

王西,任博琪,张兴华,等.地红蜡实时荧光定量PCR内参基因筛选[J].山西农业科学,2026,54(1):204-212.

WANG X, REN B Q, ZHANG X H, et al. Screening of internal reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR of *Pyrrhocris tibialis* (Hemiptera:Pyrrhocridae)[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2026, 54(1):204-212.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2026.01.23

地红蜡实时荧光定量PCR内参基因筛选

王 西,任博琪,张兴华,翟舒新,沈芳宇,李 锐

(山西农业大学 植物保护学院,山西 晋中 030801)

摘 要:为了筛选出地红蜡在雌雄成虫不同组织、不同性别和不同龄期个体中稳定表达的内参基因,基于地红蜡转录组数据以及参考昆虫常用内参基因,筛选出 *Hsc70*、*AK*、*GAPDH*、 α -*Tub*、*EF1- α* 、*SDHA*、*RPL32*、 β -*Act* 等8个候选内参基因。采用荧光定量PCR(RT-qPCR)测定8个候选基因在地红蜡雌雄成虫的不同组织(包括头、胸、腹、足、翅、触角)、不同龄期(1~5龄和成虫)和不同性别个体中的表达量,并利用GeNorm、NormFinder、BestKeeper、RefFinder等软件对其表达稳定性进行分析。结果表明,在地红蜡不同样品中各候选内参基因表达量存在差异,在地红蜡不同龄期内参基因稳定性排前3位的依次是 *EF1- α* 、*SDHA*、*GAPDH* 基因,不同性别成虫中内参基因稳定性排前3位的依次是 *SDHA*、*RPL32*、*EF1- α* 基因,在雌成虫不同组织中内参基因稳定性排前3位的依次是 *EF1- α* 、 α -*Tub*、 β -*Act* 基因,在雄成虫不同组织中内参基因稳定性排前3位的依次是 *EF1- α* 、*GAPDH*、 β -*Act* 基因。结合不同算法综合比较,在地红蜡不同龄期中,建议以 *EF1- α* 和 *SDHA* 基因作为内参基因;在不同性别成虫中,建议以 *SDHA* 和 *RPL32* 基因作为内参基因;在雌性成虫不同组织中建议以 *EF1- α* 和 α -*Tub* 作为内参基因;在雄性成虫不同组织中建议以 *EF1- α* 和 *GAPDH* 作为内参基因。

关键词:地红蜡;组织;内参基因;RT-qPCR;表达稳定性

中图分类号:S433.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2481(2026)01-0204-09

Screening of Internal Reference Genes for Real-Time Fluorescence Quantitative PCR of *Pyrrhocris tibialis* (Hemiptera:Pyrrhocridae)

WANG Xi, REN Boqi, ZHANG Xinghua, ZHAI Shuxin, SHEN Fangyu, LI Rui

(College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Abstract: In order to screen out reference genes stably expressing in different tissues of male and female adults, different genders, and different instar individuals of *Pyrrhocris tibialis* Stål, in this study, eight candidate reference genes including *Hsc70*, *AK*, *GAPDH*, α -*Tub*, *EF1- α* , *SDHA*, *RPL32*, and β -*Act* were screened based on the transcriptome data of *P. tibialis* and the reference genes commonly used in insects. Real-time quantitative PCR(RT-qPCR) was used to determine the expression levels of 8 candidate genes in different tissues(including head, chest, abdomen, feet, wings, and antennae), different instars(1-5 instars and adults), and different genders of male and female adults of *P. tibialis*. The expression stability was analyzed by GeNorm, NormFinder, BestKeeper, RefFinder, and other software. The results showed that there were differences in the expression levels of candidate reference genes in different samples of *P. tibialis*. The top three reference genes for stability in different instars were *EF1- α* , *SDHA*, and *GAPDH* genes. The top three reference genes for stability in different adult genders were *SDHA*, *RPL32*, and *EF1- α* genes. The top three reference genes for stability in different tissues of female adults were *EF1- α* , α -*Tub*, and β -*Act* genes. The top three reference genes for stability in different tissues of male adults were *EF1- α* , *GAPDH*, and β -*Act* genes. Combined with the comprehensive comparison of different algorithms, it was recommended to use *EF1- α* and *SDHA* genes as the internal reference genes in different instars. In different adult genders, *SDHA* and *RPL32* genes were recommended as the internal reference genes. *EF1- α* and α -*Tub* were recommended as the internal reference genes in different tissues of female adults. *EF1- α* and *GAPDH* were recommended as the internal reference genes in

收稿日期:2025-03-19

基金项目:农业农村部农产品质量安全监管专项(15197063);山西省基础研究计划(自由探索类)(202103021224161)

作者简介:王 西,在读硕士,研究方向:昆虫生态与生理生化,E-mail:614253930@qq.com

通信作者:李 锐,教授,博士,主要从事昆虫生态学、生理学、生物化学和分子生物学研究,E-mail:sxaulr@126.com

different tissues of male adults.

Keywords: *Pyrrhocoris tibialis* Stål; tissues; reference gene; RT-qPCR; expression stability

地红蜡属于节肢动物门昆虫纲(Insecta)半翅目(Hemiptera)红蜡科(Pyrrhocoridae)红蜡属(*Pyrrhocoris*),具刺吸式口器,以植物种子和茎叶汁液为食。它是一种植食性害虫,能够危害谷子、糜子、玉米、绿豆、大豆等多种农作物^[1],对农业生产构成严重威胁。地红蜡通常栖息于植物的表面或在地面活动,其卵则多产于泥土中或腐烂的落叶层内,这种生存习性及多食性使得其在特定环境中更易于繁殖和扩散,可生存和繁衍在不同的农业生态系统中,这也增加了防控的难度。目前,国内外对地红蜡的研究主要集中在其生物学特性、防御机制、线粒体基因组、特殊取食行为、取食偏好性等方面。因此,对地红蜡生理行为和分子机制展开研究,有助于后续开发防控新技术。2013年,刘晨等^[2]研究了使用不同溶剂提取得到的牛心朴子粗提物对地红蜡的毒杀效果,结果发现,牛心朴子的3种粗提物对地红蜡均有较强的胃毒作用,其中,无水乙醇粗提物的毒杀效果最好。赵瑞等^[3-4]研究了地红蜡在取食行为上的特殊性以及寄主植物叶片的物理特征与营养成分对其选择偏好的影响,结果发现,地红蜡具有吸水—携带种子攀爬—取食的特殊取食行为,且地红蜡成虫取食选择与寄主植物叶片长宽比、背面绒毛密度、含水量以及可溶性糖、总蛋白质含量有关。此外,KRAJICEK等^[5]采用气相色谱与质谱对始红蜡、地红蜡和埃及斑红蜡雌雄成虫挥发性防御分泌物进行了分析,结果发现,这些昆虫的分泌物成分具有较高的相似性,进而推断这种相似性可能与它们的反捕食策略相关。ZHANG等^[6]测定了地红蜡的完整线粒体基因组,并通过系统进化分析确定了扁蜡总科+(蜡总科+(长蜡总科+(红蜡总科+缘蜡总科)))的系统进化关系。

实时荧光定量PCR技术具有较高的灵敏度和特异性,能够准确地测定目标基因的表达水平。此外,该技术还具备良好的重复性,确保了试验结果的可靠性,成为生物学基因表达分析中广泛应用的技术^[7-8]。RT-qPCR技术成功的关键在于内参基因的合理选择。理想的内参基因应具有稳定的表达水平,可用于对试验数据进行校正与标准化,从而减少样本间差异,提高结果的准确性^[9-11]。

越来越多的研究发现,昆虫的内参基因在不同处理条件下表达稳定性存在差异^[8]。MENG等^[12]对咖啡灭字虎天牛(*Xylotrechus quadripes*)RT-qPCR的内参基因进行了筛选,结果发现,*RPL10α*(*Ribosomal protein*)、*RPS27α*基因分别适合作为不同组织、不同发育阶段基因表达研究的内参基因;而在不同杀虫剂处理的基因表达研究中,适合选取*EF-1α*(*Translation elongation factor 1 alpha*)作为内参基因。还有研究发现,黏虫(*Mythimna separate*)成虫在不同光处理条件下可采用*AK*(*Adenosine kinase*)和*GAPDH*(*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)基因作为最佳内参基因^[13]。朱红毛斑蛾(*Phauda flammans*)成虫基因表达内参基因筛选结果表明,*TUB2*(*Tubulin*)和*GAPDH*、*TUB1*和*EF-1α*、*Actin3*和*TBP*(*TATA-box binding protein*)基因可分别作为不同组织、成虫不同性别以及不同发育阶段基因表达研究的内参基因^[11]。

此外,国内外众多学者对用于研究昆虫基因表达的内参基因进行了深入的研究,鳞翅目棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)^[14]、鞘翅目咖啡灭字虎天牛^[12]、半翅目牧草盲蜡(*Lygus pratensis*)^[15]、桃蚜(*Myzus persicae*)^[16]、俄罗斯麦蚜(*Diuraphis noxia*)^[17]、玉米飞虱(*Delphacodes kuscheli*)^[18]、大豆蚜(*Aphis glycines*)^[19]等物种已经筛选到了合适的用于基因表达研究的内参基因。

为筛选出地红蜡在雌雄成虫不同组织、不同性别和不同龄期个体中稳定表达的内参基因,本研究基于对已有的地红蜡转录组数据的分析,以及参考昆虫常用内参基因,筛选出*Hsc70*(*Heatshockprotein70*)、*AK*、*GAPDH*、*α-Tub*、*EF1-α*、*SDHA*(*Succinate dehydrogenase complex subunit A*)、*RPL32*、*β-Act*等8个基因作为候选内参基因。采用RT-qPCR技术并应用GeNorm、NormFinder、BestKeeper等软件,对地红蜡不同成虫部位、性别及不同发育阶段的候选内参基因表达水平进行分析,利用RefFinder在线网站(<http://blooge.cn/RefFinder/>)进行综合评估和统计分析,最终筛选出地红蜡在不同条件下进行基因表达研究的最佳内参基因,旨在为后续探索地红蜡基因表达分析

奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料与试剂

地红蜡采集自山西农业大学太谷校区试验田,并单头饲养在直径为 9 cm 的培养皿中,以苘麻种子为食物,培养皿边缘放置适当大小的湿润棉球以维持湿度。培养皿放置在温度为 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 60%~70%、光周期为 14 h(光照)/10 h(黑暗)的人工气候箱中。分别收集 3 日龄雌雄成虫的触角(30 头)、头(10 头)、胸(10 头)、腹(3 头)、足(10 头)和翅(10 头)等 6 个组织作为不同组织样品;随机抽取雌雄成虫各 1 头为不同性别成虫样品;收集一龄(30 头)、二龄(20 头)、三龄(5 头)、四龄(5 头)、五龄(1 头)和成虫(1 头)为不同龄期样品,3 次生物学重复。

UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司,HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒购自南京诺维赞生物科技股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 将样品使用液氮迅速冷冻并研磨成粉末状,按照 UNIQ-10 柱式总 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,并对提取的 RNA 进行浓度与纯度测定。按照 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)试剂盒说明书的方法,将总 RNA 反转录合成 cDNA,并置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 候选内参基因选择与引物设计 参考昆虫常用内参基因^[8,20],选取地红蜡转录组测序结果中热激同源蛋白 70 基因(*Hsc70*)、核糖体蛋白 L32 基因(*RPL32*)、精氨酸激酶基因(*AK*)、 β -肌动蛋白基因(β -*Act*)、 α -微管蛋白基因(α -*Tub*)、琥珀酸脱氢酶复合体 A 亚基基因(*SDHA*)、3-磷酸甘油醛

脱氢酶基因(*GAPDH*)和延长因子 1 基因(*EF1- α*)作为候选内参基因。利用 Primer 5.0 软件设计候选内参基因引物,扩增产物长度为 80~250 bp,由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.3 RT-qPCR 引物特异性和扩增效率检验 为确定引物的扩增效率,将试验所用样品的 cDNA 分别以 10、100、1 000、10 000 倍梯度稀释后,作为模板进行 RT-qPCR 反应,并计算引物扩增效率和决定系数(R^2)及绘制熔解曲线。RT-qPCR 扩增反应按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行^[21],每个样本设置 3 次生物学重复。反应体系 20 μL : 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL ; Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; Template cDNA 1 μL ; ddH₂O 8.2 μL 。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环; 熔解曲线反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.3 数据分析

采用 GeNorm^[22]、NormFinder^[23]、BestKeeper^[9]软件,以及在线网站 RefFinder 对 8 个候选内参基因进行综合分析 with 稳定性评估。根据 GeNorm 计算出表达稳定性(M 值)进行排序, M 值越小则基因越稳定,且得出各基因之间的配对变异值 $V_{n/n+1}$ (以 0.15 为阈值, 小于 0.15 则表示需要 n 个基因), 以确定最佳内参基因数目。采用 NormFinder 和 BestKeeper 软件分别计算出表达稳定值(SV), 以及标准差(SD)和变异系数(CV), 对稳定值进行排序, 其数值越小表示基因的稳定性越好。最后, 利用 RefFinder 在线网站对以上 3 种方法的稳定性进行评估, 得到综合排名。

2 结果与分析

2.1 引物扩增效率和特异性评价

引物信息如表 1 所示。

表 1 引物信息

Tab.1 Primer information

基因 Gene	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	产物长度/bp Product length	扩增效率/% Amplification efficiency	R^2
<i>Hsc70</i>	F:AGCTCCTCATTAAGGCATCG R:AACCGCCAGTGGAAGTCA	195	96.3	0.992
<i>AK</i>	F:CGACGAGTTGAAGGGAACG R:CCAGAATCGGCAAGCATTT	133	108.3	0.993
<i>GAPDH</i>	F:AAAGGCGAAGTCTCCAGTC R:AACAAACATCGGTGCGTCA	228	108.2	0.999

续表1 引物信息

Tab.1(Continued) Primer information

基因 Gene	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	产物长度/bp Product length	扩增效率/% Amplification efficiency	R^2
α -Tub	F:TTCCACGACCATATCCACC R:TTCCTGCTGAGATTGTCCC	210	107.1	0.999
EF1- α	F:AAACGACCTAATGGAGGGA R:AAGTCTGGAGATGCTGCTA	89	96.8	0.987
SDHA	F:GTAAGTGAAGCCAGCCCTAT R:TGCCCTGGACCTTCTAATG	203	109.0	1.000
RPL32	F:CCGCTCCTTGTGGTTAGAC R:AATACCCCTTCGGCTTCTC	215	111.8	0.992
β -Act	F:GTATCGTAACTAACTGGGATG R:GAGTACAGGGTGTTCTTCG	92	107.4	0.987

由表1可知,8个候选内参基因的RT-qPCR引物的扩增效率为96.3%~111.8%, R^2 为0.987~1.000,具有良好的线性关系,且各基因的熔解曲线均为单峰无非特异性扩增,表明引物设计合理,具有良好的扩增效率和特异性,可进行RT-qPCR定量试验。

2.2 候选内参基因的表达水平分析

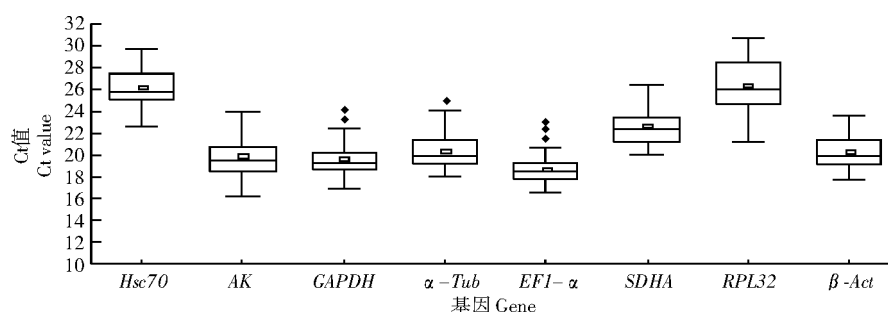
内参基因的表达水平是筛选内参基因的首要

条件,在地红蜡各组样品中8个候选内参基因的Ct平均值为17.95~27.56,具有较高的表达水平(表2)。如图1所示,基于各候选内参基因的Ct值可看出,EF1- α 基因的Ct值处于较低水平,表明其不同样品中的表达丰度最高,而Hsc70和RPL32表达丰度较低,且RPL32在不同样品间的表达差异最大,而EF1- α 在不同样品间的表达差异最小。

表2 地红蜡不同组织样品中候选内参基因的Ct值

Tab.2 The Ct values of each candidate internal reference gene in different tissue samples of *P. tibialis*

基因 Gene	龄期 Instar	性别 Gender	雌性组织 Female tissue	雄性组织 Male tissue
Hsc70	26.12±1.57	25.92±1.46	25.20±1.17	27.56±1.44
AK	18.42±1.13	20.26±0.99	19.46±1.53	20.88±1.82
GAPDH	19.47±0.94	19.45±1.45	18.82±1.14	20.48±1.37
α -Tub	20.79±2.11	20.87±1.67	19.32±0.72	21.18±0.95
EF1- α	17.95±1.00	19.00±1.04	18.24±0.75	19.77±1.12
SDHA	22.00±1.32	23.08±1.59	21.90±1.28	23.53±1.47
RPL32	25.18±0.87	23.08±1.59	27.32±2.08	27.32±2.08
β -Act	19.82±1.55	20.33±1.74	19.70±1.09	21.28±1.31



箱型上下线分别为上四分位数和下四分位数,中线为中位数,中垂线的上下限分别为最大值和最小值,图中黑点表示异常值

The upper and lower lines of the box were the upper quartile and the lower quartile, respectively, the midline was the median. The upper and lower limits of the vertical line were the maximum and minimum, respectively, the black dots in the figure represented the number of outliers

图1 候选内参基因在地红蜡不同样品中的Ct值分析

Fig.1 Ct value analysis of candidate reference genes in different samples of *P. tibialis*

2.3 应用 GeNorm 软件分析候选内参基因稳定性

由图 2 可知,根据 M 值的大小进行排序后发现,在不同龄期样品组中,内参基因的稳定性由高到低依次为 β -Act= $Hsc70$ (0.427) > $SDHA$ (0.475) > $EF1-\alpha$ (0.537) > $GAPDH$ (0.632) > AK (0.749) > $RPL32$ (0.810) > α -Tub (1.072), β -Act 和 $Hsc70$ 为稳定性最高的内参基因, α -Tub 为最不稳定的内参基因。在不同性别成虫样品组中,内参基因的稳定性由高到低依次为 $SDHA$ = $RPL32$ (0) > β -Act (0.269) > $Hsc70$ (0.382) > $EF1-\alpha$ (0.520) > AK (0.574) > $GAPDH$ (0.643) > α -Tub (0.959), $SDHA$ 和 $RPL32$ 为稳定性最高的内参基因, α -Tub 为最不稳定的内参基因。在雌性成虫不

同组织样品组中,内参基因的稳定性由高到低依次为 α -Tub = $EF1-\alpha$ (0.462) > β -Act (0.550) > $Hsc70$ (0.584) > $GAPDH$ (0.610) > $SDHA$ (0.762) > AK (0.939) > $RPL32$ (1.249), α -Tub 和 $EF1-\alpha$ 为稳定性最高的内参基因, $RPL32$ 为最不稳定的内参基因。在雄性成虫不同组织样品组中,内参基因的稳定性由高到低依次为 $GAPDH$ = $EF1-\alpha$ (0.473) > β -Act (0.548) > $Hsc70$ (0.609) > α -Tub (0.708) > $SDHA$ (0.830) > $RPL32$ (0.971) > AK (1.108), $GAPDH$ 和 $EF1-\alpha$ 为稳定性最高的内参基因,而 AK 基因为最不稳定的内参基因。结合 GeNorm 软件计算出 $V_{n/(n+1)}$ 值,如图 3 所示,结果表明最佳内参基因组合数为 2 个。

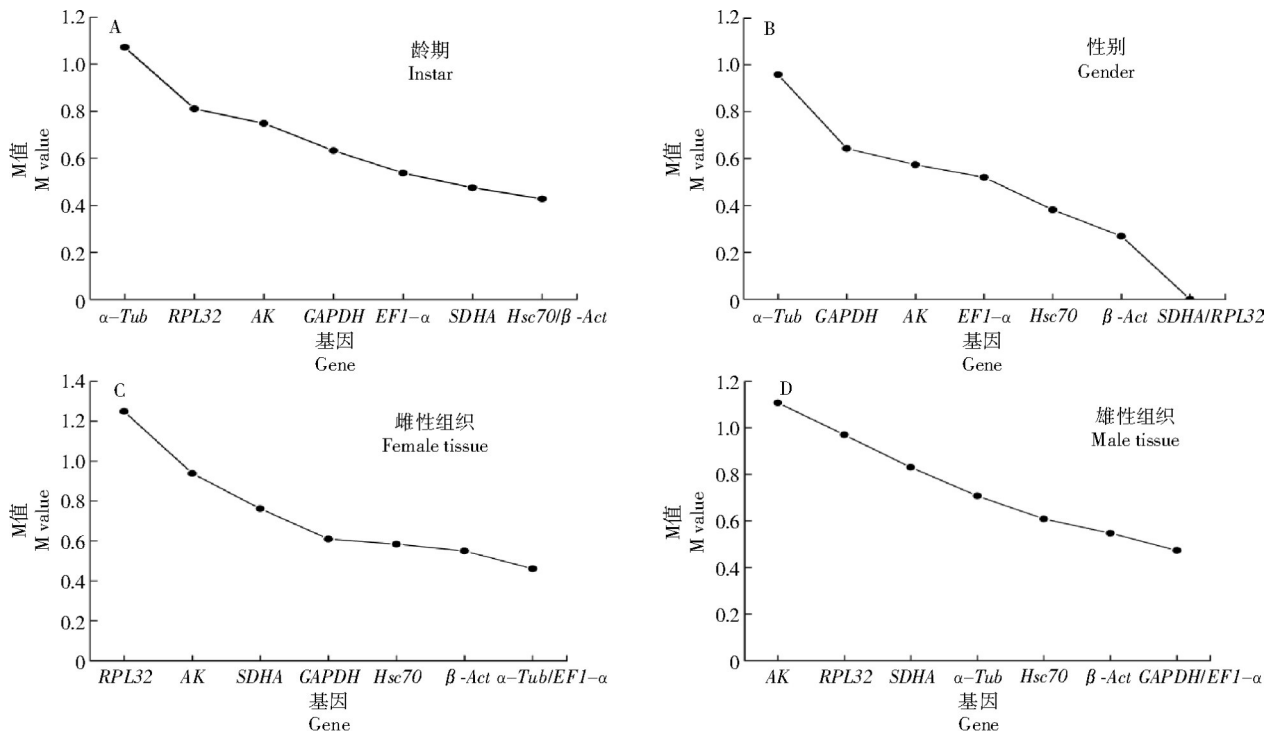


图 2 GeNorm 软件分析候选内参基因的表达稳定值 (M)

Fig.2 Expression stability value M of the candidate reference genes calculated by GeNorm

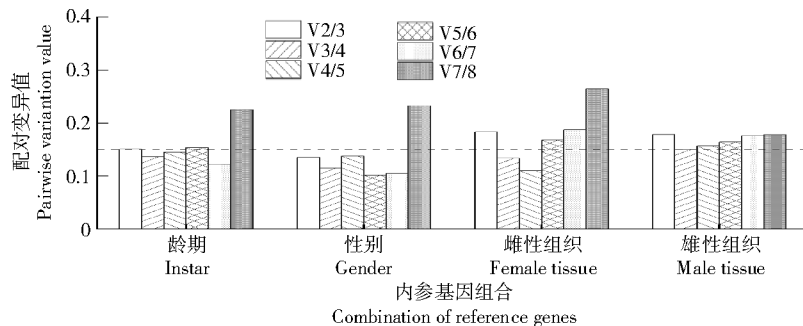


图 3 GeNorm 软件分析地红蜡最优内参基因组合

Fig.3 The optimal combination of reference genes in *P. tibialis* calculated by GeNorm

2.4 应用 NormFinder 软件分析候选内参基因稳定性

使用 NormFinder 软件计算稳定值(SV),SV 越小,表示基因表达越稳定。对候选内参基因进行SV分析,结果如表3所示,在不同龄期中,表达稳定性排名前3的内参基因是 *SDHA* (0.16)、*EF1- α* (0.23)、*Hsc70* (0.48),最不稳定内参基因为 *α -Tub* (1.79);在不同性别成虫中,表达稳定性排名前3的内参基因是 *EF1- α* (0.19)、*SDHA*

(0.37)、*RPL32* (0.37),最不稳定的内参基因为 *α -Tub* (1.85);在雌性成虫不同组织中,表达稳定性排名前3的内参基因是 *EF1- α* (0.14)、 *α -Tub* (0.38)、 *β -Act* (0.39),最不稳定的内参基因为 *RPL32* (2.10);在雄性成虫不同组织中,排名前3表达较稳定的内参基因是 *EF1- α* (0.12)、*GAPDH* (0.34)、 *β -Act* (0.44),最不稳定的内参基因为 *AK* (1.40)。

表3 基于 NormFinder 分析地红蜡内参基因稳定性

Tab.3 Stability of internal reference genes of *P. tibialis* based on NormFinder analysis

基因 Gene	龄期 Instar		性别 Gender		雌性组织 Female tissue		雄性组织 Male tissue	
	稳定值 Stability value	排序 Ranking	稳定值 Stability value	排序 Ranking	稳定值 Stability value	排序 Ranking	稳定值 Stability value	排序 Ranking
<i>Hsc70</i>	0.48	3	0.62	5	0.39	4	0.49	4
<i>AK</i>	0.96	7	0.39	4	1.4	7	1.4	8
<i>GAPDH</i>	0.5	4	0.65	7	0.42	5	0.34	2
<i>α-Tub</i>	1.79	8	1.85	8	0.38	2	0.83	5
<i>EF1-α</i>	0.23	2	0.19	1	0.14	1	0.12	1
<i>SDHA</i>	0.16	1	0.37	2	0.98	6	0.85	6
<i>RPL32</i>	0.95	6	0.37	3	2.1	8	1.31	7
<i>β-Act</i>	0.54	5	0.62	6	0.39	3	0.44	3

2.5 利用 BestKeeper 软件分析候选内参基因稳定性

通过 BestKeeper 软件计算出SD和CV,分析内参基因的稳定性,SD和CV越小,表明基因表达越稳定。当SD<1时,则可作为内参基因^[24]。表4结果显示,不同龄期中表达稳定性前3的基因依次为 *GAPDH* (SD=0.68, CV=3.52)、*RPL32* (SD=0.71, CV=2.81)、*EF1- α* (SD=0.80, CV=4.44);

在不同性别成虫中表达最稳定的是 *AK* (SD=0.87, CV=4.27) 基因,其次是 *EF1- α* (SD=0.93, CV=4.91) 基因;在雌性成虫不同组织中,表达稳定性前3的依次为 *α -Tub* (SD=0.58, CV=3.03)、*EF1- α* (SD=0.59, CV=3.26) 和 *β -Act* (SD=0.82, CV=4.14) 基因;在雄性不同组织中,表达最稳定的是 *α -Tub* (SD=0.83, CV=3.91),其次是 *EF1- α* (SD=0.90, CV=4.53) 基因。

表4 基于 Bestkeeper 分析地红蜡内参基因稳定性

Tab.4 Stability of internal reference genes of *P. tibialis* based on Bestkeeper analysis

基因 Gene	龄期 Instar			性别 Gender			雌性组织 Female tissue			雄性组织 Male tissue		
	SD	CV/%	排序 Ranking	SD	CV/%	排序 Ranking	SD	CV/%	排序 Ranking	SD	CV/%	排序 Ranking
<i>Hsc70</i>	1.31	5.03	7	1.23	4.75	3	0.87	3.45	4	1.19	4.30	5
<i>AK</i>	0.87	4.74	4	0.87	4.27	1	1.20	6.15	7	1.64	7.86	7
<i>GAPDH</i>	0.68	3.52	1	1.24	6.37	4	0.87	4.63	5	1.16	5.66	4
<i>α-Tub</i>	1.88	9.04	8	1.38	6.62	5	0.58	3.03	1	0.83	3.91	1
<i>EF1-α</i>	0.80	4.44	3	0.93	4.91	2	0.59	3.26	2	0.90	4.53	2
<i>SDHA</i>	1.10	5.03	5	1.45	6.30	6	1.03	4.69	6	1.29	5.48	6
<i>RPL32</i>	0.71	2.81	2	1.45	6.30	6	1.82	6.65	8	1.82	6.65	8
<i>β-Act</i>	1.29	6.49	6	1.54	7.56	8	0.82	4.14	3	1.14	5.35	3

2.6 运用 RefFinder 软件进行综合分析

由于各软件的分析方法存在一定的差异,利用在线网站 RefFinder 进行综合分析,得到稳定性指数然后排序,值越低则基因的表达越稳定。结果如图 4 所示,在不同龄期中,内参基因表达的稳定性从高到低依次为 $EF1-\alpha > SDHA > GAPDH > Hsc70 > \beta-Act > RPL32 > AK > \alpha-Tub$;不同性别成虫中,内参基因表达稳定性从高到低

依次为 $SDHA > RPL32 > EF1-\alpha > AK > Hsc70 > \beta-Act > GAPDH > \alpha-Tub$;在雌性成虫不同组织中,基因表达稳定性从高到低依次为 $EF1-\alpha > \alpha-Tub > \beta-Act > Hsc70 > GAPDH > SDHA > AK > PL32$;在雄性成虫不同组织中,基因表达稳定性从高到低依次为 $EF1-\alpha > GAPDH > \beta-Act > \alpha-Tub > Hsc70 > SDHA > RPL32 > AK$ 。

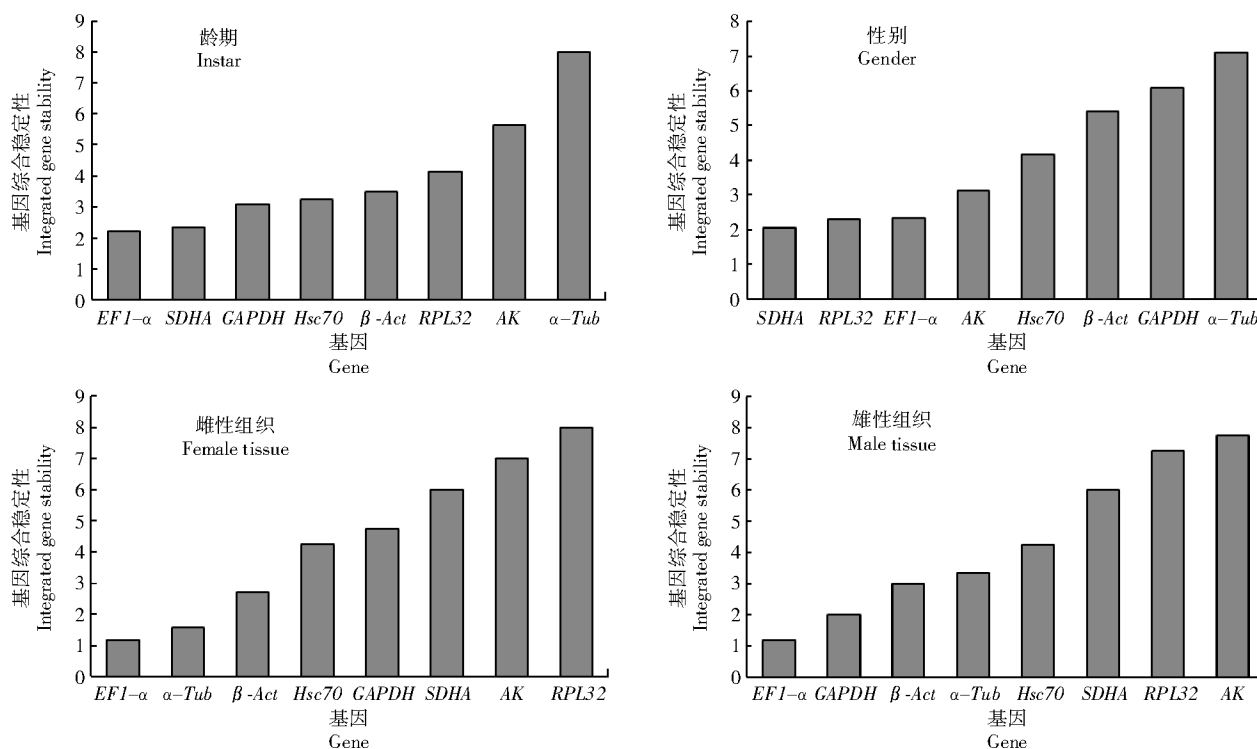


图 4 RefFinder 分析候选内参基因的表达稳定性

Fig.4 Expression stability of candidate internal reference genes analyzed by RefFinder

3 结论与讨论

本研究基于地红蜡转录组测序结果,利用 4 种不同的计算方法对地红蜡不同组织中候选内参基因的表达稳定性进行评价和综合分析,筛选最适内参基因组合,结果显示, $EF1-\alpha$ 、 $SDHA$ 、 $RPL32$ 、 $\alpha-Tub$ 、 $GAPDH$ 等基因具有稳定的表达。

在真核生物的蛋白质合成过程中,延伸因子 1- α ($EF1-\alpha$) 主要作为 mRNA 翻译时促进多肽链延伸的蛋白质因子,鉴于其表达的稳定性, $EF1-\alpha$ 被普遍作为生物学研究中的内参基因^[25-27]。在桃蚜^[16]、大豆蚜^[19]、小菜蛾 (*Plutella xylostella*)^[28] 和印度谷螟 (*Plodia interpunctella*)^[29] 中的内参基因筛选也表明 $EF1-\alpha$ 基因最稳定。本研究发现, $EF1-\alpha$

基因在地红蜡不同发育阶段和雌雄成虫不同组织中具有较高的表达稳定性,表明 $EF1-\alpha$ 基因也适宜作为地红蜡的内参基因。本研究还发现, $\alpha-Tub$ 和 $GAPDH$ 基因分别在雌雄成虫不同组织中可作为内参基因,这与沙葱萤叶甲 (*Galeruca daurica*)^[30] 和松墨天牛 (*Monochamus alternatus*)^[31] 等鞘翅目昆虫中, $\alpha-Tub$ 基因和 $GAPDH$ 基因被评估为分析不同组织中基因表达的最佳内参基因之一的结果一致。其次,在黄翅绢野螟 (*Diaphania caesalis*)^[32] 基因表达定量研究中发现,适用不同成虫性别最佳内参基因组合为 *Actin* 和 $EF1-\alpha$,这与本研究在地红蜡成虫不同性别中,筛选出 $SDHA$ 和 $RPL32$ 为最佳内参基因结果不同,可能与物种生物学特性以及试验条件存在差异等有关。 $RPL32$

作为核糖体蛋白编码基因之一,已有研究表明,*RPL32*在柑橘大实蝇(*Bactrocera minax*)^[33]和绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)^[34]不同发育时期表达稳定,且在不同抗性牧草盲蝽以及不同组织中均有较高的表达稳定性^[15]。

深入分析地红蜡候选内参基因的稳定性之后,结合GeNorm软件的计算结果,可推算出在地红蜡定量研究中,使用2个内参基因为最佳组合数。因此,在地红蜡不同龄期中,建议以*EF1-α*和*SDHA*作为内参基因;在不同成虫性别中,建议以*SDHA*和*RPL32*作为内参基因;*EF1-α*和*α-Tub*适合作为雌性成虫不同组织的内参基因;*EF1-α*和*GAPDH*适合作为雄性成虫不同组织的内参基因。

参考文献:

- [1] 章士美. 中国经济昆虫志-第三十一册, (一)-半翅目[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 161-162.
ZHANG S M. Economic insect fauna of China[M]. Beijing: Science Press, 1985: 161-162.
- [2] 刘晨, 黄攀攀, 李敏, 等. 牛心朴子提取物对地红蜡毒杀活性的研究[J]. 天津师范大学学报(自然科学版), 2013, 33(4): 56-59.
LIU C, HUANG P P, LI M, et al. Poison effect of *Cynanchum komarovii* extracts on *Pyrrhocoris tibialis*[J]. Journal of Tianjin Normal University (Natural Science Edition), 2013, 33(4): 56-59.
- [3] 赵瑞, 王雅丽, 王美, 等. 地红蜡特殊取食行为及其偏好性[J]. 植物保护学报, 2022, 49(2): 654-661.
ZHAO R, WANG Y L, WANG M, et al. Special feeding behavior and feeding preference of red bug *Pyrrhocoris tibialis* Stal[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(2): 654-661.
- [4] 赵瑞, 牛越, 王雅丽, 等. 寄主植物物理性状及营养物质对地红蜡寄主选择性的影响[J]. 昆虫学报, 2022, 65(6): 737-748.
ZHAO R, NIU Y, WANG Y L, et al. Effects of physical characteristics and nutrients of host plants on the host selectivity of *Pyrrhocoris tibialis* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2022, 65(6): 737-748.
- [5] KRAJICEK J, HAVLIKOVA M, BURSOVA M, et al. Comparative analysis of volatile defensive secretions of three species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometric method[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168827.
- [6] ZHANG Q L, FENG R Q, LI M, et al. The complete mitogenome of *Pyrrhocoris tibialis* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) and phylogenetic implications[J]. Genes, 2019, 10(10): 820.
- [7] 裴徐梨, 冯鹏宇, 唐征, 等. 青花菜花蕾发育LncRNAs内参基因筛选[J]. 河南农业科学, 2023, 52(1): 125-133.
PEI X L, FENG P Y, TANG Z, et al. Selection of LncRNAs reference genes in development of flower bud in broccoli[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2023, 52(1): 125-133.
- [8] 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.
SHI C H, HU J R, LI C R, et al. Research progress of internal reference gene in insect qRT-PCR[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(7): 1-7.
- [9] PFAFFL M W, 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.
- [10] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1119-1125.
ZHANG Y F, ZHAO L J, ZENG Y L. Selection and application of reference genes for gene expression studies[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(8): 1119-1125.
- [11] 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 L, TIAN Z, WANG X Y, et al. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Phauda fammers* (Walker) (Lepidoptera: Phaudidae) [J]. Journal of Environmental Entomology, 2021, 43(1): 15-24.
- [12] MENG Q Q, SHU B S, SUN S W, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in the coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2022, 112(2): 151-161.
- [13] 段云, 巩中军, 吴仁海, 等. 光处理下粘虫头部组织定量PCR分析中内参基因的筛选[J]. 应用昆虫学报, 2021, 58(2): 318-325.
DUAN Y, GONG Z J, WU R H, et al. Identification of reference genes in the heads of *Mythimna separata* with real-time quantitative PCR under different light sources[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2021, 58(2): 318-325.
- [14] ZHANG S D, AN S H, 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.
- [15] 贾冰, 马亿, 庞保平, 等. 牧草盲蝽实时定量PCR内参基因的筛选[J]. 昆虫学报, 2019, 62(12): 1379-1391.
JIA B, MA Y, PANG B P, et al. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2019, 62(12): 1379-1391.
- [16] KANG Z W, LIU F H, TIAN H G, et al. Evaluation of the reference genes for expression analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction in the green peach aphid, *Myzus persicae* [J]. Insect Science, 2017, 24(2): 222-234.
- [17] SINHA D K, SMITH C M. Selection of reference genes for expression analysis in *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae) fed on resistant and susceptible wheat plants[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 5059.
- [18] MARONICHE G A, SAGADÍN M, MONGELLI V C, et al. Reference gene selection for gene expression studies using RT-qPCR in virus-infected planthoppers[J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 308.

- [19] BANSAL R, MAMIDALA P, MIAN R A M, et al. Validation of reference genes for gene expression studies in *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2012, 105(4): 1432-1438.
- [20] 张敏, 李子鹏, 赵欣然, 等. 绿豆象实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 环境昆虫学报, 2024, 46(1): 174-183.
- ZHANG M, LI Z P, ZHAO X R, et al. Selection and validation of candidate reference genes for gene expression analysis in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) by qRT-PCR[J]. Journal of Environmental Entomology, 2024, 46(1): 174-183.
- [21] 焦丽亚琳, 赵萌萌, 王美, 等. 星豹蛛两个 GST 基因克隆、鉴定及其对溴氰菊酯胁迫的响应表达[J]. 昆虫学报, 2023, 66(9): 1161-1170.
- JIAO L Y L, ZHAO M M, WANG M, et al. Cloning and identification of two GST genes in *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) and their expression in response to deltamethrin stress[J]. Acta Entomologica Sinica, 2023, 66(9): 1161-1170.
- [22] 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): RESEARCH0034.1.
- [23] LINDBJERG C A, LEDET J J, FALCK T Ø. 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.
- [24] 李晓, 李建文, 成波, 等. 大灰象甲实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 昆虫学报, 2018, 61(11): 1284-1294.
- LI X, LI J W, CHENG B, et al. Screening of reference genes for quantitative real-time PCR in *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 2018, 61(11): 1284-1294.
- [25] HORŇÁKOVÁ D, MATOUŠKOVÁ P, KINDL J, et al. Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 397(1): 118-120.
- [26] CHAPUIS M P, TOHIDI-ESFAHANI D, DODGSON T, et al. Assessment and validation of a suite of reverse transcription-quantitative PCR reference genes for analyses of density-dependent behavioural plasticity in the Australian plague locust[J]. BMC Molecular Biology, 2011, 12: 7.
- [27] PONTON F, CHAPUIS M P, PERNICE M, et al. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(6): 840-850.
- [28] 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.
- [29] 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: 生命科学, 2016, 46(10): 1201-1209.
- TANG P A, ZHANG Q L, XUE H, et al. Selection of reference genes in quantitative real-time PCR of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Scientia Sinica (Vita), 2016, 46(10): 1201-1209.
- [30] TAN Y, ZHOU X R, PANG B P. Reference gene selection and evaluation for expression analysis using qRT-PCR in *Galleruca daurica* (Joannis) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2017, 107(3): 359-368.
- [31] 冯波, 郭前爽, 毛必鹏, 等. 松墨天牛化学感受组织荧光定量 PCR 内参基因的鉴定与筛选[J]. 昆虫学报, 2016, 59(4): 427-437.
- FENG B, GUO Q S, MAO B P, et al. Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-qPCR[J]. Acta Entomologica Sinica, 2016, 59(4): 427-437.
- [32] WANG Z, MENG Q Q, 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) open access[J]. Journal of Insect Science, 2020, 20(1): 6.
- [33] LÜ Z C, WANG L H, DAI R L, et al. Evaluation of endogenous reference genes of *Bactrocera (tetracus) minax* by gene expression profiling under various experimental conditions[J]. Florida Entomologist, 2014, 97(2): 597-604.
- [34] LUO J, WANG A L, CHENG Y X, et al. Selection and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) purchased[J]. Journal of Economic Entomology, 2020, 113(1): 451-460.