种，属 NINJA 家族蛋白的 17 种蛋白，并下载它们的蛋白质序列 (图 3)。使用 MEGA5.05

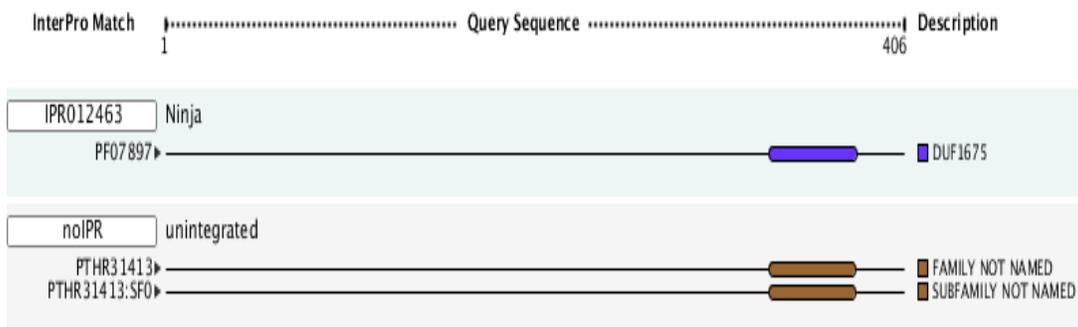


图 2 *AsNINJA1* 蛋白保守结构域预测分析

Fig. 2 Predicted characteristic conserved domains of *AsNINJA1* protein



图 3 白木香 *AsNINJA1* 蛋白与可可 NINJA 蛋白保守结构域序列相似性比较分析

Fig. 3 Comparison on sequence similarity of conservative domains of *AsNINJA1* protein in *A. sinensis* and NINJA protein in cocoa

进行多序列的比对, 采用相邻连接法构建 HDR 进化树, 进行聚类分析。结果如图 4 所示, 白木香 *AsNINJA1* 与可可 JAZ 互作因子蛋白聚为一类, 两者亲缘关系最近, 其中与可可的 NINJA 蛋白关系最近, 两蛋白保守结构域序列相似性为 88.7%。

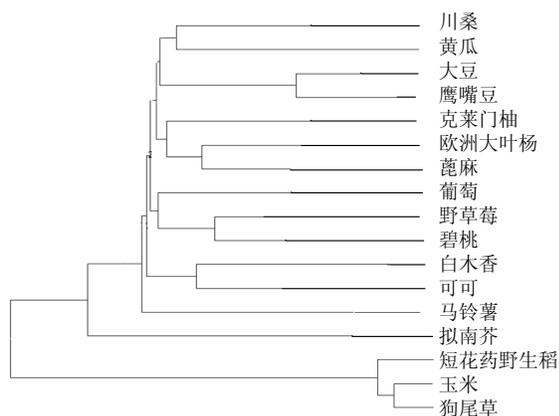


图 4 白木香 *AsNINJA1* 系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *AsNINJA1* in *A. sinensis*

2.4 MeJA 处理后白木香 *AsNINJA1* 基因表达分析

不同时间段 MeJA 诱导白木香愈伤组织中 *AsNINJA1* 基因相对表达结果如图 5 所示。MeJA 能明显诱导白木香愈伤组织中 *AsNINJA1* 基因 mRNA 的表达, MeJA 处理后 0.5 h *AsNINJA1* 基因相对表达量相对于对照提高了 40 多倍, 随后增长量下降, 2 h 后快速增高直至 4 h 时达到最大值, 高达对照表达量近 100 倍; 24 h 后基因的表达量降低至正常水平。*AsNINJA1* 基因相对表达在不同处理时间差异显著, 处理 4 h 与其他各时间段均差异显著。而对照组在不同时间段 *AsNINJA1* 基因的相对表达量比较低, 并且无明显变化, 无显著性差异。

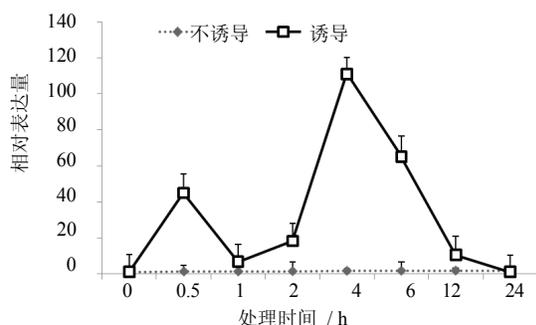


图 5 MeJA 诱导白木香愈伤组织中 *AsNINJA1* 基因的表达

Fig. 5 Effect of MeJA on *AsNINJA1* gene expression in *A. sinensis* callus

3 讨论

植物由于受制于不能移动的特性, 长期以来受到来自于环境中生物和非生物的胁迫形成了一套有效的防御系统。近几十年来, 植物响应外界胁迫的防御机制的研究一直都是备受关注的热点。沉香资源短缺、价格昂贵, 具有伤害后经过较长时间才能产生的特点, 因此揭示外界伤害胁迫诱导形成的分子机制对于结香至关重要。

本研究首次从白木香中克隆得到了 JA 信号途径中的第一个关键蛋白基因 *AsNINJA1*, 这也是沉香属植物第一次获得该基因。生物信息学分析表明, 该基因编码的氨基酸序列具有典型的 NINJA 蛋白家族的结构域。因此, 推测 *AsNINJA1* 蛋白可能作为 JA 信号通路中的一个负调控因子与 JAZ 抑制蛋白发生相互作用, 共同调控着相关基因的表达。qRT-PCR 结果表明, 该基因的表达对 MeJA 诱导的化学伤害敏感, 且主要在早期响应伤害胁迫, 后期则基本恢复原表达水平。对于 MeJA 处理后, *AsNINJA1* 基因的表达并未出现一个逐渐增高的趋势, 而是在初期 0.5 h 时出现表达量高于对照 40 倍的高峰期, 随后降低再升高的表达特征, 这与前人的研究结果一致。即植物细胞在受到伤害胁迫后, 植物细胞膜快速释放出内源 JA 作为第二信号分子, 参与 JA 相关防御反应并产生相应的次生代谢物^[12-16]。总之, qRT-PCR 结果在一定程度上说明 *AsNINJA1* 基因属于防御反应早期应答的基因。研究结果为从分子水平上调控 *AsNINJA1* 基因表达量及其揭示白木香倍半萜合成分子机制的研究提供了基础数据。但是, *AsNINJA1* 基因究竟在沉香形成的过程发挥着怎样的作用, 与信号通路中其他的蛋白如何相互作用共同调控响应 JA 信号途径相关基因的表达有待更深入的探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 张兴丽. 伤害诱导的白木香防御反应与沉香形成的关系研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [3] Xu Y H, Zhang Z, Wang M X, et al. Identification of genes related to agarwood formation: transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 227.
- [4] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154: 198-200.

- [5] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 白木香茎中内源茉莉酸类和倍半萜类物质对机械伤害的响应 [J]. 园艺学报, 2013, 40(1): 163-168.
- [6] 徐艳红, 杨欣, 梁良, 等. 茉莉酸甲酯诱导的白木香 cDNA 文库的构建及初步鉴定 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 102-106.
- [7] Glauser G, Dubugnon L, Mousavi S A R, *et al.* Farmer E E. Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34506-34513.
- [8] Koo A J, Gao X, Jones A D, *et al.* A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 59: 974-986.
- [9] Endt D V, Silva M S, Kijne J W, *et al.* Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 1680-1689.
- [10] Pauwels L, Barbero G F, Geerinck J, Tilleman S, *et al.* NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signaling [J]. *Nature*, 2010, 464: 788-791.
- [11] Gao Z H, Wei J H, Yang Y, *et al.* Selection and validation of reference genes for studying stress-related agarwood formation of *Aquilaria sinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1759-1768.
- [12] Creelman R A, Teerney M L, Mullet J E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4968-4941.
- [13] Farmer E E, Johnson R R, Ryan C A. Regulating of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 995-1002.
- [14] Farmer E E, Ryan C A. Octadecanoid-derived signals in plants [J]. *Trends Cell Biol*, 1992a, 2: 236-241.
- [15] Farmer E E, Ryan C A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors [J]. *Plant Cell*, 1992b, 4: 129-134.
- [16] Albrecht T, Kehlen A, Stahl K, *et al.* Quantification of rapid transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody [J]. *Planta*, 1993, 191: 86-94.