



陈炼, 田忠, 王小云, 陈学敏, 陆温, 王小平, 郑霞林. 朱红毛斑蛾实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 15–24.

朱红毛斑蛾实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

陈 炼¹, 田 忠², 王小云¹, 陈学敏¹, 陆 温¹, 王小平², 郑霞林^{1*}

(1. 广西大学农学院, 南宁 530004; 2. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 筛选朱红毛斑蛾 *Phauda flammans* (Walker) 在不同成虫组织、性别及发育阶段处理条件下稳定表达的内参基因, 为进一步开展朱红毛斑蛾相关基因的定量研究提供参考。本研究以不同成虫组织 (头、胸、腹、足、翅和触角)、不同成虫性别和不同发育阶段 (卵、幼虫、蛹和成虫) 为实验材料, 对 10 个候选内参基因进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 并使用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件及 RefFinder 网站对候选内参基因的表达稳定性进行评价和综合分析。结果表明: 在朱红毛斑蛾不同成虫组织基因定量研究中, $TUB2 > GAPDH > TUB1 > AK > EF1\alpha > ACTIN3 > TBP > TUB3 > ACTIN2 > RPL32$, 建议以 $TUB2$ 和 $GAPDH$ 作为内参基因; 在不同成虫性别基因定量研究中, $TUB1 > EF1\alpha > ACTIN3 > RPL32 > ACTIN2 > TUB2 > AK > GAPDH > TUB3 > TBP$, 建议以 $TUB1$ 和 $EF1\alpha$ 作为内参基因; 在不同发育阶段基因定量研究中, $ACTIN3 > TBP > TUB1 > EF1\alpha > TUB3 > ACTIN2 > GAPDH > RPL32 > TUB2 > AK$, 建议以 $ACTIN3$ 和 TBP 作为内参基因。基于 GeNorm 分析, 最佳内参基因使用数目为 2 个。

关键词: 基因表达; 表达稳定性; GeNorm; NormFinder; BestKeeper; RefFinder

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 01-0015-10

Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Phaudidae)

CHEN Lian¹, TIAN Zhong², WANG Xiao-Yun¹, CHEN Xue-Min¹, LU Wen¹, WANG Xiao-Ping², ZHENG Xia-Lin^{1*} (1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This study aims to screen and verify stably expressed genes under given conditions as reference genes for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in *Phauda flammans* (Walker), which can provide the basis for following experiments on gene quantification of this moth. Based on transcriptomics sequencing results in *P. flammans* and reference genes reported in other lepidopteran species, 10 genes were selected as candidate reference genes. Then the primers of qRT-PCR were respectively designed, and their expression levels in different adult tissues (head, thorax, abdomen, leg, wing and antenna), sexes, and different developmental stages (egg, larva, pupa and adult) were tested by qRT-PCR. The expression stability of candidate genes were evaluated by GeNorm, NormFinder and BestKeeper softwares and RefFinder website. According to the comprehensive rank of RefFinder, the expression stability of above ten candidate reference genes in different adult tissues were $TUB2 > GAPDH > TUB1 > AK > EF1\alpha > ACTIN3 > TBP > TUB3 > ACTIN2 > RPL32$; the expression stability of above candidate reference genes in different

基金项目: 国家自然科学基金 (31660206)

作者简介: 陈炼, 女, 1995 年生, 湖北咸宁人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫行为生态学, E-mail: chenlian00423@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 郑霞林, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为昆虫行为生态学, E-mail: zheng-xia-lin@163.com

收稿日期 Received: 2020-02-22; 接受日期 Accepted: 2020-03-12

adult sexes were $TUB1 > EF1\alpha > ACTIN3 > RPL32 > ACTIN2 > TUB2 > AK > GAPDH > TUB3 > TBP$; the expression stability of above candidate reference genes in different developmental stages were $ACTIN3 > TBP > TUB1 > EF1\alpha > TUB3 > ACTIN2 > GAPDH > RPL32 > TUB2 > AK$. Three pairs of genes ($TUB2$ and $GAPDH$, $TUB1$ and $EF1\alpha$, $ACTIN3$ and TBP), were recommended as reference genes to study on the gene quantification of different adult tissues, sexes and developmental stages in *P. flammans*, respectively.

Key words: Gene expression; expression stability; GeNorm; NormFinder; BestKeeper; RefFinder

朱红毛斑蛾 *Phauda flammans* (Walker) (鳞翅目 Lepidoptera: 毛斑蛾科 Phaudidae), 是榕属 *Ficus* 植物上一种重要的食叶害虫, 在南亚和东南亚国家其发生和为害的报道屡见不鲜 (Nageshchandra *et al.*, 1972; Verma and Dogra, 1982; Fof, 2015; 刘俊延等, 2016; Anonymous, 2017; Zheng *et al.*, 2017)。朱红毛斑蛾在中国广西 1 年发生 2 ~ 3 代, 抗寒力强 (Zheng *et al.*, 2017), 以第 2 代预蛹期幼虫及蛹和第 3 代低龄幼虫越冬, 越冬幼虫喜在位于地表突出的根系附近或杂草丛下化蛹 (刘俊延等, 2015)。该虫成虫为日行性蛾类 (Zheng *et al.*, 2019), 以幼虫取食榕属植物叶片, 为害严重时, 不仅植株叶片被蚕食殆尽仅剩枝干, 还会取食嫩枝韧皮部 (刘俊延等, 2015), 不仅影响榕树的生长发育, 还影响其净化空气等功能的正常发挥。目前, 已筛选出几种防治效果较佳的化学药剂 (孟令昱, 2017; 蒋露等, 2018), 然而, 由于朱红毛斑蛾的发生地多在市区道路旁、公园和河堤岸等处, 化学防治存在一定的安全隐患。因此, 探索朱红毛斑蛾环境友好型的生物防治措施十分必要。自然条件下, 朱红毛斑蛾的天敌主要为寄生蜂和寄生蝇, 但寄生率较低, 仅为 0.9% ~ 7.2% (Zheng *et al.*, 2015), 防控效果有限。此外, 朱红毛斑蛾性信息素防控技术的研究也取得初步进展 (Zheng *et al.*, 2019)。迄今为止, 关于朱红毛斑蛾的研究主要集中在生物生态学特性、防治和线粒体基因组等方面 (Zhang *et al.*, 2020), 有关转录组分析、内参基因筛选、功能基因研究等方面尚未见报道。

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 由于其定量准确、特异性性好和灵敏度高, 广泛用于昆虫转录组验证和基因表达分析等方面的研究 (Van Guilder *et al.*, 2008; 史彩华等, 2017; Lü *et al.*, 2018; Shakeel *et al.*, 2018)。qRT-PCR 技术关键因素之一为内参基因的

选择。合适的内参基因可以对 qRT-PCR 数据进行校正和标准化, 从而纠正由 RNA 分离、cDNA 定量、转录和扩增的变异等带来的系列问题 (Pfaffl *et al.*, 2014), 从而减少样本间的误差, 控制内部差异。因此, 选择何种内参基因对于 qRT-PCR 结果是否准确就显得尤为重要。常用的候选内参基因包括肌动蛋白家族 ($ACTIN$) (Ridgeway and Timm, 2015)、微管蛋白家族 ($Tubulin$, TUB) (Wang *et al.*, 2015)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ($Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase$, $GAPDH$) (Yang *et al.*, 2018) 和核糖体蛋白基因 ($Ribosomal protein L32$, $RPL-32$) (Matta *et al.*, 2011) 等。近年来, 这几类候选内参基因在昆虫中的表达稳定性筛选研究已有诸多报道 (Teng *et al.*, 2012; 符伟等, 2012; Lu *et al.*, 2013; 唐培安等, 2016), 如偏瞳蔽眼蝶 *Bicyclus anynana* Butler (Arun *et al.*, 2015)、狐眼袖蝶 *Heliconius numata* Cramer (Prunier *et al.*, 2016)、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* Guenee (杨苓等, 2017) 和美国白蛾 *Hyphantria cunea* Drury (陶蓉等, 2019) 等。

目前, 已对朱红毛斑蛾的转录组数据进行了组装分析, 得到完善的基因信息, 使 qRT-PCR 内参基因筛选试验更具可靠性。因此, 本研究以朱红毛斑蛾不同成虫组织 (头、胸、腹、足、翅和触角)、性别和不同发育阶段 (卵、幼虫、蛹和成虫) 为材料, 利用 qRT-PCR 技术对鳞翅目昆虫中常见的 10 个内参基因 ($ACTIN2$ 、 $ACTIN3$ 、 $TUB1$ 、 $TUB2$ 、 $TUB3$ 、 $EF1\alpha$ 、 AK 、 $GAPDH$ 、 $RPL32$ 和 TBP) 进行了表达量分析, 并使用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件及 RefFinder 网站对候选基因的表达稳定性进行了分析和评价, 以筛选出朱红毛斑蛾不同成虫组织、性别和不同发育阶段中最合适的内参基因, 为后续朱红毛斑蛾基因表达调控等系列研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与样品收集

于 2018 年 6 月至 7 月，在广西大学校园（108.29 °E，22.85 °N）内的垂叶榕 *F. benjamina* L. 上采集朱红毛斑蛾幼虫。幼虫放入塑料盒（半径 8.0 cm，高度 12.0 cm，10 头/盒）内饲养，置于温度 26 ± 1℃，相对湿度为 60% ~ 80% 和光周期 L14:D10 的条件下饲养。幼虫饲以新鲜垂叶榕叶片，每日更换新鲜叶片直至化蛹。根据茅裕婷等（2017）提供的方法鉴别蛹的性别，雌雄蛹分开保存在不同的塑料管内（直径 2.7 cm，高度 10.3 cm），塑料管盖中间钻 10 个孔（直径 2 mm）便于通风，置于和饲养幼虫相同的环境条件下。成虫羽化后，随机收集 1 日龄雌虫或雄虫头、胸、腹、足、翅和触角为组织样品，每组 5 头，生物学重复 3 次；随机收集 1 日龄雌虫和雄虫为性别样品，每组 3 头，生物学重复 3 次；收集卵（50 粒）、2 龄幼虫（5 头）、蛹（初期和末期各 2 头）和成虫（1 日龄雌雄成虫各 2 头）为发育阶段样品，生物学重复 3 次；将收集的各组样品迅速放入液氮内，随后转置于 -80℃ 冰箱保存待用。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

将收集的各组样品从 -80℃ 冰箱中取出，置于液氮中，均按 RNAiso Plus（Trizol）（TAKARA，9109，中国大连）法进行 RNA 提取。用以上方法提取的 RNA 为模板，按照 Prime Script RT reagent

Kit with gDNA Eraser（TAKARA，RR047，中国大连）试剂盒说明书进行反转录反应。合成好的 cDNA 存于 -20℃ 冰箱待用。

1.3 内参基因的选择及引物设计

根据其它鳞翅目昆虫常用内参基因（Shakeel *et al.*，2015；Sun *et al.*，2015；Xu *et al.*，2017；Zhang *et al.*，2017），从朱红毛斑蛾转录组中筛选出 *ACTIN2*、*ACTIN3*、*TUB1*、*TUB2*、*TUB3*、*EF1α*、*AK*、*GAPDH*、*RPL32* 和 *TBP* 共 10 个候选内参基因（表 1），并利用 National Center for Biotechnology Information（NCBI）网站中的引物设计工具 Primer-BLAST（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>）设计 qRT-PCR 引物（表 2），由生工生物工程上海（股份）有限公司合成。

1.4 标准曲线的制作和 qRT-PCR

将样品 cDNA 模板梯度稀释 1/2、1/10、1/50、1/250 和 1/1250 进行反应，在冰上进行反应体系的配制，具体如下（10 μL 体系）：SYBR® Premix Ex Taq™ II（Tli RNaseH Plus）（TAKARA，RR820A，中国大连）5.0 μL，dd H₂O 2.4 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 0.2 μL，cDNA 稀释液 2.0 μL。在 ABI QuantStudio 6 Flex（Thermo Fisher Scientific，Massachusetts，USA）上进行反应，PCR 程序如下：Hold Stage: 95℃，30 s；PCR Stage: 95℃，5 s；60℃，30 s；40 个循环；Mel Curve Stage: 95℃，15 s；60℃，1 min；95℃，15 s。保存 qRT-PCR 检测数据供后续分析。

表 1 朱红毛斑蛾候选内参基因信息

Table 1 Candidate reference genes analyzed in *Phauda flammans*

基因名 Genes	基因全称 Full name of genes	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>ACTIN2</i>	肌动蛋白 ACTIN	MN852474
<i>ACTIN3</i>	肌动蛋白 ACTIN	MN852475
<i>TUB1</i>	α 微管蛋白 α-tubulin	MN852477
<i>TUB2</i>	α 微管蛋白 α-tubulin	MN852476
<i>TUB3</i>	β 微管蛋白 β-tubulin	MN852478
<i>EF1α</i>	延伸因子 1-α Elongation factors 1-α	MN852479
<i>AK</i>	精氨酸激酶 Arginine kinase	MN852480
<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MN852481
<i>RPL32</i>	核糖体蛋白 L32Ribosomal protein L32	MN852482
<i>TBP</i>	TATA 结合蛋白 TATA-binding protein	MN928574

表 2 朱红毛斑蛾候选内参基因的定量引物序列
Table 2 Primers for qRT-PCR in *Phaуда flammans*

基因名 Genes	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	产物大小 Amplicon length (bp)
<i>ACTIN2</i>	F: AACAAAGAAATGGCAACCGCC	114
	R: ATAGAGCTTCTGGGCAACGG	
<i>ACTIN3</i>	F: TCCTCACAGAGCGTGGTTAC	160
	R: CGTCGGGAAGCTCGTAAGAC	
<i>TUB1</i>	F: GATGCCGACCGACAAGACTA	155
	R: ACAACTGCCTGTATGTGCCA	
<i>TUB2</i>	F: CAACTACGCACGAGGACACT	130
	R: CACCGCCAAACGAGTGAAAC	
<i>TUB3</i>	F: GCGAGGGTATGGACGAGATG	155
	R: ATCGTGTTGCTCATCTTGCG	
<i>EF1α</i>	F: CCCTGGACACAGAGATTTTCATC	108
	R: GAGATACCTGCCTCAAACCTCAC	
<i>AK</i>	F: AGCTCATCGACGACCATTTTC	113
	R: GGTCTTGTTCCTCATTGTGGTAGA	
<i>GAPDH</i>	F: AACTGCCTTGCTCCACTAGC	145
	R: GAGCACCACGACCATCTCTC	
<i>RPL32</i>	F: GGCGTAAACCCAGAGGTATTG	107
	R: CAGCATATGGCGTGTCTTCT	
<i>TBP</i>	F: GCTCTTACGAACCGGAACCTATT	103
	R: GCACCTGTTAGCACAACTTTAC	

注: F, 正向引物; R, 反向引物。Note: F, forward primer; R, reverse primer.

1.5 候选内参基因表达稳定性分析

对 10 个候选内参基因的综合评价, 采用内参基因评价软件 GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)、Normfinder (Andersen *et al.*, 2004) 和 Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), 并采用 RefFinder 在线网站 (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) 进行综合比较与稳定性评估 (Silver *et al.*, 2016)。GeNorm 计算不同处理中各内参基因表达稳定性 (M 值), 当 $M < 1.5$ 时, 则该基因可用于候选内参基因的筛选, 反之则否, 且 M 值越小代表选择的内参基因稳定性越好。同时, 可通过 GeNorm 计算得到 $V_{n/(n+1)}$ 值, 当 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ 时, 则表示该处理中这 n 个内参基因达到内参基因计算要求, 无需添加 $n+1$ 个内参基因, 从而得到使用内参基因的最佳数目。Normfinder 计算不同样本组内和组间的变化来评估内参基因表达

稳定值 (stability value, SV), 该值越小表示内参基因越稳定, 同时还可得到内参基因的最佳组合。Bestkeeper 直接使用基因循环阈值 (Cq) 进行计算, 通过标准差 (standard deviation, SD)、变异系数 (coefficient of variation, CV) 及几何平均数 (geometric mean, GM) 来评估内参基因的稳定性, 且 $SD < 1$ 时, 该基因可被作为内参基因。最后, 通过 RefFinder 在线网站对所有候选内参基因进行综合排名。

2 结果与分析

2.1 引物扩增效率和特异性评价

基于标准曲线的结果, 发现 10 个候选内参基因的相关系数 (R^2) 均在 0.991 ~ 0.999 之间 (表 3), 表明梯度稀释的内参基因模板 cDNA 获得

的标准曲线相关系数良好。所有候选内参基因的扩增效率（E）均在 97.6%（*RPL32*）~113.6%（*TUB2*）之间，位于 80.0%~120.0% 的要求范围内，且每个候选基因获得的溶解曲线均表现出单一峰，说明本试验选择的定量引物设计合理，具有良好的扩增效率和特异性，符合荧光定量分析的要求，适用于内参基因的定量测定。

表 3 候选内参基因 qRT-PCR 引物的扩增效率及相关系数
Table 3 Amplification efficiency and regression coefficient of qRT-PCR primers for candidate internal reference genes

基因名 Genes	PCR 扩增效率（%） PCR efficiency	相关系数（R ² ） Regression coefficient
<i>ACTIN2</i>	1.040	0.996
<i>ACTIN3</i>	1.025	0.996
<i>TUB1</i>	0.994	0.998
<i>TUB2</i>	1.136	0.998
<i>TUB3</i>	1.074	0.997
<i>EF1α</i>	1.027	0.998
<i>AK</i>	1.040	0.999
<i>GAPDH</i>	0.988	0.998
<i>RPL32</i>	0.976	0.996
<i>TBP</i>	1.055	0.991

2.2 候选内参基因的表达水平分析

qRT-PCR 分析了朱红毛斑蛾 10 个候选内参基因的表达水平，C_q 表示其转录水平。在朱红毛斑蛾不同成虫组织、性别和不同发育阶段 3 组处理综合条件下，所有基因的 C_q 值在 15.54~30.37 个循环之间（图 1），表明各候选内参基因各组处理中均具有较高的表达水平。基于 C_q 值变化，发现各候选内参基因转录表达水平表达量均有差异，其中，*RPL32* 表达量变化最小，其次是 *ACTIN3*、*TUB2* 和 *GAPDH*；*ACTIN2* 表达量变化最大，且 C_q 值大于 30，因此不考虑作为内参基因。

2.3 朱红毛斑蛾候选内参基因稳定性分析

2.3.1 GeNorm 稳定性分析

根据 GeNorm 软件对 10 个候选内参基因稳定性（M 值）的分析，发现在不同成虫组织处理中，M 值稳定顺序为 *TUB1* = *TUB2*（0.284）> *EF1α*

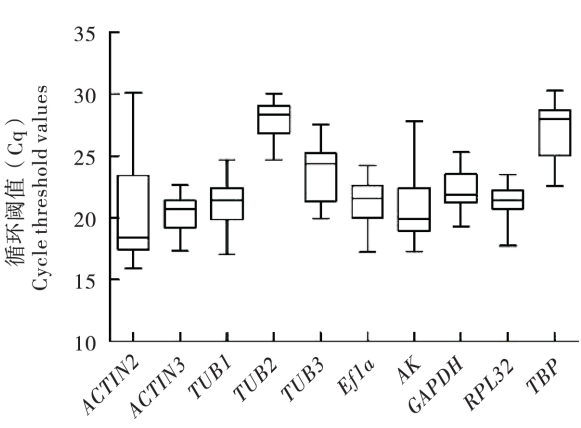


图 1 候选内参基因在朱红毛斑蛾不同样品中的表达水平
Fig. 1 Expression levels of candidate reference genes for different samples in *Phauda flammans*

(0.349) > *ACTIN3* (0.358) > *RPL32* (0.439) > *GAPDH* (0.492) > *TBP* (0.559) > *TUB3* (0.620) > *AK* (0.964) > *ACTIN2* (1.346)，其中 *TUB1* 和 *TUB2* 为最稳定的内参基因，*ACTIN2* 为最不稳定的内参基因；在不同成虫性别处理中，*ACTIN2* = *EF1α* (0.169) > *AK* (0.233) > *ACTIN3* (0.270) > *RPL32* (0.295) > *TUB2* (0.353) > *GAPDH* (0.396) > *TUB1* (0.486) > *TUB3* (0.654) > *TBP* (0.786)，其中 *ACTIN2* 和 *EF1α* 为最稳定的内参基因，*TBP* 为最不稳定的内参基因；在不同发育阶段处理中，*TUB2* = *TBP* (0.255) > *AK* (0.591) > *RPL32* (0.806) > *ACTIN3* (0.986) > *TUB3* (1.162) > *GAPDH* (1.427) > *ACTIN2* (1.669) > *TUB1* (2.242) > *EF1α* (2.695)，*TUB2* 和 *TBP* 为最稳定的内参基因，*EF1α* 为最不稳定的内参基因(图 2)，其中 *ACTIN2*、*TUB1* 和 *EF1α* 的 M 值 > 1.5，因此这 3 个基因不适合用于不同发育阶段处理中的内参基因。

同时，利用 GeNorm 软件对 $V_{n/(n+1)}$ 值进行计算，分析得到了所需要最佳内参基因数目（图 3）。3 个处理中， $V_{n/(n+1)}$ 值均存在小于 0.15 的组分，所以最佳内参基因组合数目为 2 个，无需加入第 3 个内参基因进行校正。其中，在不同成虫组织处理内，*TUB1* 和 *TUB2* 为最佳组合；在不同成虫性别处理中，*ACTIN2* 和 *EF1α* 为最佳内参基因组合；在不同发育阶段处理中，*TUB2* 和 *TBP* 为最佳内参基因组合。

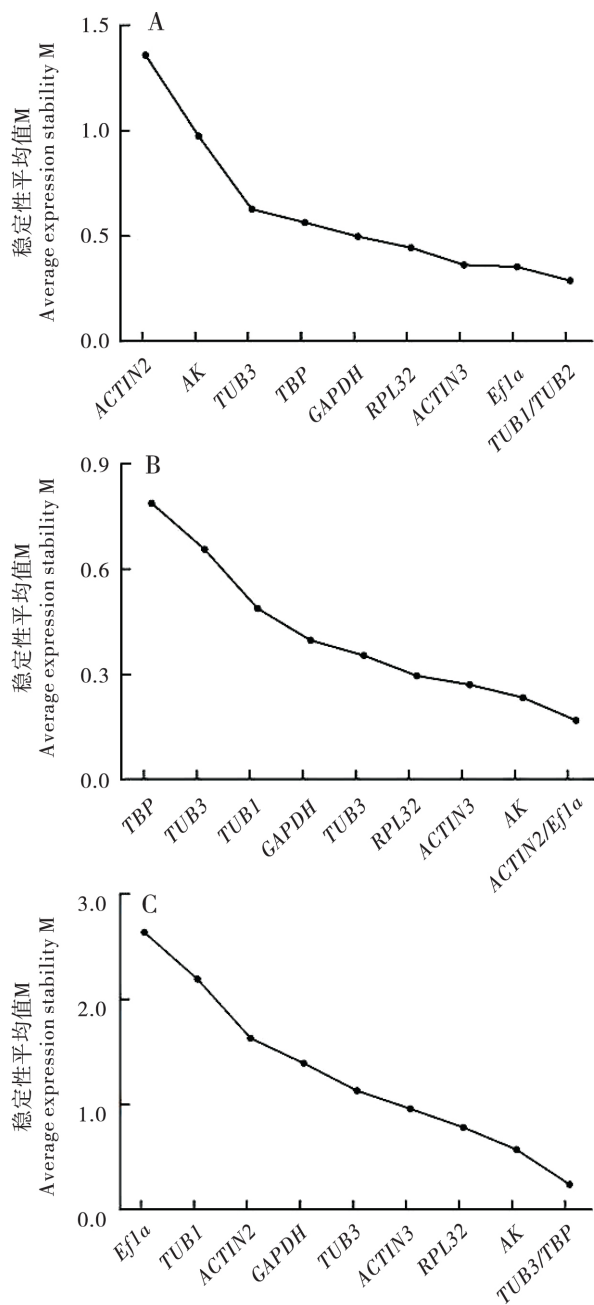


图2 geNorm 软件分析候选内参基因的表达稳定值 M

Fig. 2 Expression stability of the candidate reference genes as calculated by the geNorm

注: A, 不同成虫组织; B, 不同成虫性别; C, 不同发育阶段。Note: A, Different adult tissues; B, Different adult sexes; C, Different developmental stages.

2.3.2 Normfinder 稳定性分析

基于 Normfinder 的分析,发现在不同成虫组织中, *TUB2* 为最稳定内参基因,与 GeNorm 软件分析一致,其次是 *GAPDH*,最不稳定基因为 *RPL32*;

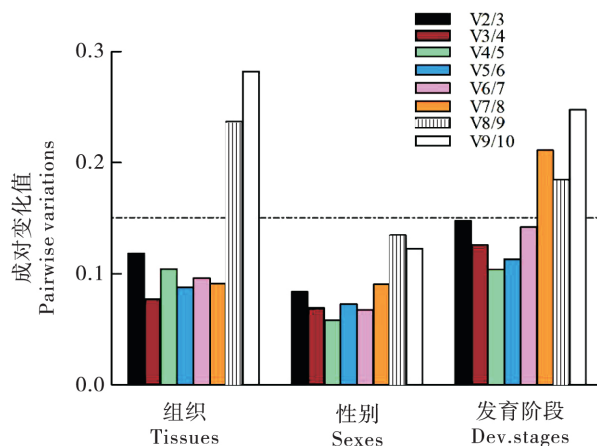


图3 GeNorm 软件分析不同条件下所需内参基因的最适数目

Fig. 3 Determination of the optimal number of reference genes analyzed by GeNorm

在不同成虫性别中, *TUB1* 为最稳定内参基因,其次为 *EF1α* 和 *ACTIN3*, *TBP* 依然为最不稳定基因;在不同发育阶段处理中, *ACTIN3* 为最稳定内参基因,其次为 *TBP*,最不稳定基因为 *AK* (表4)。

2.3.3 Bestkeeper 稳定性分析

BestKeeper 分析得到的标准差 SD 值、变异系数 CV 值和几何平均数 GM 值等可用来判断内参基因的稳定性,SD、CV 和 GM 值越小,表明基因表达越稳定。在不同成虫组织处理中, *ACTIN3* 为最稳定内参基因,其次为 *AK*; *RPL32* 为最不稳定基因,与 Normfinder 软件分析结果一致。在不同成虫性别处理中, *AK* 为最稳定内参基因,其次为 *TUB2* 和 *GAPDH*; *TBP* 在 3 种分析中均为最不稳定基。在不同发育阶段处理中, *ACTIN2* 和 *TUB2* 为最稳定内参基因,其次为 *GAPDH*; 最不稳定基因为 *AK*。所有处理每个内参基因的标准差 SD 值均小于 1,故 3 组处理中的所有基因都可被作为内参基因 (表5)。

2.3.4 RefFinder 综合分析

根据 RefFinder 综合分析,发现在不同成虫组织处理中,表达最稳定内参基因为 *TUB2*,其次为 *GAPDH*; 不同性别处理中,表达最稳定内参基因为 *TUB1*,其次为 *EF1α*; 在不同发育阶段处理中,表达最稳定内参基因为 *ACTIN3*,其次为 *TBP* (图4)。

表 4 基于 NormFinder 软件的朱红毛斑蛾内参基因稳定性分析
Table 4 Expression stability of reference genes of *Phauda flammans* analyzed by NormFinder

基因名 Genes	组织 Tissues		性别 Sexes		发育阶段 Developmental stages	
	稳定值 Stability value	排序 Rank	稳定值 Stability value	排序 Rank	稳定值 Stability value	排序 Rank
<i>ACTIN2</i>	0.084	8	0.060	4	0.141	8
<i>ACTIN3</i>	0.086	9	0.036	2	0.043	1
<i>TUB1</i>	0.047	3	0.014	1	0.082	4
<i>TUB2</i>	0.028	1	0.079	5	0.179	9
<i>TUB3</i>	0.083	7	0.159	8	0.053	3
<i>EF1α</i>	0.053	4	0.036	2	0.109	6
<i>AK</i>	0.056	5	0.102	7	0.183	10
<i>GAPDH</i>	0.039	2	0.082	6	0.100	5
<i>RPL32</i>	0.137	10	0.048	3	0.134	7
<i>TBP</i>	0.071	6	0.161	9	0.050	2

表 5 基于 Bestkeeper 软件的朱红毛斑蛾内参基因稳定性分析
Table 5 Expression stability of reference genes of *Phauda flammans* analyzed by Bestkeeper

		<i>ACTIN2</i>	<i>ACTIN3</i>	<i>TUB1</i>	<i>TUB2</i>	<i>TUB3</i>	<i>EF1α</i>	<i>AK</i>	<i>GAPDH</i>	<i>RPL32</i>	<i>TBP</i>
组织 Tissues	标准差 SD(CP)	0.24	0.12	0.21	0.17	0.15	0.17	0.13	0.18	0.27	0.21
	变异系数(%) CV(CP)	71.87	93.19	81.91	89.17	120.60	88.67	94.57	50.02	71.87	114.76
	几何平均数 GM(CP)	0.04	0.11	0.16	0.11	0.05	0.03	0.03	0.30	0.24	0.07
	排序 Rank	9	1	8	5	3	4	2	6	10	7
性别 Sexes	标准差 SD(CP)	0.22	0.26	0.25	0.18	0.36	0.26	0.16	0.18	0.24	0.27
	变异系数(%) CV(CP)	53.47	62.40	64.48	32.37	82.23	51.63	54.62	27.20	55.95	112.64
	几何平均数 GM(CP)	0.34	0.31	0.27	0.50	0.21	0.41	0.23	0.63	0.34	0.08
	排序 Rank	3	6	5	2	8	6	1	2	4	7
发育阶段 Developmental stages	标准差 SD(CP)	0.18	0.27	0.28	0.18	0.28	0.30	0.37	0.19	0.30	0.25
	变异系数(%) CV(CP)	90.46	63.55	57.92	101.41	81.25	63.10	100.51	72.37	56.32	68.09
	几何平均数 GM(CP)	0.02	0.11	0.16	0.04	0.04	0.15	0.03	0.06	0.15	0.08
	排序 Rank	1	4	5	1	6	8	9	2	7	3

3 结论与讨论

qRT-PCR 是基因表达分析研究中一种非常可靠的技术，可对靶标基因的表达水平定量，具有灵敏度高和特异性强等优点（Lü *et al.*，2018），是目前基因表达研究中检测或比较 mRNA 水平的标准技术。然而，其对基因表达量的成功检测必

须要有合适的内参基因作为标准进行校准（Stéphanie *et al.*，2009）。对于 qRT-PCR 分析评价内参基因，通常需添加多种参考进行验证，例如，不同处理条件和多种候选内参基因的选择（Shakeel *et al.*，2018）。目前，关于鳞翅目昆虫利用 qRT-PCR 技术进行内参基因筛选已有诸多报道，如研究了桃蛀螟、美国白蛾和偏瞳蔽眼蝶不同发育阶段、成虫组织、性别或温度处理下内参基因

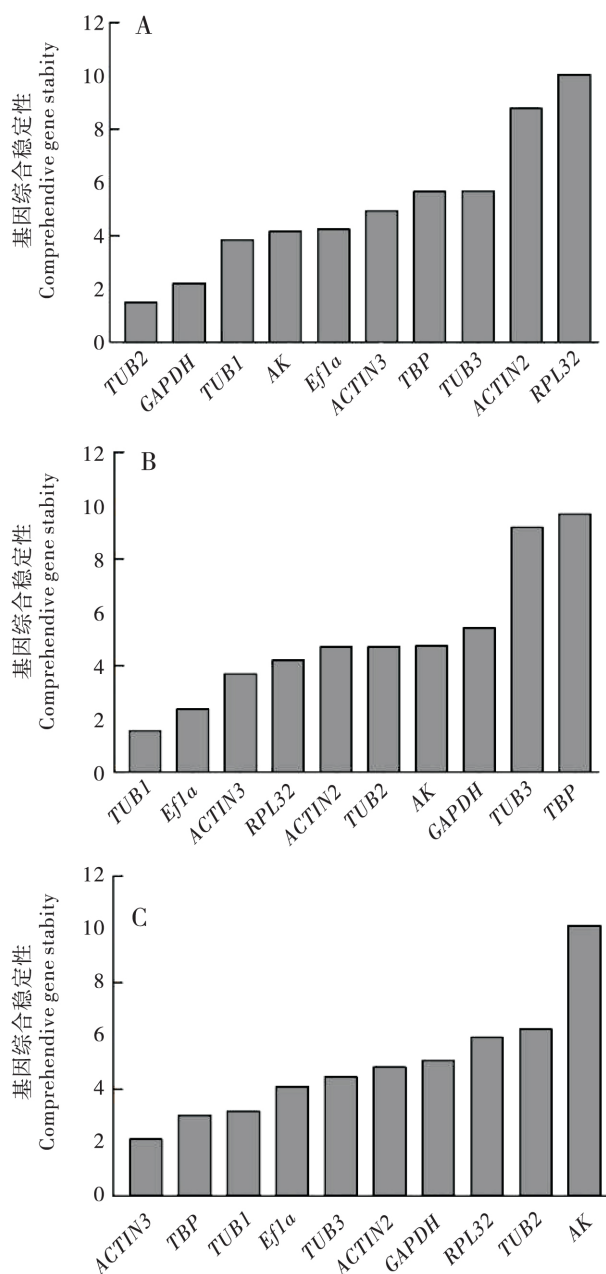


图4 RefFinder 中 Geomean 法分析候选内参基因的表达稳定性

Fig. 4 Expression stability of the candidate reference genes analyzed by the Geomean method in RefFinder

注: A, 不同成虫组织; B, 不同成虫性别; C, 不同发育阶段。Note: A, Different adult tissues; B, Different adult sexes; C, Different developmental stages.

的表达量 (Arun *et al.*, 2015; 杨苓等, 2017; 陶蓉等, 2019)。本研究基于朱红毛斑蛾转录组数据库, 采用不同成虫组织、性别和不同发育阶段3个处理, 对鳞翅目昆虫中常见的10个候选内参基因的稳定性进行了评定。

首先, 在朱红毛斑蛾不同成虫组织中, *TUB2*

和 *GAPDH* 为最适内参基因, 但结果与桃蛀螟 (杨苓等, 2017)、金纹细蛾 *Phyllonorycter ringoniella* Matsumura (郭长宁, 2014) 和小菜蛾 *Plutella xylostella* Linnaeus (He *et al.*, 2017) 等鳞翅目昆虫的研究结果不同, 可能与物种的生物学特异性和组织样品取样类型差异有关。其次, 在黄翅绢野螟 *Diaphania caesalis* Walker 内参基因研究中, 发现不同成虫性别最佳内参基因为 *ACTIN* 和 *EF1α* (Wang *et al.*, 2020), 其中 *EF1α* 为延伸因子1-α (elongation factor-α), 是在 mRNA 翻译时促进多肽链延伸的蛋白质因子 (Serdyuk and Galzitskaya, 2007)。例如, 在鳞翅目粉蝶科斑粉蝶属 *Delias* 中, 利用 *EF1α* 与其他21个类群进行系统发育关系分析 (Morinak *et al.*, 2002), 由此可见该基因的保守性和表达稳定性。在朱红毛斑蛾不同成虫性别处理中, 也发现 *EF1α* 为最适内参基因之一, 认为 *EF1α* 可能在鳞翅目性别表达中较稳定, 适合作为成虫性别处理中基因表达的内参基因。最后, 在朱红毛斑蛾不同发育阶段处理中, *ACTIN3* 和 *TBP* 为最适内参基因, 但与小菜蛾和桃蛀螟等鳞翅目昆虫的研究结果不同 (Fu *et al.*, 2013; 杨苓等, 2017), 表明内参基因的表达稳定性随物种而异, 同时可能也会受试验处理方法和条件的影响。同时, 不同软件分析结果存在一定差异, 可能与软件的算法不同有关, 在其他昆虫内参基因评价中也存在类似情况 (唐培安等, 2016; 刘宁等, 2017)。

内参基因稳定性分析完成后, 基于 GeNorm 计算得到 $V_{n/(n+1)}$ 值 < 0.15, 推算出朱红毛斑蛾最佳内参基因使用数目为2个。自2002年 Vandesompele 编写了 GeNorm 软件以来, 双内参基因在 qRT-PCR 检测中越来越广泛使用, 其原理是不管在任何试验条件下, 2个最佳内参基因的表达水平比值均保持一致, 不受基因表达差异的影响 (Vandesompele *et al.*, 2002)。因此, 在本研究中不同成虫组织、性别和发育阶段3个试验处理下, 最佳内参基因使用数目均为2个即可。

本文研究结果表明, 在朱红毛斑蛾不同成虫组织基因定量研究中, 建议以 *TUB2* 和 *GAPDH* 作为内参基因; 在不同成虫性别基因定量研究中, 建议以 *TUB1* 和 *EF1α* 作为内参基因; 在不同发育阶段基因定量研究中, 建议以 *ACTIN3* 和 *TBP* 作为内参基因。为保证 qRT-PCR 结果的准确性, 最佳内参基因使用数目为2个。

参考文献 (References)

- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. *Cancer Research*, 2004, 64 (15): 5245–5250.
- Anonymous. Hosts – a database of the world's Lepidopteran hostplants. The Natural History Museum, UK, 2017. <http://www.nhm.ac.uk/our-science/data/hostplants/search/list.dsml?beginIndex=140280&browse.dsml=Callidulidae%253D%253D%253D%253DFamily>.
- Arun A, Baumlé V, Amelot G, et al. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR expression analysis of candidate genes involved in olfactory communication in the butterfly *Bicyclus anynana* [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (3): e0120401.
- Fof. Diurnal leaf skeletonizing moth from Vietnam: *Phauda flammans*. What's That Bug, California, USA, 2015. <https://www.whatsthatbug.com/2015/06/08/diurnal-leaf-skeletonizing-moth-from-vietnam-phauda-flammans/>.
- Fu W, Xie W, Zhang Z, et al. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2012, 55 (12): 1406–1412. [符伟, 谢文, 张卓, 等. 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 昆虫学报, 2012, 55 (12): 1406–1412]
- Fu W, Xie W, Zhang Z, et al. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2013, 9 (8): 792–802.
- Guo CN. Cloning and Stability Analysis of Reference Gene from *Phyllonorycter ringoniella* [D]. Yangling: Northwest A & F University Master Thesis, 2014. [郭长宁. 金纹细蛾内参基因克隆分析及稳定性评价 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2014]
- He P, Zhang YF, Hong DY, et al. A reference gene set for sex pheromone biosynthesis and degradation genes from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, based on genome and transcriptome digital gene expression analyses [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 219.
- Jiang L, Wang LC, Guo Q, et al. Efficacy test of four pesticides against *Phauda flammans* (Lepidoptera: Zygaenidae) larvae [J]. *Forest Pest and Disease*, 2018, 37 (6): 41–44. [蒋露, 王林聪, 郭强, 等. 四种药剂对朱红毛斑蛾幼虫室内药效测定 [J]. 中国森林病虫, 2018, 37 (6): 41–44]
- Liu JY, He QL, Wei H, et al. Biological characteristics of *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) [J]. *Plant Protection*, 2015, 41 (3): 188–192. [刘俊延, 何秋隆, 魏航, 等. 朱红毛斑蛾生物学特性研究 [J]. 植物保护, 2015, 41 (3): 188–192]
- Liu JY, Ma ZH, Wu SY, et al. Studies on the feeding preferences of *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38 (5): 924–930. [刘俊延, 马仲辉, 吴塞逸, 等. 朱红毛斑蛾嗜食性的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 38 (5): 924–930]
- Liu N, Zhang TS, Li ZZ, et al. Selection of the reference genes in *Ostrinia furnacalis* (Guenée) under diapause and different insect states [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (3): 611–617. [刘宁, 张统书, 李忠洲, 等. 滞育及不同虫态下亚洲玉米螟内参基因的筛选 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (3): 611–617]
- Lu Y, Yuan M, Gao X, et al. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (7): e68059.
- Lü J, Yang CX, Zhang YJ, et al. Selection of reference genes for the normalization of RT-qPCR data in gene expression studies in insects: a systematic review [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1560.
- Matta BP, Blanche C, Bitner-Mathé, et al. Getting real with real-time qPCR: A case study of reference gene selection for morphological variation in *Drosophila melanogaster* wings [J]. *Development Genes & Evolution*, 2011, 221 (1): 49–57.
- Mao YT, Jia RJ, Zhu CQ, et al. Identification of sexing and observation on reproductive system of *Phauda flammans* [J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2017, 37 (6): 88–92. [茅裕婷, 贾蕊娟, 朱诚祺, 等. 朱红毛斑蛾雌雄鉴别与生殖系统解剖观察 [J]. 浙江林业科技, 2017, 37 (6): 88–92]
- Meng LY. Effects of Five Pesticides on Toxicity, and Enzyme System in *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) [D]. Nanning: Guangxi University Master Thesis, 2017. [孟令昱. 5 种杀虫剂对朱红毛斑蛾的毒力及其体内酶系的影响 [D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2017]
- Morinak S, Miyata T, Tanaka K, et al. Molecular phylogeny of the Eichhorni group of *Delias* Hübner, 1819 (Lepidoptera: Pieridae) [J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 2002, 23 (2): 276–287.
- Nageshchandra BK, Rajagopal BK, Balasubramanian R. Occurrence of slug caterpillar *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) on *Ficus racemosa* L. in South India [J]. *Mysore Journal of Agricultural Science*, 1972, 6 (2): 186–189.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26 (6): 509–515.
- Prunier FP, Chouteau M, Whibley A, et al. Selection of valid reference genes for reverse transcription quantitative PCR analysis in *Heliconius numata* (Lepidoptera: Nymphalidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2016, 16 (1): 50; 1–8.
- Ridgeway JA, Timm AE. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in larvae of three species of *Grapholitini* (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (6): e0129026.
- Serdyuk IN, Galzitskaya OV. Disordered regions in elongation factors

- EFl α in the three superkingdoms of life [J]. *Molecular Biology*, 2007, 41 (6): 949–961.
- Shakeel M, Alicia R, Tahir UB, *et al.* Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: An overview in insects [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40: 227–236.
- Shakeel M, Zhu X, Kang TH, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for quantitative gene expression studies in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2015, 18 (2): 123–130.
- Shi CH, Hu JR, Li CR, *et al.* Advances in the study of internal reference genes in insect qRT-PCR [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45 (7): 1–7. [史彩华, 胡静荣, 李传仁, 等. 内参基因在昆虫 qRT-PCR 中的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (7): 1–7]
- Silver N, Best S, Jiang J, *et al.* Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using realtime PCR [J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7: 33.
- Stéphanie G, Mélanie M, Jérôme P, *et al.* Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60 (2): 487–493.
- Sun M, Lu MX, Tang XT, *et al.* Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (1): e0115979.
- Tang PA, Zhang QL, Xue H, *et al.* Selection of internal reference genes in quantitative real-time PCR of the *Plodia interpunctella* [J]. *Scientia Sinica*, 2016, 46 (10): 1201–1209. [唐培安, 张麒麟, 薛昊, 等. 印度谷螟实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. 中国科学, 2016, 46 (10): 1201–1209]
- Tao R, Li H, Sun YH, *et al.* Identification and screening of internal reference genes of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2019, 55 (9): 111–120. [陶蓉, 李慧, 孙宇航, 等. 美国白蛾内参基因的鉴定及筛选 [J]. 林业科学, 2019, 55 (9): 111–120]
- Teng X, Zhang Z, He G, *et al.* Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects [J]. *Journal of Insect Science*, 2012, 12 (1): 1–17.
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biology*, 2002, 3 (7): research0034.
- Van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *Biotechniques*, 2008, 44: 619–626.
- Verma TD, Dogra GS. Occurrence of *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) on *Ficus* species in Himachal Pradesh [J]. *Journal of Tree Science*, 1982, 1 (1/2): 130–132.
- Wang X, Xiong M, Wang J, *et al.* Reference gene stability of a synanthropic fly, *Chrysomya megacephala* [J]. *Parasites & Vectors*, 2015, 8 (1): 565.
- Wang Z, Meng QQ, Zhu X, *et al.* Identification and evaluation of reference genes for normalization of gene expression in developmental stages, sexes, and tissues of *Diaphania caesalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2020, 20 (1): 6; 1–9.
- Xu J, Lu MX, Cui YD, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2017, 110 (2): 683–691.
- Yang L, Hu XJ, Xu ZF, *et al.* Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (11): 1266–1277. [杨苓, 胡晓静, 徐志峰, 等. 桃蛀螟实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (11): 1266–1277]
- Yang X, Pan H, Yuan L, *et al.* Reference gene selection for RT-qPCR analysis in *Harmonia axyridis*, a global invasive lady beetle [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 2689.
- Zhang L, Zhang QL, Wang XT, *et al.* Selection of reference genes for qRT-PCR and expression analysis of high-altitude-related genes in *Grassland caterpillars* (Lepidoptera: Erebidae: Gynaephora) along an altitude gradient [J]. *Ecology and Evolution*, 2017, 7: 9054–9065.
- Zhang RY, Li J, Geng S, *et al.* The first mitochondrial genome for Phaudidae (Lepidoptera) with phylogenetic analyses of Zygaenoidea [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149: 951–961.
- Zheng XL, Li J, Su L, *et al.* Ecological and morphological characteristics of parasitoids in *Phauda flammans* (Lepidoptera: Zygaenidae) [J]. *Parasite*, 2015, 22: 36.
- Zheng XL, Liu JY, Huang ZY, *et al.* Cold hardiness of *Phauda flammans* (Lepidoptera: Zygaenidae) larvae [J]. *Entomologica Fennica*, 2017, 28 (1): 9–15.
- Zheng XL, Liu JY, Zhang ZL, *et al.* Diel rhythms of sexual behavior and pheromone responses in *Phauda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Zygaenidae) [J]. *Pest Management Science*, 2019, 75 (11): 3070–3075.