



陈晓, 邱峙嵩, 苏小燕, 许原, 曹丽沙, 杨振德, 胡平. 桉蝙蛾幼虫实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 1016–1026.

桉蝙蛾幼虫实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选

陈晓, 邱峙嵩, 苏小燕, 许原, 曹丽沙, 杨振德, 胡平*

(广西大学林学院, 南宁 530004)

摘要: 本研究通过筛选桉蝙蛾 *Endoclyta signifer* Walker 幼虫不同龄期与不同体节中稳定表达的内参基因, 为桉蝙蛾基因表达研究提供参考。通过实时荧光定量 PCR 技术测定 5 个候选内参基因 (*ACTIN*、*GAPDH*、*TUB*、*RIB*、*EF*) 在桉蝙蛾幼虫不同龄期 (3 龄、5 龄、9 龄、12 龄) 与不同体节 (头部、胸部、腹部) 及全样品 (由所有样品组成) 处理中的表达量, 后利用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 对 5 个候选基因的稳定性进行评估, 最后由 RefFinder 综合分析结果, 选出最佳的内参基因。基于 4 种分析方法的评估可知, 桉蝙蛾 5 龄和 9 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的头部和胸部中内参基因的最佳数目为 2, 而 3 龄和 12 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的腹部及全样本中内参基因的最佳数目为 3。3 龄、5 龄、9 龄和 12 龄幼虫的不同体节中可分别选择 *ACTIN* + *RIB* + *GAPDH*、*EF* + *RIB*、*GAPDH* + *EF* 和 *ACTIN* + *RIB* + *GAPDH* 作为最稳定的内参基因组合; *EF* + *RIB*、*RIB* + *GAPDH* 和 *EF* + *GAPDH* + *ACTIN* 可分别作为不同龄期幼虫头部、胸部和腹部的最佳内参基因组合; 综合考虑桉蝙蛾幼虫不同龄期与不同体节的影响时, 可选择 *RIB*、*ACTIN* 和 *GAPDH* 作为内参基因。

关键词: 桉蝙蛾; 幼虫; 龄期; 体节; 内参基因; RT-qPCR

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-1016-11

Screening of reference genes for RT-qPCR analysis in *Endoclyta signifer* Walker larvae

CHEN Xiao, QIU Zhi-Song, SU Xiao-Yan, XU Yuan, CAO Li-Sha, YANG Zhen-De, HU Ping*
(Forestry College of Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Screening the reference genes stably expressed in different instars and different body segments of *Endoclyta signifer* Walker larvae, which provided a reference for gene expression study of *E. signifer*. Expression levels of five candidate reference genes (*ACTIN*, *GAPDH*, *TUB*, *RIB* and *EF*) in different instars (3rd, 5th, 9th and 12th instars), different body segments (head, thorax and abdomen) and the all samples were determined by real-time quantitative PCR. GeNorm, NormFinder and BestKeeper were used to evaluate the stability of 5 candidate genes. Finally, RefFinder comprehensively analyzed the results and selected the best reference gene. Optimal number of reference genes was 2 in different body segments of 5th and 9th instar *E. signifer* larvae, head and thorax of different instar larvae, and 3 in different body segments of 3rd and 12th instar larvae, abdomen of different instar larvae, and the all samples. *ACTIN* + *RIB* + *GAPDH*, *EF* + *RIB*, *GAPDH* + *EF* and *ACTIN* + *RIB* + *GAPDH* could be selected as the most stable reference gene combinations in different segments of 3rd, 5th, 9th and 12th instar larvae, respectively. *EF* +

基金项目: 广西壮族自治区科技基地和人才专项 (2020AC19057); 广西壮族自治区自然科学基金面上项目 (2020JJA130068); 国家自然科学基金青年科学基金 (32001321)

作者简介: 陈晓, 男, 1998 年生, 广西玉林人, 硕士研究生, 研究方向为森林病虫害防治, E-mail: 2009302002@st.gxu.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 胡平, 女, 博士, 讲师, 研究方向为森林病虫害防治, E-mail: hupingcs@163.com

收稿日期 Received: 2022-03-28; 接受日期 Accepted: 2022-06-14

RIB, *RIB + GAPDH* and *EF + GAPDH + ACTIN* could be used as the most stable reference gene combinations in the head, thorax and abdomen of larvae at different instars, respectively. *RIB*, *ACTIN* and *GAPDH* could be selected as reference genes when the effects of different instars and different body segments of *E. signifer* larvae were considered.

Key words: *Endoclista signifer*; larvae; instar; body segment; reference gene; RT-qPCR

桉蝙蛾 *Endoclista signifer* Walker (鳞翅目 Lepidoptera 蝙蝠蛾科 Hepialidae) 是桉树上的一种重要蛀干性害虫之一。近年来,随着我国南方速生桉人工林大面积的规模化种植,桉蝙蛾危害范围逐渐扩大,已成为影响桉树产业发展的主要蛀干性害虫(杨秀好等,2021)。桉蝙蛾雌虫交配后,多将卵随机散产于1~3年生的桉树幼林内;幼虫3龄以前,营地栖生活,3~5龄幼虫上树蛀干,此后营树栖生活,直至12龄末期于所蛀孔洞内化蛹(于永辉,2012)。受桉蝙蛾危害的桉树生长发育减缓,材积减少、材质下降,且易风折、枯死(杨秀好,2013)。目前,针对桉蝙蛾的研究主要集中在生物生态学特性(曹书阁等,2011;杨秀好等,2012; Yang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2016; 胡平等,2021)、生物防治(蓝霞等,2014; 邹东霞等,2016)以及遗传与生理学(Yang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021)等方面,而对桉蝙蛾幼虫内参基因的研究尚未见报道。

实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 是检测生物体中基因表达差异常用的核酸定量检测技术之一,而 RT-qPCR 结果的可靠与否,依赖于内参基因这一重要因素。常用的内参基因包括延伸因子 (Elongation factors, *EF*)、肌动蛋白基因 (Actin, *ACTIN*)、核糖体蛋白基因 (Ribosomal protein, *RIB*)、微管蛋白基因 (Tubulin, *TUB*) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 等基因 (Lu *et al.*, 2018)。内参基因一般选择参与细胞基本生命活动、在生物体内的各个部位和不同的实验处理下均能稳定表达的基因。然而,研究表明内参基因的稳定性是相对的,随着实验处理的改变,在不同生理状态下,内参基因的表达存在差异 (Zhang *et al.*, 2014; Shakeel *et al.*, 2018)。因此,在利用 RT-qPCR 进行目的基因表达水平研究时,必须使用合适的内参基因对 RT-qPCR 数据进行分析校正和标准化处理,以减少样本之间由 RNA 提取、cDNA 定量、转录和扩增所

带来的误差,从而得出正确的判断 (Guenin *et al.*, 2009)。

本文通过 RT-qPCR 技术检测桉蝙蛾幼虫不同龄期 (3 龄、5 龄、9 龄、12 龄)、不同体节 (头、胸、腹) 和全样品处理下的候选内参基因表达量,并利用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 等计算程序对 5 个候选内参基因的稳定性进行评估,为桉蝙蛾幼虫基因表达的研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及样本采集

桉蝙蛾幼虫于 2019 年 6 月-2020 年 9 月采自广西壮族自治区国有高峰林场 (N 22° 941', E 108° 336') 的桉树寄主上。将受害木段锯下带回实验室内,劈开木段后取出幼虫,于 -80℃ 下冷冻保存。参考王缉健等 (2015) 的龄期划分方法,取 3 龄和 5 龄 (地栖或初转树栖,低龄幼虫)、9 龄 (树栖,中龄幼虫)、12 龄 (越冬,老龄幼虫) 桉蝙蛾幼虫,用解剖手术剪沿腹部中线剪开幼虫胸腹部表皮,清除脂肪和肠道后,分别剪下头、胸、腹,作为不同体节与不同龄期的样品,所有样品作为全样品处理。每个龄期和体节各重复 3 次。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 RNeasy[®] Plus Mini Kit 试剂盒 (No. 74134; Qiagen, Hilden, Germany) 提取所有样本总 RNA,具体步骤参照 RNeasy[®] Plus Mini Kit 试剂盒说明书。取 1 μL RNA 样品,使用 NanoDrop 8000 (Thermo, Waltham, MA, USA) 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 与 OD₂₆₀/OD₂₃₀,当各自的比值在 1.8~2.1 之间,且通过琼脂糖凝胶电泳检测能获得清晰条带的样品用于 cDNA 合成。取 1 μL RNA 的量,按照反转录试剂盒 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (TranGen Biotech) 的步骤合成 cDNA。

1.3 内参基因选择及 RT-qPCR 引物设计

参考其他昆虫常用的内参基因, 选取按扁蛾幼虫转录组 (Zhang *et al.*, 2021) 中鉴定的 *ACTIN*、*GAPDH*、*TUB*、*RIB*、*EF* 作为候选内参基因 (表 1)。利用引物设计工具 Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) 设计 RT-qPCR 引物 (表 1)。引物由北京 TSINGKE 公司合成。

1.4 标准曲线制作和 RT-qPCR 分析

将样品 cDNA 模板梯度稀释 1/10、1/100、1/500、1/1 000、1/1 500 进行反应, 在冰上进行反应体系的配制, RT-qPCR 反应体系 (25 μ L) 如

下: Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX) (ABclonal Technology) 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA 稀释液 2.0 μ L, Nuclease-free H₂O 8.5 μ L, 在 Ligh Cycler 480 II (Roche, USA) 上进行反应。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火和延伸共 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s 形成熔解曲线。通过熔解曲线与梯度浓度扩增的标准曲线, 检测每对引物的扩增特异性、扩增效率及标准曲线的回归系数 R^2 (表 1)。每个 cDNA 样品设置 3 次技术性重复和 3 次生物学重复。

表 1 按扁蛾幼虫样本中 5 个候选内参基因的引物序列和扩增子特征

Table 1 Primer sequences and amplicon characteristics of the 5 candidate reference genes in *Endoclyta signifer* Walker larvae samples

基因名 Genes	基因全称 Full name of genes	GenBank 登记号 GenBank accession NO.	引物序列 (5'-3') Primer sequences	产物 长度 (bp) Length	扩增 效率(%) Amplification efficiency	回归 系数(R^2) Regression coefficients
<i>ACTIN</i>	肌动蛋白 Actin	OM646549	F: CACCGGTATCGTCTTGGACT R: TCTCCTTGATGTCACGAACG	200	99.8	0.995
<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	OM646546	F: TTGACACCGACGACAAACAT R: ATTGCTGTTTTCTCGGAACG	188	100.5	0.997
<i>TUB</i>	微管蛋白 Tulubin	OM912451	F: CGTTCGTGACATCAAGGAGA R: CAAGAATGAGGGCTGGAAGA	178	106.2	0.996
<i>RIB</i>	核糖体蛋白 Ribosomal protein	OM912452	F: GCAAGAAGACTGGGATACCG R: AGCAATGGACTGAAGGTTGC	165	99.7	0.999
<i>EF</i>	延伸因子 Elongation factors	OM646548	F: CAAGCACAACCGTCTCTTCA R: ACCAGATCTTACGGGCTCT	161	108.4	0.995

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

分别利用内参基因评估软件 GeNorm、BestKeeper 和 NormFinder 软件及 RefFinder 在线网站 (<https://www.heartcure.com.au/reffinder>) 评价候选内参基因在按扁蛾幼虫不同龄期与不同体节中的表达稳定性。在利用 GeNorm 分析时, 表达稳定值 $M < 1.5$ 且数值越小, 表示该基因相较其他候选内参基因更能在当前实验处理下稳定表达; 而配对差异值 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ 时则表示最佳的内参基因数目为 n 个, 不需再增加其数量, 否则加入新基因, 直至 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ (Vandesompele

et al., 2002)。Normfinder 通过计算不同样本组内和组间的变化来评估候选内参基因表达稳定值 (Stability value, SV), 该值越小表示基因越稳定 (Andersen *et al.*, 2004)。BestKeeper 直接使用 Ct 值进行计算, 主要通过标准偏差 (Standard deviation, SD) 来评估候选内参基因的稳定性, 当 $SD < 1$ 且 SD 数值越小时, 认为该基因的表达越稳定 (Pfaffl *et al.*, 2004)。最后, 通过常用的 RefFinder 对 3 种软件得出的内参基因稳定性进行综合排名, 即加权几何平均值越小越稳定 (Xie *et al.*, 2012)。

2 结果与分析

2.1 引物扩增效率及特异性

所有基因的扩增条带清晰而单一, 且扩增产物长度与预期一致 (图 1); 同时, 基于候选内参基因不同浓度的 cDNA 获得的标准曲线具有良好的回归系数 ($R^2 > 0.995$), PCR 扩增效率在 99.7% ~ 108.4% 之间 (表 1), 表明各候选内参基因的引物设计合理, 可用于相应基因的定量检测。

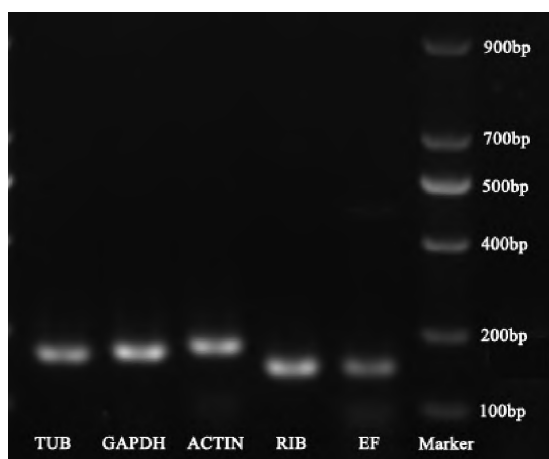


图 1 引物的 PCR 扩增条带

Fig. 1 PCR amplification bands of primers

2.2 不同候选内参基因在样品中的表达水平差异

RT-qPCR 分析桉蝙蛾 5 个候选内参基因的表达水平显示, 在所有样品中, 各基因的 Ct 平均值在 24.13 ~ 28.84 之间, 表明所有候选内参基因在各处理中均有较高的表达量, 且在不同处理的表达量均存在差异。其中, *ACTIN* 的平均表达丰度最大 (24.13)、表达水平差异最小 ($SD = 2.40$); 而 *TUB* 的表达水平差异 ($SD = 6.48$) 最大, 其次为 *EF* ($SD = 3.30$)、*GAPDH* ($SD = 3.21$)、*RIB* ($SD = 2.84$) (图 2)。

2.2 候选内参基因在不同处理下的稳定性分析

2.2.1 BestKeeper 软件分析

在 3 龄幼虫的不同体节中, 所有基因的 SD 值均大于 1, 均不适于作为内参基因; *RIB* 和 *EF* 在 5 龄幼虫的不同体节中具有较好的表达稳定性, 而 *ACTIN*、*GAPDH* 和 *TUB* 的 SD 值均大于 1, 显示较差的稳定性; 9 龄幼虫的不同体节中, 表达最稳定的基因为 *EF*, 其次为 *GAPDH*、*RIB*, 而 *ACTIN* 最不稳定; 相反, *ACTIN* 在 12 龄幼虫的不同体节中的表达最稳定, *EF* 次之, 而 *GAPDH*、*RIB* 和 *TUB*

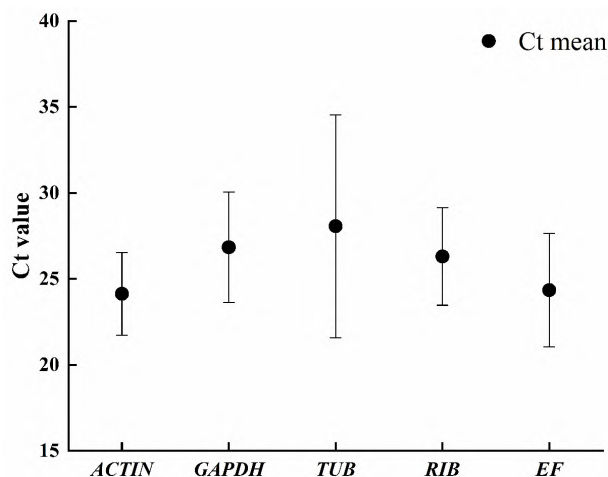


图 2 不同候选内参基因在桉蝙蛾幼虫样本中的表达水平 (Ct 值)

Fig. 2 Expression levels of different candidate reference genes in the samples of *Endoclyta signifer* larvae (Ct value)

注: 点为 Ct 平均值, 中垂线的上下限为标准偏差。
Note: The point represent the Ct mean value, and the upper and lower limits of the midline represent the standard deviation.

不适于作为内参基因 ($SD > 1$)。在不同龄期幼虫的胸部中仅 *GAPDH* 能稳定表达 ($SD = 0.688 < 1$), 其余 4 个候选内参基因均不适于作为内参基因 ($SD > 1$); 所有基因在不同龄期幼虫的头部和腹部中的表达均不稳定 ($SD > 1$)。没有任何一个基因能在所有处理中稳定表达。特别是 *TUB* 在所有处理中均被认为是不稳定的基因 ($SD > 1$) (表 2)。

2.2.2 GeNorm 软件分析

在 3 龄、5 龄、9 龄和 12 龄幼虫的不同体节中, 最稳定的一对基因分别为 *ACTIN/RIB*、*RIB/EF*、*GAPDH/EF* 和 *GAPDH/RIB*, 其中 *ACTIN* 在 9 龄幼虫的不同体节中表达最不稳定, *TUB* 在 3 龄、5 龄和 12 龄幼虫的不同体节中均被认为是最不稳定的基因; 在不同龄期幼虫的头部中仅 *RIB* 和 *EF* 能稳定表达, 而在不同龄期幼虫的胸部、腹部和全样品处理中, 所有基因的 M 值均大于 1.5, 认为在这 3 个处理中无任一基因可作为内参基因 (表 2)。

2.2.3 NormFinder 软件分析

3 龄幼虫的不同体节中的基因稳定性排序为 $RIB > ACTIN > GAPDH > EF > TUB$, *RIB*、*TUB* 分别为最稳定、最不稳定的基因。5 龄和 9 龄幼虫的不同体节中, 稳定性较高的前 3 个基因同为 $GAPDH > EF > RIB$, 而 *ACTIN* 和 *TUB* 被认为稳定

性较低; *ACTIN* 在 12 龄幼虫的不同体节中稳定性最高, *TUB* 仍是稳定性最低的基因; *EF* 是不同龄期幼虫的头部中表达最稳定的基因, 而 *RIB* 是不同龄期幼虫的胸部、腹部及全样品处理中表达最稳定的基因。同样地, 所有样本中最不稳定的基因均为 *TUB*, 这与 BestKeeper 的结果一致 (表 2)。

2.2.4 RefFinder 综合分析

3 龄和 12 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的胸部以及全样品中, *RIB*、*ACTIN* 和 *GAPDH* 是稳定性排序前 3 的基因, 排序分别为 *RIB* > *ACTIN* > *GAPDH* 和 *ACTIN* > *RIB* > *GAPDH*、*RIB* > *GAPDH* > *ACTIN* 以及 *RIB* > *ACTIN* > *GAPDH*; 而 *EF* 和 *TUB*

表 2 不同处理下候选内参基因的表达稳定性

Table 2 Expression stability of candidate reference genes under different experimental conditions

试验条件 Experimental condition	排序 Rank	BestKeeper		GeNorm		NormFinder	
		Gene	SD	Gene	M	Gene	SV
同一龄期不同体节 (头、胸、腹) Different segments of the same instar (head, thorax and abdomen)							
3 龄 3 rd instar	1	<i>GAPDH</i>	1.429	<i>ACTIN/RIB</i>	0.657	<i>RIB</i>	1.271
	2	<i>RIB</i>	1.713	<i>GAPDH</i>	2.977	<i>ACTIN</i>	1.447
	3	<i>ACTIN</i>	1.830	<i>EF</i>	3.134	<i>GAPDH</i>	1.681
	4	<i>EF</i>	2.027	<i>TUB</i>	4.044	<i>EF</i>	2.337
	5	<i>TUB</i>	2.921			<i>TUB</i>	3.362
5 龄 5 th instar	1	<i>RIB</i>	0.423	<i>RIB/EF</i>	0.474	<i>GAPDH</i>	0.903
	2	<i>EF</i>	0.774	<i>ACTIN</i>	2.132	<i>EF</i>	1.474
	3	<i>ACTIN</i>	2.335	<i>GAPDH</i>	3.608	<i>RIB</i>	2.024
	4	<i>GAPDH</i>	4.154	<i>TUB</i>	5.358	<i>ACTIN</i>	2.889
	5	<i>TUB</i>	7.508			<i>TUB</i>	5.379
9 龄 9 th instar	1	<i>EF</i>	0.151	<i>GAPDH/EF</i>	0.488	<i>GAPDH</i>	0.169
	2	<i>GAPDH</i>	0.270	<i>RIB</i>	0.640	<i>EF</i>	0.169
	3	<i>RIB</i>	0.578	<i>TUB</i>	1.082	<i>RIB</i>	0.445
	4	<i>TUB</i>	1.397	<i>ACTIN</i>	1.965	<i>TUB</i>	1.293
	5	<i>ACTIN</i>	2.017			<i>ACTIN</i>	2.232
12 龄 12 th instar	1	<i>ACTIN</i>	0.277	<i>GAPDH/RIB</i>	0.467	<i>ACTIN</i>	0.382
	2	<i>EF</i>	0.967	<i>ACTIN</i>	2.061	<i>RIB</i>	1.317
	3	<i>RIB</i>	1.900	<i>EF</i>	2.405	<i>GAPDH</i>	1.495
	4	<i>GAPDH</i>	1.906	<i>TUB</i>	3.012	<i>EF</i>	1.669
	5	<i>TUB</i>	2.206			<i>TUB</i>	2.404
同一体段不同龄期 (3 龄、5 龄、12 龄) The same segment in different instars (3 rd , 5 th and 12 th instar)							
头 Head	1	<i>ACTIN</i>	1.580	<i>RIB/EF</i>	0.984	<i>EF</i>	0.341
	2	<i>GAPDH</i>	1.867	<i>ACTIN</i>	1.755	<i>RIB</i>	1.167
	3	<i>EF</i>	2.382	<i>GAPDH</i>	2.882	<i>ACTIN</i>	1.630
	4	<i>RIB</i>	2.440	<i>TUB</i>	3.436	<i>GAPDH</i>	2.375
	5	<i>TUB</i>	3.611			<i>TUB</i>	2.572

续表 2 Continued table 2

试验条件 Experimental condition	排序 Rank	BestKeeper		GeNorm		NormFinder	
		Gene	SD	Gene	M	Gene	SV
胸 Thorax	1	<i>GAPDH</i>	0.688	<i>GAPDH/RIB</i>	1.289	<i>RIB</i>	0.447
	2	<i>RIB</i>	1.786	<i>ACTIN</i>	2.052	<i>ACTIN</i>	0.835
	3	<i>ACTIN</i>	1.957	<i>EF</i>	3.249	<i>GAPDH</i>	1.217
	4	<i>EF</i>	3.544	<i>TUB</i>	4.816	<i>EF</i>	3.384
	5	<i>TUB</i>	5.813			<i>TUB</i>	4.742
腹 Abdomen	1	<i>ACTIN</i>	1.358	<i>ACTIN/EF</i>	3.419	<i>RIB</i>	1.510
	2	<i>EF</i>	1.783	<i>RIB</i>	4.026	<i>EF</i>	2.585
	3	<i>RIB</i>	2.701	<i>GAPDH</i>	4.886	<i>ACTIN</i>	2.726
	4	<i>GAPDH</i>	3.963	<i>TUB</i>	5.261	<i>GAPDH</i>	2.748
	5	<i>TUB</i>	4.344			<i>TUB</i>	3.323
全样品 All samples							
	1	<i>ACTIN</i>	1.881	<i>ACTIN/RIB</i>	2.863	<i>RIB</i>	0.991
	2	<i>GAPDH</i>	2.267	<i>EF</i>	3.266	<i>ACTIN</i>	1.765
	3	<i>RIB</i>	2.309	<i>GAPDH</i>	3.804	<i>GAPDH</i>	2.061
	4	<i>EF</i>	2.534	<i>TUB</i>	4.640	<i>EF</i>	2.450
	5	<i>TUB</i>	5.520			<i>TUB</i>	3.644

注: Gene, 基因; SD, 标准偏差; M, M 值; SV, 稳定值。Note: SD, Standard deviation; M, M Value; SV, Stability value.

为稳定性较低的一对基因, 其中 *TUB* 在这些处理中均为最不稳定的基因。5 龄和 9 龄幼虫的不同体节中, 排列前 3 的基因同为 *EF*、*RIB*、*GAPDH*, 排序分别为 $EF > RIB > GAPDH$ 、 $GAPDH > EF > RIB$; 而 *ACTIN* 和 *TUB* 的稳定性较差, 5 龄、9 龄幼虫的不同体节中最不稳定的基因分别为 *TUB*、*ACTIN*。不同龄期幼虫的头部和胸部中稳定性排序均为 $EF > RIB > ACTIN > GAPDH > TUB$ (图 3)。

2.2.5 最适内参基因的确定

在 8 种处理中, 各处理的 $V_{n/(n+1)}$ 值均大于 0.15 (图 4), 说明通过配对变异值不能完全确定内参基因的最佳数目, 但可根据 $V_{n/(n+1)}$ 值的变化趋势, 选择表达稳定性最好的 2~3 个基因作为最适内参基因。在 5 龄和 9 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的头部和胸部中, 加入第 3 个内参基因会使得 $V_{n/(n+1)}$ 值增大, 故这 4 个处理的内参基因最佳数目均为 2 个; 相反, 在 3 龄和 12 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的腹部及全样品处理中, 引入第 3 个内参基因会减小 $V_{n/(n+1)}$ 值, 因此这 3 个处理中的内参基因最佳数目均为 3 个。

结合 RefFinder 综合排序的分析 (图 3), 3 龄、12 龄幼虫的不同体节及全样本中最稳定的内参基因组合为 $ACTIN + RIB + GAPDH$; 5 龄幼虫的不同体节和不同龄期幼虫的头部中, $EF + RIB$ 为最稳定的内参基因组合; 在 9 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的胸部和腹部中, 可分别选择 $GAPDH + EF$ 、 $RIB + GAPDH$ 和 $EF + RIB + ACTIN$ 作为最稳定的内参基因组合 (表 3)。

3 结论与讨论

RT-qPCR 技术是基因表达与转录分析中最常用的技术手段之一, 其中内参基因的稳定性直接影响着 RT-qPCR 的实验结果, 选择合适的内参基因是保证 RT-qPCR 结果可靠性的重要基础 (Dundas and Ling, 2012)。迄今为止, 没有任何一个内参基因在所有实验处理下保持恒定的表达水平, 因此在进行 RT-qPCR 前, 有必要进行内参基因的筛选 (Shi and Zhang, 2016)。

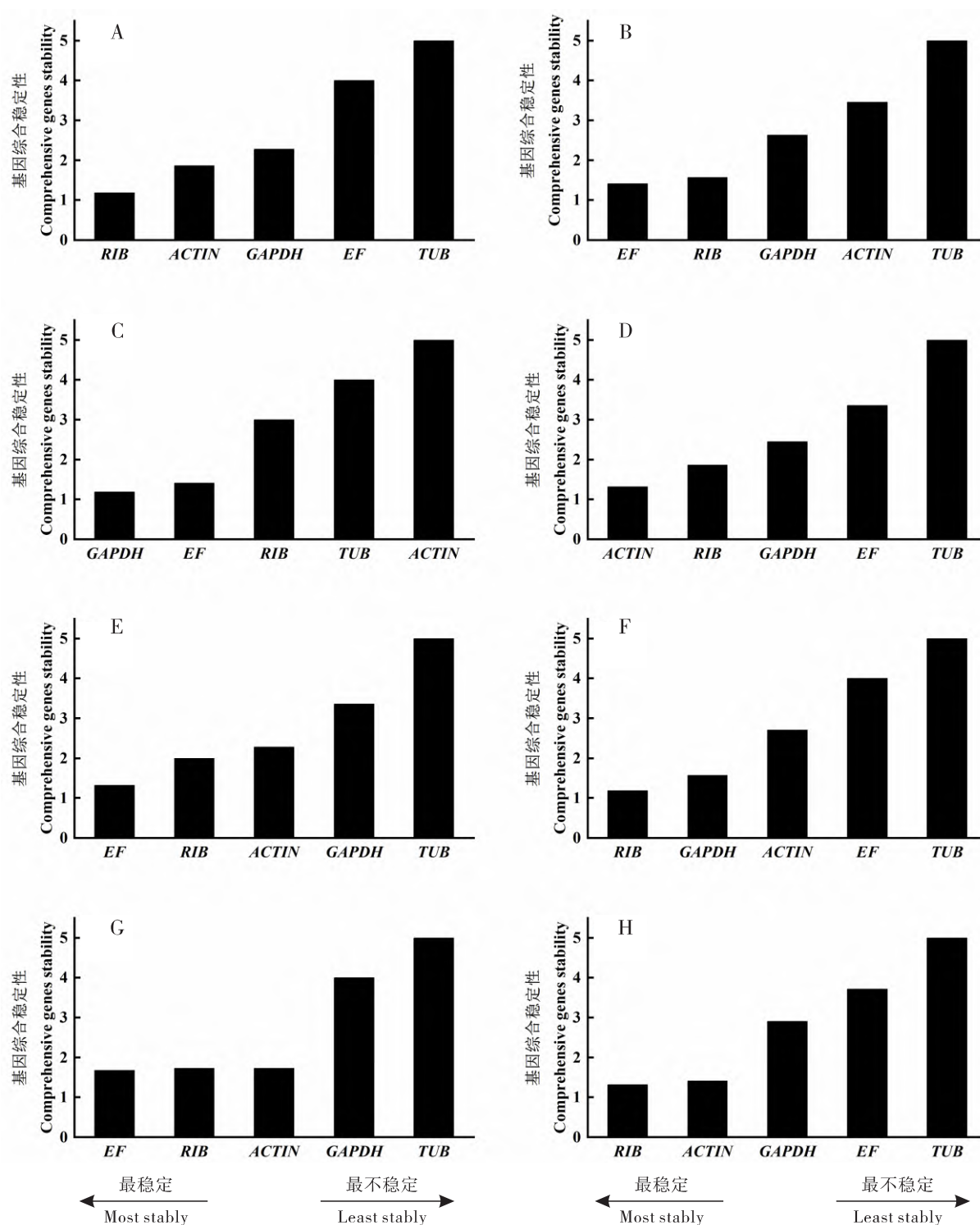


图3 基于 RefFinder 软件分析候选内参基因的表达稳定性

Fig. 3 Expression stability of the candidate reference genes was analyzed by RefFinder software

注: A、B、C、D 分别为 3 龄、5 龄、9 龄、12 龄幼虫的不同体节; E、F、G 分别为不同龄期幼虫的头部、胸部、腹部; H 为全样品。Note: A, B, C and D represented the different segments of the 3rd, 5th, 9th and 12th instar larvae, respectively; E, F and G represented the head, thorax and abdomen of different instars; H was for all samples.

表 3 不同处理下最佳的内参基因组合

Table 3 Optimal gene combination of reference genes under different treatments

处理 Treatments	表达最稳定基因 Most stably expressed gene	最佳的内参基因组合 Optimal combination of reference genes	表达最不稳定基因 Least stably expressed gene
同一龄期不同体节 (头、胸、腹) Different segments of the same instar (head , thorax and abdomen)			
3 龄 3 rd instar	<i>RIB</i>	<i>RIB + ACTIN + GAPDH</i>	<i>TUB</i>
5 龄 5 th instar	<i>EF</i>	<i>EF + RIB</i>	<i>TUB</i>
9 龄 9 th instar	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH + EF</i>	<i>ACTIN</i>
12 龄 12 th instar	<i>ACTIN</i>	<i>ACTIN + RIB + GAPDH</i>	<i>TUB</i>
同一体段不同龄期 (3 龄、5 龄、12 龄) The same segment in different instars (3 rd ,5 th and 12 th instar)			
头部 Head	<i>EF</i>	<i>EF + RIB</i>	<i>TUB</i>
胸部 Thorax	<i>RIB</i>	<i>RIB + GAPDH</i>	<i>TUB</i>
腹部 Abdomen	<i>EF</i>	<i>EF + RIB + ACTIN</i>	<i>TUB</i>
全样本 All samples	<i>RIB</i>	<i>RIB + ACTIN + GAPDH</i>	<i>TUB</i>

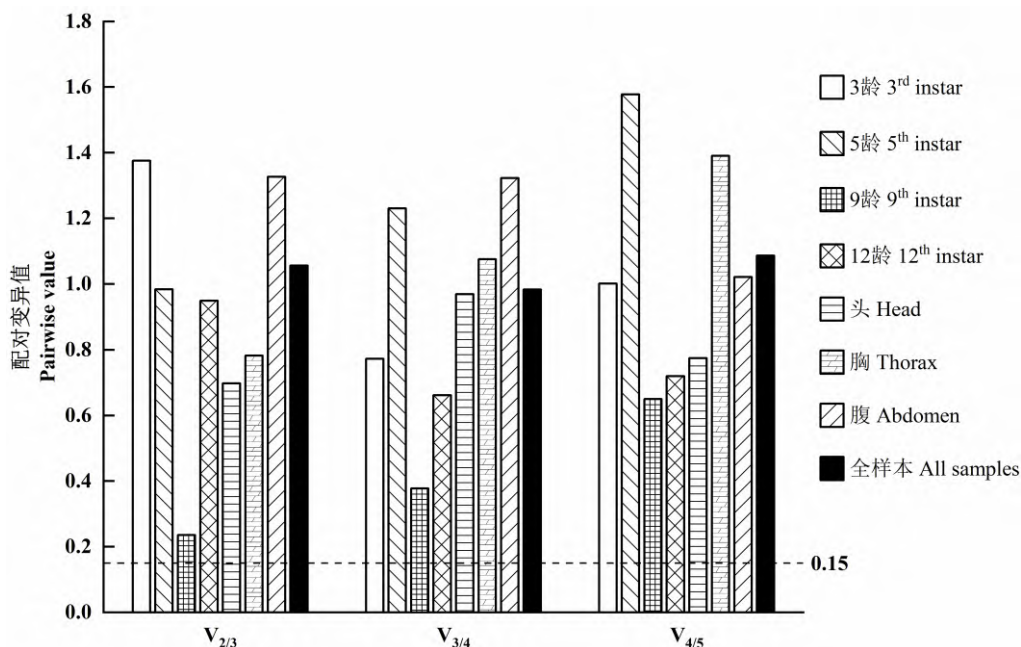


图 4 基于 GeNorm 软件分析不同处理下所需内参基因的最适数目

Fig. 4 Optimal number of reference genes under different conditions was analyzed based on GeNorm software

候选内参基因的稳定性评价常采用多个方法依据相关参数进行综合分析,并根据候选内参基因的稳定性高低进行排序。在单独采用 3 种方法进行排序的情况下,发现在桉蝙蛾幼虫不同龄期和不同体节中通过 3 种方法给出的最稳定内参基因及其排序并不完全一致。如在桉蝙蛾 12 龄幼虫的不同体节中, BestKeeper 认为 *ACTIN* 是最稳定的基因,其次为 *EF*、*RIB*, GeNorm 认为稳定性排序为 *RIB = GAPDH > ACTIN > EF > TUB*, 而

NormFinder 则认为 *ACTIN* 是最稳定的基因,其次为 *RIB*、*GAPDH* (表 2)。在其他昆虫的内参基因筛选中也存在类似情况 (陈立华等, 2014; Yang *et al.*, 2017), 这可能与 3 种方法的计算方法及评价指标不同有关。因此,最终使用 RefFinder 对各候选内参基因的稳定性进行综合排序,以减少各软件间的结果差异。

通常以 GeNorm 软件给出的基因配对变异值 $V_{n/(n+1)} < 0.15$ 为参考,来确定所需内参基因的数

目。但在椴蝙蛾幼虫不同龄期与不同体节中,各处理的所有配对变异值 $V_{n/(n+1)} > 0.15$ (图4)。这种情况在许多研究中也出现,如在二化螟 *Chilo suppressalis* 的不同龄期、不同组织和混合样品中 (Xu *et al.*, 2019), 在柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* 的不同虫体、成虫不同组织中 (王佳等, 2014), 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 Bt 毒素诱导处理中 (符伟等, 2012) 等。针对这种现象, GeNorm 使用说明中建议, 当配对变异值 $V_{n/(n+1)} > 0.15$ 时, 可根据配对变异值趋势变化, 选择 2~3 个最稳定的内参基因 (Vandesompele *et al.*, 2002); 同时, 过多地引入内参基因会导致更多的不稳定因素, 因此最适内参基因的数目不应超过 3 个 (Zhu *et al.*, 2014)。据此, 在椴蝙蛾 5 龄和 9 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的头部和胸部中不应引入第 3 个基因使得配对变异值 $V_{n/(n+1)}$ 增大, 故内参基因的最佳数目为 2; 而在 3 龄和 12 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的腹部及全样本中, 第 3 个内参基因的引入能使 $V_{n/(n+1)}$ 值减小, 故内参基因的最佳数目为 3 (图4)。

椴蝙蛾 3 龄、12 龄幼虫的不同体节及全样品处理中, *RIB* 显示出较好的稳定性 (表3)。*RIB* 是调控细胞核糖体的合成、参与细胞翻译过程的重要管家基因。与核糖体调控相关的基因在许多研究中被认为是最稳定的内参基因, 如桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 中, *RP49* 在不同发育时期和不同组织中最稳定 (杨苓等, 2017); 粘虫 *Mythimna separata* 幼虫不同组织中最稳定的基因为 *RPL12* (Li *et al.*, 2018); *RPS15* 和 *RPL13* 可作为棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫不同组织中的一组内参基因 (Zhang *et al.*, 2015)。在椴蝙蛾 5 龄幼虫不同体节和不同龄期幼虫的头部、腹部中, *EF* 有良好的表达稳定性 (表3)。*EF* 在虫草钩蝠蛾 *Thitarodes armoricanus* 幼虫 (Liu *et al.*, 2016) 和羽衣袖蝶 *Heliconius numata* 的不同组织与不同发育阶段中也均可作为最稳定的内参基因 (Pan *et al.*, 2015), 显示 *EF* 对这些昆虫发育阶段和组织的变化可能不敏感。在椴蝙蛾 9 龄幼虫的不同体节中, 最稳定的内参基因为 *GAPDH* (表3)。*GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 是调控糖酵解、糖异生等能量代谢过程中的一种关键酶。在大螟 *Sesamia inferens*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的不同发育阶段中 (Lu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014; Lu *et al.*,

2015), *GAPDH* 是最稳定的内参基因。同样地, *GAPDH* 在椴蝙蛾不同龄期幼虫的腹部中具有较高的稳定性, 表明同一基因在不同昆虫同一实验处理下的研究结果具有一定的参考价值。在椴蝙蛾 12 龄幼虫的不同体节中, 最佳的内参基因是 *ACTIN* (表3)。*ACTIN* (β -Actin) 参与细胞分裂、染色体运动、细胞器运动、胞质流动等几乎所有的真核细胞生理过程, 是常用的内参基因 (Chapman and Waldenstrom, 2015)。但是, *ACTIN* 在椴蝙蛾幼虫 3 龄和 9 龄的不同体节中呈现不稳定的基因表达, 这与草原毛虫属 *Gynaephora* 种群在不同海拔处理 (Zhang *et al.*, 2017)、美国白蛾 *Hyphantria cunea* 在不同温度处理 (陶蓉等, 2019) 下得出的结果一致, 说明内参基因的使用率与内参基因的稳定性之间没有绝对的因果关系, 突出针对特定昆虫与具体的实验处理进行内参基因筛选的必要性。

TUB (*Tubulin*) 编码的微管蛋白参与包括构建和维持细胞形态、胞内运输、染色体运动与细胞分裂等许多生理过程, 也常被认为是最稳定的内参基因之一。如在舞毒蛾 *Lymantria dispar* 的不同发育阶段 (Yin *et al.*, 2020)、二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫 (Xu *et al.*, 2019) 和朱红毛斑蛾 *Phauda flammans* (陈炼等, 2021) 的不同组织中, *TUB* 均是最稳定的内参基因。特别地, 在椴蝙蛾幼虫不同龄期和不同体节中, *TUB* 均被认为是不稳定的基因 (表3), 这支持在所有实验处理中任一内参基因均不能恒定表达的观点。

从椴蝙蛾幼虫不同龄期与不同体节中, 即使在同一昆虫个体内, 5 个基因的表达稳定性都随着虫龄和体节的变化而变化 (表2、图3), 并不存在绝对稳定表达的内参基因。全样品处理中的结果表明, 当综合考虑椴蝙蛾幼虫的龄期与取样部位 2 个因素的影响时, 可选择 *RIB* 和 *ACTIN* 作为内参基因。

在同一龄期不同体节中, *ACTIN* 在 12 龄幼虫的不同体节中表达最稳定, 但在 5 龄和 9 龄幼虫的不同体节中却不稳定; 同样地, *EF* 在不同龄期幼虫的腹部中表达不稳定, 但在不同龄期幼虫的头部和腹部中表达最稳定 (图3)。这表明幼虫虫龄与取样组织对内参基因筛选的结果具有较大影响, 须针对特定龄期和取样组织选择合适的内参基因。椴蝙蛾幼虫的龄级较多 (1~12 龄), 各龄期幼虫体型差异巨大, 且生活史复杂, 存在地栖 (1~

3 龄或 5 龄, 低龄幼虫) 与树栖 (5 ~ 12 龄, 中、老龄幼虫) 两个截然不同的生长发育阶段, 并以幼虫形态 (12 龄, 老熟幼虫) 越冬 (王缙健等, 2015), 推测桉蝙蛾不同龄期幼虫之间、不同幼虫体节之间的基因表达存在着较大差异, 需区分特定的幼虫龄期与体节进行研究, 而本研究的结果也证明了其必要性。

当然, 本研究推荐了在桉蝙蛾幼虫不同龄期 (3 龄、5 龄、9 龄、12 龄) 与不同体节 (头、胸、腹) 中适用的内参基因组合, 可为相似实验处理下桉蝙蛾幼虫基因表达的研究提供参考, 但更多不同的实验处理未必符合这些设定, 故仍需针对具体的实验处理进行最适内参基因的筛选; 同时, 虽然在本研究中针对多种处理而筛选出了多组内参基因, 但也局限了各内参基因的应用范围, 后续可进一步发掘在桉蝙蛾幼虫基因表达研究中更为广谱的内参基因。

本研究结果表明, 桉蝙蛾 5 龄和 9 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的头部和胸部中选择 2 个稳定表达的内参基因较为合适, 而 3 龄和 12 龄幼虫的不同体节、不同龄期幼虫的腹部及全样本中需选择 3 个稳定表达的基因作为内参。在 3 龄、5 龄、9 龄和 12 龄幼虫的不同体节中, 可选择 *ACTIN + RIB + GAPDH*、*EF + RIB*、*GAPDH + EF* 和 *ACTIN + RIB + GAPDH* 作为内参; 不同龄期幼虫头部、胸部和腹部推荐的内参基因组合分别为 *EF + RIB*、*RIB + GAPDH* 和 *EF + GAPDH + ACTIN*; 同时考虑桉蝙蛾幼虫不同龄期与不同体节的因素时, 推荐 *RIB*、*ACTIN* 和 *GAPDH* 作为内参基因。

参考文献 (References)

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft 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.
- Cao SG, Pang ZH, Yang XH, et al. Preliminary study on spatial distribution pattern of *Endoclyta signifer* Walker larva [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39 (19): 11492 - 11495. [曹书阁, 庞正羲, 杨秀好, 等. 桉蝙蛾幼虫空间分布型的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (19): 11492 - 11495]
- Chapman JR, Waldenstrom J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (11): e0141853.
- Chen L, Tian Z, Wang XY, et al. Screening of reference genes for quantitative real - time PCR in *Phaouda flammans* (Walker) (Lepidoptera: Phaudidae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 15 - 24. [陈炼, 田忠, 王小云, 等. 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]
- Chen LH, Zhang YH, He QL, et al. Selection of reference genes for transcription expression analysis in *Philosamia cynthia ricini* [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2014, 37 (6): 78 - 84. [陈立华, 张月华, 何庆玲, 等. 蓖麻蚕基因转录表达分析的内参基因筛选 [J]. 河北农业大学学报, 2014, 37 (6): 78 - 84]
- Dundas J, Ling M. Reference genes for measuring mRNA expression [J]. *Theory in Biosciences*, 2012, 131 (4): 215 - 223.
- 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. Bt 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]
- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, 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.
- Hu P, Yang XH, Yang ZD. Morphology and distribution of sensillum on antennal, thoracic and abdominal tegument of *Endoclyta signifer* larva [J]. *Beijing Forestry University*, 2021, 43 (9): 111 - 120. [胡平, 杨秀好, 杨振德. 桉蝙蛾幼虫触角及胸腹部体感器形态及分布特征 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43 (9): 111 - 120.]
- Lan X, Cai WJ, Wei JG, et al. Identification of entomopathogenic fungi from *Endoclyta signifer* in Guangxi [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45 (8): 1386 - 1392. [蓝霞, 蔡文娇, 韦继光, 等. 广西桉蝙蛾病原真菌的鉴定 [J]. 南方农业学报, 2014, 45 (8): 1386 - 1392]
- Li K, Xu N, Yang YJ, et al. Identification and validation of reference genes for RT-qPCR normalization in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018: 1828253.
- Liu GQ, Qiu XH, Cao L, et al. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR studies of physiological responses in the ghost moth, *Thitarodes armoricanus* (Lepidoptera, Hepialidae) [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (7): e159060.
- Lu 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.
- Lu Y, Zheng X, Liang Q, et al. Evaluation and validation of reference genes for SYBR Green qRT-PCR normalization in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2015, 18 (4): 669 - 675.
- Lu YH, Yuan M, Gao XW, 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.

- Pan HP, Yang XW, Bidne K, et al. Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* (L.), a migrating bio-indicator [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (6): e0129482.
- 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.
- Shakeel M, Rodriguez A, Bin TU, et al. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: An overview in insects [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40 (2): 227-236.
- Shi CH, Zhang YJ. Advances in reference gene for real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) of insects research [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2016, 53 (2): 237-246.
- 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]
- Vandesompele J, De Preter K, 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): 1-12.
- Wang J, Zhao J, Liu YH. Evaluation of endogenous reference genes in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2014, 57 (12): 1375-1380. [王佳, 赵静, 刘映红. 柑橘大实蝇内参基因的评估 [J]. 昆虫学报, 2014, 57 (12): 1375-1380]
- Wang JJ, Yang XH, Luo JT, et al. Bionomics of *Endoclyta signifier* [J]. *Forest Pest and Disease*, 2015, 34 (1): 9-13. [王缉健, 杨秀好, 罗基同, 等. 桉蝙蛾生物学研究 [J]. 中国森林病虫, 2015, 34 (1): 9-13]
- Xie F, Xiao P, Chen D, et al. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs [J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80 (1): 75-84.
- Xu HX, Wang GR, Lu YH, et al. Screening reference genes and evaluating of their expression stability for qRT-PCR normalization in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33 (1): 75-84.
- Yang L, Hu XJ, Xu Z, 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 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.
- Yang XH, Chen SW, Yu YH, et al. Damage occurred monitoring and risk analysis of *Endoclyta signifier* Walker in Guangxi [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2012, 18 (2): 84-86. [杨秀好, 陈尚文, 于永辉, 等. 桉蝙蛾在广西的发生危害监测与风险分析 [J]. 安徽农学通报, 2012, 18 (2): 84-86]
- Yang XH, Luo JT, Wu YJ, et al. Distribution and damage of major wood borer pest, *Endoclyta signifier* Walker [J]. *Forest Pest and Disease*, 2021, 40 (4): 34-40. [杨秀好, 罗基同, 吴耀军, 等. 林木重大钻蛀性害虫桉蝙蛾分布与危害 [J]. 中国森林病虫, 2021, 40 (4): 34-40]
- Yang XH, Yu YH, Wu YJ, et al. First report of *Endoclyta signifier* (Lepidoptera: Hepialidae) as a new pest on *Eucalyptus* [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2013, 106 (2): 866-873.
- Yang XH. Studies on the Bio-Ecological Characteristics of *Endoclyta signifier* Walker (Lepidoptera: Hepialidae) [D]. Beijing: Beijing Forestry University Doctoral Thesis, 2013. [杨秀好. 桉蝙蛾生物生态学特性的研究 [D]. 北京: 北京林业大学博士论文, 2013]
- Yang XS, Yang XH, Xue DY, et al. The complete mitochondrial genome of *Endoclyta signifier* (Lepidoptera, Hepialidae) [J]. *Mitochondrial Dna Part A*, 2016, 27 (6): 4620-4621.
- Yin JJ, Sun LL, Zhang QH, et al. Screening and evaluation of the stability of expression of reference genes in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebididae) using qRT-PCR [J]. *Gene*, 2020, 749: 144712.
- Yu YH. Bionomics and Ecological Characteristics of *Endoclyta signifier* Walker [D]. Nanning: Guangxi University Master Thesis, 2012. [于永辉. 桉蝙蛾生物生态学特性研究 [D]. 南宁: 广西大学硕士论文, 2012]
- 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: Erebididae: *Gynaephora*) along an altitude gradient [J]. *Ecology and Evolution*, 2017, 7 (21): 9054-9065.
- Zhang SD, An SH, Li Z, et al. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Gene*, 2015, 555 (2): 393-402.
- Zhang XY, Yang ZD, Yang XH, et al. Olfactory proteins and their expression profiles in the *Eucalyptus* pest *Endoclyta signifier* larvae [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 682537.
- Zhang YF, Zhao LJ, Zeng YL. Selection and application of reference genes for gene expression studies [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50 (8): 1119-1125.
- Zheng XL, Su J, He HX, et al. Incidences on *Eucalyptus* of two wood-boring insects, *Batocera horsfieldi* Hope, 1839 (Coleoptera: Cerambycidae) and *Endoclyta signifier* Waller, 1856 (Lepidoptera: Hepialidae) in China [J]. *Journal of the Entomological Research Society*, 2016, 18: 23-31.
- Zhu X, Yuan M, Shakeel M, et al. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (1): e84730.
- Zou DX, Shi GY, Liao WJ, et al. Selection and identification of a high virulent strain of *Beauveria bassiana* from *Endoclyta signifier* [J]. *Forest Pest and Disease*, 2016, 35 (5): 1-4. [邹东霞, 史国英, 廖旺蛟, 等. 桉蝙蛾高毒力白僵菌菌株筛选及鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2016, 35 (5): 1-4]