

竹林金针虫实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与应用

叶碧欢¹, 陈友吾¹, 舒金平², 张 威², 张亚波², 李海波¹, 宋其岩¹

(1. 浙江省林业科学研究院, 浙江 杭州 310023; 2. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 杭州 311400)

摘要: 【目的】筛选平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense* 侵染条件下筛胸梳爪叩甲 *Melanotus cribricollis* 幼虫稳定表达的内参基因, 为该竹林金针虫相关基因的表达研究奠定基础。【方法】基于筛胸梳爪叩甲幼虫的转录组数据, 利用实时荧光定量 PCR 扩增特异性引物, 分析相关性和扩增效率; 利用 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件评估筛选出 6 个候选内参基因 (β -actin、GAPDH、 α -tubulin、RPL13 α 、RPS3、RPS27a), 并验证其表达稳定性。【结果】GeNorm 分析结果显示: PRS27a 和 RPS3 的表达最稳定, 随后依次是 α -tubulin、RPL13 α 、 β -actin 和 GAPDH; 最适合的内参基因数目为 2。NormFinder 分析结果显示: RPL13 α 的表达最稳定, 随后依次是 α -tubulin、RPS3、RPS27a、 β -actin 和 GAPDH。BestKeeper 分析结果显示: β -actin 和 GAPDH 的 $P > 0.5$, 不适合作为本试验条件下的内参基因。不同软件分析得出的候选内参排序存在一定差异。综合分析和表达稳定性验证表明 PRS27a 或 RPS3 是最佳内参基因, 6 个目的基因的表达水平变化趋势均基本一致。【结论】PRS27a 和 RPS3 是研究平沙绿僵菌侵染的竹林金针虫相关基因表达的最佳内参基因。图 3 表 3 参 27

关键词: 森林保护学; 竹林金针虫; 平沙绿僵菌; 内参基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S763.38 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2021)03-0644-08

Screening and application of reference genes for qRT-PCR in bamboo wireworm

YE Bihuan¹, CHEN Youwu¹, SHU Jinping², ZHANG Wei², ZHANG Yabo², LI Haibo¹, SONG Qian¹

(1. Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study was to screen the stable expression of internal reference genes of *Melanotus cribricollis* larvae infected by *Metarhizium pingshaense*, so as to lay a foundation for the research on related gene expression in this bamboo wireworm. [Method] Based on the transcriptome data of *M. cribricollis* larvae, the correlation (R^2) and amplification efficiency were analyzed by qRT-PCR with specific primers. The 6 candidate reference genes including β -actin, GAPDH, α -tubulin, RPL13 α , RPS3 and RPS27a were evaluated by GeNorm, NormFinder and BestKeeper softwares. The stabilities of selected candidate reference genes including PRS27a and RPS3 were further validated by analyzing the expression of 6 target genes. [Result] GeNorm analysis showed that the expression of PRS27a and RPS3 were the most stable, followed by α -tubulin, RPL13 α , β -actin and GAPDH. The most suitable number of internal reference genes was 2. NormFinder analysis showed that the expression of RPL13 α was the most stable, followed by α -tubulin, RPS3, RPS27a, β -actin, and GAPDH. BestKeeper analysis showed that the P values of β -actin and GAPDH

收稿日期: 2020-07-28; 修回日期: 2020-11-26

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ19C160006); 浙江省省属科研院所资助项目 (2019F1068-1)

作者简介: 叶碧欢 (ORCID: 0000-0003-4700-9611), 博士, 从事森林保护研究。E-mail: 393938188@qq.com。通信

作者: 宋其岩 (ORCID: 0000-0002-9895-4464), 助理研究员, 从事森林培育研究。E-mail: zjlktg@163.com

were > 0.5 , which were not suitable for reference genes under the condition of this experiment. There were some differences in the ranking of candidate internal parameters obtained by different software analysis. Comprehensive analysis and expression stability verification showed that *PRS27a* or *RPS3* were the best internal reference genes, and the expression levels of 6 target genes were basically the same. [Conclusion] *PRS27a* and *RPS3* were the most appropriate reference genes for qRT-PCR analysis in bamboo wireworm infected by *M. pingshaense*. [Ch, 3 fig. 3 tab. 27 ref.]

Key words: forest protection; bamboo wireworm; *Metarhizium pingshaense*; reference gene; quantitative real-time PCR(qRT-PCR)

竹林金针虫是取食竹笋的叩甲幼虫的总称, 虫害发生时竹笋产量显著减少, 严重时竹种无法成竹, 制约了竹林的自然更新^[1-2]。筛胸梳爪叩甲 *Melanotus cribricollis* 隶属于鞘翅目 Coleoptera 叩甲科 Elateridae 梳爪叩甲属 *Melanotus*, 其幼虫为中国南方早园竹 *Phyllostachys propinqua* 竹林的优势种。化学药剂防治竹林金针虫易造成环境污染、抗药性和食品安全等问题, 阻碍以“生态、健康、有机”为标签的林产品产业发展, 因此近年来逐渐采用生物技术防治该虫害。绿僵菌 *Metarhizium* sp. 是常见的昆虫致病真菌^[3-4], 对鞘翅目和鳞翅目 Lepidoptera 等害虫均有一定防效^[5-6]。研究竹林金针虫抗绿僵菌相关基因的表达有利于深入了解害虫免疫抗性机制和虫菌互作机制, 也有利于生防菌菌株改造等研究, 提高其对农林害虫防治的效果。实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 是研究基因表达分析的关键技术, 省时、高效、应用广泛; 为保证目的基因定量表达结果的准确性, 需引入表达稳定的内参基因作为参照^[7]。内参基因又称看家基因, 理想的内参基因其表达水平应在各条件下保持稳定, 而实际上不同条件下许多内参基因的表达并不稳定^[8-9]。因此, 即使是同一物种, 不同试验条件下的内参基因也不能一概而用, qRT-PCR 试验之前应对所选内参基因的表达稳定性进行评估。常用的 qRT-PCR 内参基因包括 *ACT* (肌动蛋白)、*TUB* (微管蛋白)、*GAPDH* (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、*UBC* (泛素结合酶)、18S rRNA (核糖体蛋白 S18)、28S rRNA (核糖体蛋白 S28)、*EF1* (延伸因子 1)、*SYN1* (突触融合蛋白 1)、*SYN6* (突触融合蛋白 6)、*RPS3* (核糖体蛋白 S3)、*PRS20* (泛素-核糖体蛋白 S20)、*PRS27a* (泛素-核糖体蛋白 S27a)、*RPL10* (核糖体蛋白 L10)、*RPL13α* (核糖体蛋白 S13α)、*AK* (精氨酸激酶) 和 *V-ATPase* (液泡型 ATP 合酶) 等。符伟等^[10] 分析了小菜蛾 *Plutella xylostella* 候选内参基因在 Bt 毒素诱导时的表达稳定性, 最终筛选出由 *PRS13*、*RPL32* 和 *EF1α* 组成的最佳内参基因组合。冯波等^[11] 筛选出最适合校正松墨天牛 *Monochamus alternatus* 化学感受组织基因表达的 *GAPDH* 和 *TUB* 内参基因组合。刘金泊^[12] 评价了赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的候选内参基因在磷化氢诱导条件下的表达稳定性, 筛选出 *RPS18* 和 *RPL13α* 最佳内参基因组合。杨苓等^[13] 筛选出了适合桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 不同发育时期和不同组织的基因表达研究的 2 组最佳内参组合 (*RP49* 和 *GAPDH*, *RPL13* 和 *RP49*)。陶蓉等^[14] 则分别筛选出了美国白蛾 *Hyphantria cunea* 不同发育阶段、不同温度和不同组织的 3 组最佳内参基因 (*RPL12* 和 *EF1β*, *EF1α* 和 *GAPDH*, *ACT* 和 *RPS16*)。目前, 关于筛胸梳爪叩甲幼虫内参基因的筛选评估尚未见报道。本研究对平沙绿僵菌 *Metarhizium pingshaense* 侵染不同时期的筛胸梳爪叩甲幼虫 qRT-PCR 内参基因进行了筛选和评估, 以期选出最佳的内参基因, 为今后开展竹林金针虫等昆虫的基因表达研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源、真菌和土壤

供试筛胸梳爪叩甲幼虫于 2020 年 3 月下旬至 4 月中旬采自浙江省湖州市德清县的早园竹林地, 带回室内置于塑料养虫箱中, 箱内装满约 3/4 的土壤 (湿度为 $10\% \pm 1\%$), 定期喂以鲜笋。供试平沙绿僵菌 WP08 菌株由中国林业科学研究院亚热带林业研究所森林保护团队提供, 该菌株最初从僵死的筛胸梳爪叩甲幼虫虫体上分离获得^[15]。WP08 菌株接种于 PDA 培养基, 产孢 3 周左右收集分生孢子。供试土壤采自德清早园竹园区, 40 目的网筛过筛, 高温灭菌 ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 h), 烘干备用。

1.2 样品处理

取一定量的平沙绿僵菌 WP08 分生孢子与供试土壤, 混匀后调节土壤水分为 $(10 \pm 1)\%$, 土壤孢子密

度为 1.1×10^7 个 $\cdot g^{-1}$ 。挑选活力强且个体大小一致的幼虫置于处理样品中, 培养至 7、12 和 17 d 时取样, 以未经绿僵菌侵染处理的幼虫作为对照组 (0 d), 随机取样 5 头 $\cdot$ 份⁻¹。试验在人工气候培养箱中进行, 温度设定为 $(25 \pm 1)^\circ C$, 空气相对湿度为 $(80 \pm 10)\%$, 黑暗条件, 设置 3 个生物学重复。所有样品用无菌水清洗数遍, 用体积分数 75% 的乙醇表面消毒后, 再用无菌水清洗 1 遍; 无菌滤纸吸干虫体体表水分, 液氮速冻, 存放于 $-80^\circ C$ 备用。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用景新微量动物组织总 RNA 提取试剂盒 (SIMGEN, 杭州) 提取不同样品的 RNA, 具体操作参照试剂盒说明书。利用质量浓度 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (美国 Thermo Scientific) 检测所提取总 RNA 的质量和浓度。利用无菌双蒸水 (ddH_2O) 将所有样品 RNA 稀释到 $125 mg \cdot L^{-1}$ 备用。按照 PrimeScript™ Reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒 (Takara) 说明书合成样品 cDNA, 每个样品取 $7.0 \mu L$ RNA。

1.4 引物设计、合成和筛选

参考昆虫常用内参基因, 根据筛胸梳爪叩甲幼虫的转录组测序注释结果^[16], 筛选不同内参基因 (β -actin、 α -tubulin、GAPDH、AK、SYN6、RPS3、RPL13 α 、RPL10、RPS27a、RPL32、RPS20 和 EF-1 α) 的同源序列, 同时筛选昆虫免疫应答相关基因的 6 个同源序列 [PGRP、Prx、SDR(1)、SDR(2)、SDR(3) 和 SDR(4)], 并利用在线网站 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> 针对基因开放阅读框 (ORF) 区设计 qRT-PCR 扩增引物。所有引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

以 cDNA(0 d) 为模板进行普通 PCR 扩增, 并根据电泳结果筛选出扩增条带单一的特异性引物对。PCR 扩增反应体系为: $2 \times$ TSINGKE Master Mix $10.0 \mu L$, 上下游引物 ($10 \mu mol \cdot L^{-1}$) 各 $1.5 \mu L$, 模板 cDNA $3.0 \mu L$, ddH_2O 补足至 $20.0 \mu L$ 。扩增程序为: $94^\circ C$ 预变性 5 min; $94^\circ C$ 变性 30 s, 退火 $55^\circ C$, $72^\circ C$ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后于 $72^\circ C$ 补平 7 min, 终止温度为 $4^\circ C$ 。PCR 扩增反应在 LifeECO 基因扩增仪 (杭州博日) 上进行。取 PCR 扩增产物 $3.0 \mu L$, 点样于质量浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶上, TS-GelRed 核酸染料染色, $1 \times$ TAE 缓冲液中电泳 30~40 min (120 V), 利用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪 (美国伯乐) 摄取扩增图谱。

1.5 标准曲线构建及引物扩增效率分析

标准曲线构建。将反转录获得的 cDNA(0 d) 稀释 2 倍后, 再依次稀释 5 个梯度, 各梯度依次稀释 5 倍。以梯度稀释的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR, 反应在 Line Gene 9600 Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (杭州博日) 上进行, 使用 Gene-9660 software 采集数据。PCR 扩增反应体系为: $2 \times$ SYBR Green Mix $5.0 \mu L$, 上下游引物 ($5 \mu mol \cdot L^{-1}$) 各 $0.2 \mu L$, 模板 cDNA $1.0 \mu L$, ddH_2O 补足至 $10.0 \mu L$ 。qRT-PCR 扩增程序: $95^\circ C$ 预变性 2 min; $95^\circ C$ 变性 15 s, $60^\circ C$ 退火和延伸 1 min, 共 40 个循环, $60^\circ C$ 采集荧光信号。扩增结束后做熔解曲线分析以检测扩增产物的特异性。熔解曲线程序: $95^\circ C$, 15 s; $65^\circ C$, 1 min; $95^\circ C$, 20 s, 隔 20 s 步进 $0.2^\circ C$; $30^\circ C$, 1 min。各样品进行 3 次技术重复, 取循环阈值 (cycle threshold, C_t) 的平均值。判断每对引物是否具有特异性以及是否有引物二聚体, 熔解曲线为单峰时用于后续分析。

扩增效率分析。利用 SPSS 19.0 软件分析 cDNA 模板质量浓度 (对数值) 和 C_t 值的线性关系, 获得相关系数 (R^2) 和斜率 (S), 利用公式 $E = (10^{-1/S} - 1) \times 100\%$ 计算引物的扩增效率^[17]。

1.6 内参基因表达稳定性分析

以 0(ck)、7、12 和 17 d 取样的 cDNA 为模板, 利用 1.4 节筛选出的引物对进行 qRT-PCR, 具体程序同 1.4 节所述。利用 Excel 2003, GeNorm^[18]、Normfinder^[19] 和 Bestkeeper^[20] 软件根据 C_t 平均值分析候选内参基因的表达稳定性。GeNorm 根据表达稳定度 (M 值) 大小对候选内参基因进行排序, M 值越小表示基因表达越稳定; 根据标准化因子的配对差异分析 ($V_{n/n+1}$) 判定最佳的内参基因数组, $V_{n/n+1} < 0.15$ 代表该条件下内参基因最佳数目为 n 个。Bestkeeper 软件通过标准差 (S_D) 和概率值 (P) 直接分析 C_t 值, $S_D > 1$ 或者 $P > 0.05$ 时, 判定该基因不适合作为内参基因。具体操作方法参考文献 [21]。

1.7 内参基因表达稳定性验证

选择免疫应答相关基因的 6 个同源序列作为目的基因, 分析 1.6 节选出的内参基因在不同处理间 (0、7、12 和 17 d) 的相对表达量变化, 以验证其表达稳定性。目的基因相对表达量的计算采用

2^{-ΔΔC_t}法。其中：ΔΔC_t=ΔC_{t-实验}-ΔC_{t-对照}，ΔC_t=C_{t-目的基因}-C_{t-内参基因}。采用统计学单因素方差分析及最小显著性差异法 (LSD) 多重比较分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

由图 1 可见：所有样品 D(260)/D(280) 均为 1.8~2.1，凝胶电泳结果可见 2 条清晰条带 (28S 和 18S rRNA)，说明总 RNA 较为完整，未出现明显降解。

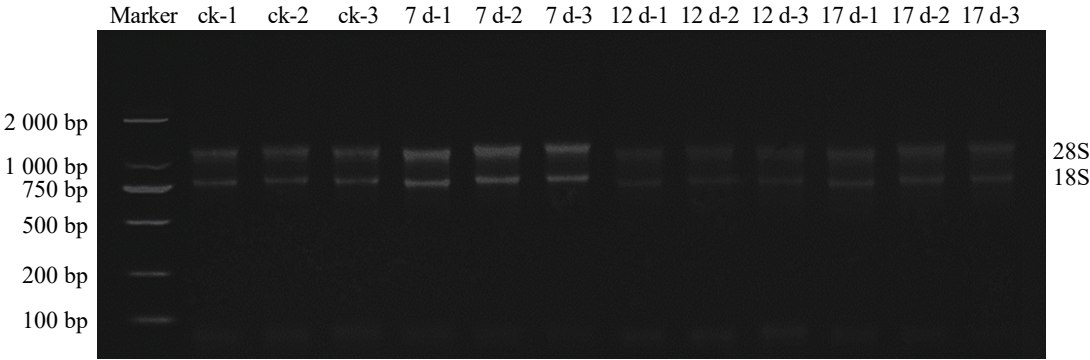


图 1 总 RNA 电泳图
Figure 1 Electrophoretogram of total RNA

2.2 引物特异性和扩增效率分析

根据筛胸梳爪叩甲幼虫的转录组测序数据，筛选出 24 条候选内参基因和 6 条目的基因的同源序列，根据普通 PCR 扩增结果选出条带单一的 22 对特异性引物，再根据 qRT-PCR 的引物熔解曲线、R² 和扩增效率进一步筛选出 6 对内参基因 (*β-actin*、*GAPDH*、*α-tubulin*、*RPL13α*、*RPS27a* 和 *RPS3*) 和 6 对目的基因的引物。12 对引物的熔解曲线均为单峰，R² 为 0.989~0.998，扩增效率为 88.69%~112.48%，表明引物具有特异性，cDNA 的质量浓度和 C_t 值存在明确的线性关系，引物扩增效率符合荧光定量要求 (表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Informations of qRT-PCR primers				
基因	引物序列	产物长度/bp	扩增效率/%	R ²
<i>β-actin</i>	F: GGATACCTCTTTTGCTCTGGG, R: ATCAGGGTGTTCATGGTTGG	75	112.48	0.993
<i>GAPDH</i>	F: TACTCATGGTCGTTACAAGGG, R: TTCTACAACGTATTCAGCTCCAG	140	101.79	0.993
<i>α-tubulin</i>	F: GAAGCTCGTGAAGATTGGC, R: ACCTTCGCCTTCTCCTTCTC	137	100.63	0.996
<i>RPL13α</i>	F: CTGAGGAAGAGCGTAAGGTG, R: TCAGACGAGCCTTTCTTAAG	145	106.97	0.990
<i>RPS27a</i>	F: CTGTCTGAATCTTTGCCTTG, R: GTTCTTTTGGTAGCGTGTCATG	146	96.20	0.998
<i>RPS3</i>	F: CAATAGCGCACAAACCACG, R: TGTATTGGGTGAAAAGGGAAGG	128	111.93	0.992
<i>PGRP</i>	F: TGTCGTACTTCTGGCTATCATTG, R: TGTGATGGAGGGTTACTTGC	123	88.69	0.989
<i>Prx</i>	F: CTATCCCTTAGACTTCACCTTCG, R: ATTTCTCCCAAACCTCCCTG	171	106.67	0.996
<i>SDR(1)</i>	F: CGGCATTGACGGAACCTTAC, R: GGTTTCCACAGACTTTTGCG	126	109.16	0.995
<i>SDR(2)</i>	F: AGGTGCTAGTTCGGGAATTG, R: CGTGTAATTGCCAGGTTTTC	140	99.49	0.997
<i>SDR(3)</i>	F: GGATTACGAGCATAAGTCCTGG, R: CGGCGATGTCTTCAGATTTTAAC	126	106.58	0.996
<i>SDR(4)</i>	F: TTAGGGTTTCAGTCAAGGCAG, R: GAAGCCGTCCAAGATATGAAAG	148	93.34	0.994

2.3 内参基因表达稳定性分析

2.3.1 内参基因的表达水平分析 不同平沙绿僵菌侵染处理时长 (0、7、12 和 17 d) 下，筛胸梳爪叩甲幼虫 6 个候选内参基因的 C_t 值为 11.110~15.463 (图 2)，表明本试验条件下所选内参基因表达水平较高。但不同基因的 C_t 值存在差异，其中 *β-actin* 最低，平均 C_t 值为 11.622；*α-tubulin* 最高，平均 C_t 值为 14.712；*GAPDH* 的 C_t 值跨度最小 (13.273~13.873)；*RPS3* 跨度最大 (13.720~14.970)。

2.3.2 内参基因表达稳定性分析和最佳数量评估

GeNorm 软件计算基因的表达稳定度 (M 值), $M > 1.5$ 的内参基因不可用, M 越小, 内参基因的表达越稳定。该软件分析结果显示: 6 个候选内参基因的 M 值均 < 1.5 , $PRS27a$ 和 $RPS3$ 的表达最稳定, 其后依次是 α -tubulin、 $RPL13a$ 和 β -actin, $GAPDH$ 的表达最不稳定。NormFinder 通过比较样本的组内变异和组间变异来评估基因的稳定性。该软件分析结果显示: $RPL13a$ 的表达最稳定, 其后依次是 α -tubulin、 $RPS3$ 、 $RPS27a$ 和 β -actin, $GAPDH$ 的表达最不稳定。BestKeeper 是以标准差和 P 来判断内参基因是否可用。该软件分析结果显示: 所有候选内参基因的标准差均 < 1 , 但 β -actin 和 $GAPDH$ $P > 0.05$, 不适合作为本试验条件下的内参, 其余 4 个内参基因可用。综合 3 个软件的评价结果发现: $RPS3$ 、 $PRS27a$ 、 $RPL13a$ 和 α -tubulin 这 4 个内参的表达稳定性排名稍有差异, $RPS3$ 的表达最稳定, $PRS27a$ 和 $RPL13a$ 次之, 随后是 α -tubulin(表 2)。GeNorm 软件通过判断配对变异值 (< 0.15) 来确定内参基因最佳数目。由表 3 可知: $V_{2/3} = 0.084 < 0.15$, 表明该条件下最佳内参基因的数目 $n=2$ (表 3)。

2.3.3 内参基因表达稳定性验证 综合 3 款软件的内参基因表达稳定性排名和最佳组合数目分析结果, 本研究选择 $PRS27a$ 和 $RPS3$ 为内参基因。由图 3 可知: 以 $PRS27a$ 和 $RPS3$ 为内参基因时, 6 个目的基因在平沙绿僵菌不同处理时间 (0、7、12 和 17 d) 的筛胸梳爪叩甲幼虫中的表达变化趋势相同; 其中, $PGRP$ 基因相对表达量在 7 d 时都较对照 (0 d) 显著提高 ($P < 0.05$), 随后下降, 12 和 17 d 时无显著差异; Prx 基因相对表达量整体呈上升趋势, 在 12 和 17 d 时均显著高于对照 ($P < 0.05$); $SDR(1)$ 相对表达量则呈下降趋势; $SDR(2)$ 在 17 d 时相对表达量显著升高 ($P < 0.05$); $SDR(3)$ 和 $SDR(4)$ 相对表达量均先升高后下降, 并在 12 d 时表达量最高, 较其他处理时间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 具有快速、准确和灵敏的特性, 在基因表达分析研究中应用广泛, 然而表达稳定的内参基因选择是获得目的基因准确表达结果的前提条件。同一内参基因在不同物种、组织、发育阶段和处理条件下的表达稳定性也存在差异^[8-9]。目前尚未见有关筛胸梳爪叩甲幼虫内参基因的研究报道。本研究首次对该虫在平沙绿僵菌侵染条件下的候选内参基因进行了筛选评估。GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对候选内参基因的分析结果表明: $PRS27a$ 和 $RPS3$ 的表达稳定。本研究以 $PGRP$ 、 Prx 、 $SDR(1)$ 、 $SDR(2)$ 、 $SDR(3)$ 和 $SDR(4)$ 为目的基因对 $PRS27a$ 和 $RPS3$ 内参基因进行了验证, 结果显示: 分别以这 2 个基因为内参时, 6 个目的基因的表达趋势一致, 证明了这 2 个基因作为内参的可靠

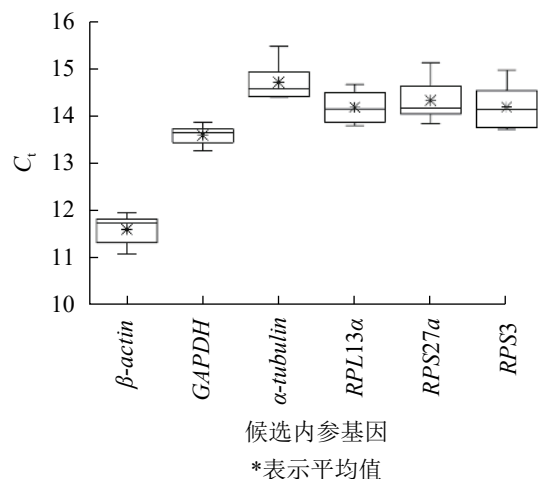


图 2 筛胸梳爪叩甲幼虫候选内参基因的 C_t 值分析

Figure 2 C_t value analysis of candidate reference genes of *Melanotus cribricollis* larvae

表 2 利用 BestKeeper 软件评价候选内参基因的表达稳定性

Table 2 Stability of candidate reference genes based on BestKeeper analysis

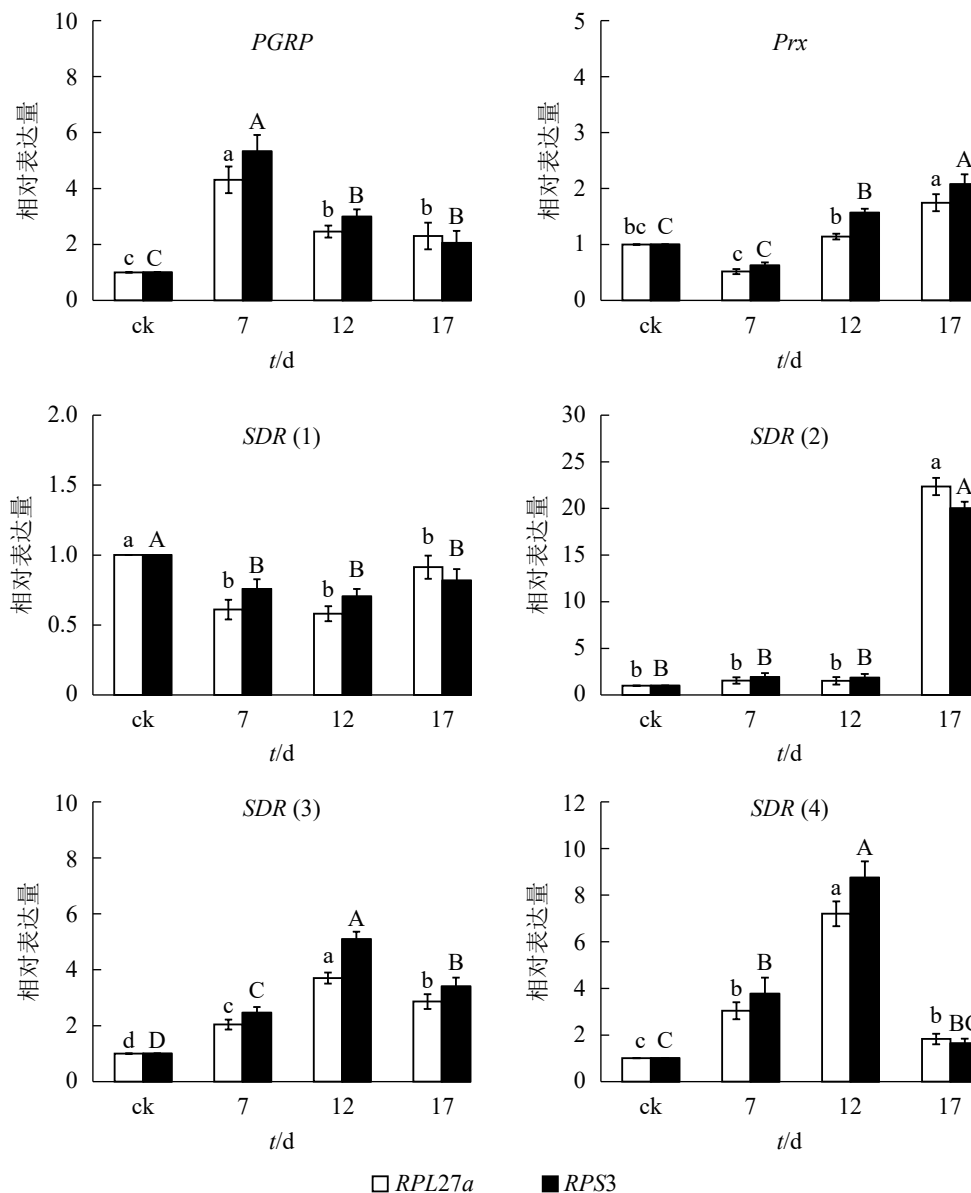
基因	GeNorm		NormFinder		BestKeeper		
	稳定值	排名	稳定值	排名	标准差	P	排名
β -actin	0.391	4	0.244	5	0.27	0.313	6
$GAPDH$	0.426	5	0.293	6	0.16	0.261	5
α -tubulin	0.242	2	0.177	2	0.24	0.042	4
$RPL13a$	0.319	3	0.164	1	0.32	0.024	3
$RPS27a$	0.197	1	0.206	4	0.35	0.012	2
$RPS3$	0.197	1	0.202	3	0.39	0.002	1

表 3 内参基因的最佳数量评估

Table 3 Determination of the optimal number of reference genes for normalization

$V_{n/n+1}$	配对变异值	$V_{n/n+1}$	配对变异值
$V_{2/3}$	0.084	$V_{4/5}$	0.092
$V_{3/4}$	0.092	$V_{5/6}$	0.074

说明: n 表示内参基因数目



对照组的相对表达量设定为 1。不同小写字母表示以 *RPL27a* 为内参时差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示以 *RPS3* 为内参时差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 以 *PRS27a* 和 *RPS3* 为内参时 6 个目的基因不同处理时间下的相对表达量

Figure 3 Expression analysis of six target genes under different processing times calibrated by *PRS27a* and *RPS3* as reference genes

性。*PGRP* 隶属于模式识别受体蛋白 (pattern recognition receptor proteins, PRRs) 家族, 可与革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的肽聚糖结合, 激活 Toll 和 Imd 信号转导通路, 诱导免疫防御相关的水解级联反应, 发生吞噬作用^[22-23]。以 *PRS27a* 和 *RPS3* 为内参时, 目的基因 *PGRP* 在筛胸梳爪叩甲幼虫体内被平沙绿僵菌诱导表达, 7 d 时较对照组显著升高, 该现象与赤拟谷盗和油菜花露尾甲 *Meligethes aeneus* *PGRP* 基因被寄生物或病原菌诱导后表达上调相似^[24-25]。*Prx* 基因编码过氧化物还原酶 (peroxiredoxin), 是抗氧化家族中的一员, 能够通过消除细胞内的活性氧 (ROS) 以维持氧化还原平衡^[26]。以 *PRS27a* 和 *RPS3* 为内参时, 目的基因 *Prx* 整体表达呈上升趋势, 推测其可能在病程后期发挥作用。SDR 蛋白 (short-chain dehydrogenases/reductases, 短链脱氢还原酶) 是一个超级家族, 由多种酶编码基因家族组成, 在多种生物合成途径、细胞信号通路和病理途径中都扮演重要角色^[27]。本研究发现: 筛胸梳爪叩甲幼虫 4 个 *SDR* 基因 [*SDR(1)*、*SDR(2)*、*SDR(3)* 和 *SDR(4)*] 对绿僵菌侵染的响应机制不同, 可能是因为参与过程不同。由上可见, 以 *PRS27a* 和 *RPS3* 为内参时, 筛胸梳爪叩甲幼虫 *PGRP*、*Prx* 和 *SDR* 这 3 类基因的表达模式符合赤拟谷盗和油菜花露尾甲等昆虫对病原菌的响应机制, 进一步证实了该内参组合适用于绿僵菌侵染条

件下的目的基因表达水平研究。

本研究首次报道了在平沙绿僵菌侵染条件下筛胸梳爪叩甲幼虫可用的内参基因 (*PRS27a* 和 *RPS3*), 为后续研究绿僵菌和竹林金针虫互作相关基因的表达奠定基础, 也对其他昆虫基因表达以及虫菌互作相关研究提供参考。

4 参考文献

- [1] 邓顺, 舒金平, 王浩杰. 筛胸梳爪叩甲幼虫寄主调查及其土壤空间分布[J]. 昆虫知识, 2010, 47(5): 983 – 987.
DENG Shun, SHU Jinping, WANG Haojie. Investigation of host rang of wireworms (*Melanotus cribricollis*) and their spatial distribution in soil [J]. *Chin Bull Entomol*, 2010, 47(5): 983 – 987.
- [2] 舒金平, 滕莹, 陈文强, 等. 筛胸梳爪叩甲的防治技术研究[J]. 林业科学研究, 2012, 25(5): 620 – 625.
SHU Jinping, TENG Ying, CHEN Wenqiang, et al. Control techniques of *Melanotus cribricollis* (Coleoptera: Elateridae) [J]. *For Res*, 2012, 25(5): 620 – 625.
- [3] SCHOLTE E J, KNOLS B G J, TAKKEN W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity [J]. *J Invertebr Pathol*, 2006, 91(1): 43 – 49.
- [4] HOWARD A F V, N'GUESSAN R, KOENRAADT C J M, et al. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduces instantaneous blood feeding in wild multi-insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Benin, West Africa [J]. *Parasites Vectors*, 2010, 3(1): 87. doi: 10.1186/1756-3305-3-87.
- [5] ANSARI M A, BUTT T M. Influence of the application methods and doses on the susceptibility of black vine weevil larvae *Otiorhynchus sulcatus* to *Metarhizium anisopliae* in field-grown strawberries [J]. *BioControl*, 2013, 58(2): 257 – 267.
- [6] IBRAHIM A A, MOHAMED H F, EL-NAGGAR S E M, et al. Isolation and selection of entomopathogenic fungi as biocontrol agent against the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Egypt J Biol Pest Control*, 2016, 26(2): 249 – 253.
- [7] DERVEAUX S, VANDESOMPELE J, HELLEMANS J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR [J]. *Methods*, 2010, 50(4): 227 – 230.
- [8] de JONGE H J M, FEHRMANN R S N, de BONT E S J M, et al. Evidence based selection of housekeeping genes [J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e898. doi: 10.1371/journal.pone.0000898.
- [9] KOZERA B, RAPACZ M. Reference genes in real-time PCR [J]. *J Appl Genet*, 2013, 54(4): 391 – 406.
- [10] 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.
FU Wei, XIE Wen, ZHANG Zhuo, 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 Entomol Sin*, 2012, 55(12): 1406 – 1412.
- [11] 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 Bo, GUO Qianshuang, MAO Bipeng, et al. Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternates* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-qPCR [J]. *Acta Entomol Sin*, 2016, 59(4): 427 – 437.
- [12] 刘金泊, 欧静, 姚富姣, 等. 磷化氢诱导下赤拟谷盗实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 257 – 264.
LIU Jinbo, OU Jing, YAO Fujiao, et al. Identification of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Tribolium castaneum* after exposure to phosphine [J]. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22(2): 257 – 264.
- [13] 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 Ling, HU Xiaojing, XU Zhifeng, et al. Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomol Sin*, 2017, 60(11): 1266 – 1277.
- [14] 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.
TAO Rong, LI Hui, SUN Yuhang, et al. Identification and screening of internal reference genes of *Hyphantria cunea*

- (Lepidoptera: Arctiidae) [J]. *Sci Silv Sin*, 2019, **55**(9): 111 – 120.
- [15] 张亚波, 吴盼盼, 王鹏, 等. 一株绿僵菌的鉴定及其生物学特性[J]. *林业科学*, 2012, **48**(12): 134 – 140.
ZHANG Yabo, WU Panpan, WANG Peng, *et al.* Identification and biological characteristics of a *Metarhizium pingshaense* strain isolated from *Melanotus cribricollis* larva [J]. *Sci Silv Sin*, 2012, **48**(12): 134 – 140.
- [16] YE Bihuan, ZHANG Yabo, SHU Jinping, *et al.* RNA-sequencing analysis of fungi-induced transcripts from the bamboo wireworm *Melanotus cribricollis* (Coleoptera: Elateridae) larvae [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(1): e0191187. doi: [10.1371/journal.pone.0191187](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191187).
- [17] RADONIĆ A, THULKE S, MACKAY I M, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313**(4): 856 – 862.
- [18] 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 Biol*, 2002, **3**(7): 1 – 11.
- [19] ANDERSEN C L, JENSEN J L, ØRNTØFT T F. 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 Res*, 2004, **64**(15): 5245 – 5250.
- [20] 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]. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**: 509 – 515.
- [21] 吴建阳, 何冰, 杜玉洁, 等. 利用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件进行内参基因稳定性分析的方法[J]. *现代农业科技*, 2017(5): 278 – 281.
WU Jianyang, HE Bing, DU Yujie, *et al.* Analysis method of systematically evaluating stability of reference genes using geNorm, NormFinder and BestKeeper [J]. *Modern Agric Sci Technol*, 2017(5): 278 – 281.
- [22] LEMAITRE B, HOFFMANN J. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25**(1): 697 – 743.
- [23] VOGEL H, BADAPANDA C, VILCINSKAS A. Identification of immunity-related genes in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* by suppression subtractive hybridization [J]. *Insect Mol Biol*, 2011, **20**(6): 787 – 800.
- [24] ZHONG Daibin, WANG Meihui, PAI A, *et al.* Transcription profiling of immune genes during parasite infection in susceptible and resistant strains of the flour beetles (*Tribolium castaneum*) [J]. *Exp Parasitol*, 2013, **134**(1): 61 – 67.
- [25] VOGEL H, BADAPANDA C, KNORR E, *et al.* RNA sequencing analysis reveals abundant developmental stage-specific and immunity-related genes in the pollen beetle *Meligethes aeneus* [J]. *Insect Mol Biol*, 2014, **23**(1): 98 – 112.
- [26] RHEE S G, KANG S W, CHANG T S. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases [J]. *IUBMB Life*, 2001, **52**(1/2): 35 – 41.
- [27] KAVANAGH K L, JÖRNVALL H, PERSSON B, *et al.* The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, **65**(24): 3895 – 3906.