

柑橘大实蝇内参基因的评估

王 佳, 赵 静, 刘映红*

(西南大学植物保护学院昆虫研究所, 重庆 400716)

摘要:【目的】柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 是一种危害严重的柑橘害虫。本研究旨在筛选柑橘大实蝇在特定条件下体内稳定表达的内参基因, 以确保使用实时荧光定量 PCR 分析目标基因表达的可靠性。【方法】选择 10 种候选内参基因用于进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR), 利用 5 种软件对柑橘大实蝇在不同虫态下 (低龄幼虫、3 龄幼虫、1 日龄蛹、80 日龄蛹、160 日龄蛹、雄成虫、雌成虫) 以及成虫不同部位 (成虫头、胸、腹、整体) 中候选内参基因的 Ct 值进行分析, 明确其表达的稳定性。【结果】在柑橘大实蝇不同虫态和成虫不同部位, 10 种候选内参基因的 Ct 值都处于 15~30 之间, 各基因 Ct 值的不同表明各基因的表达量存在差异。综合分析各种软件对内参基因稳定性的排名, 结合 geNorm 软件对最佳内参基因数量的分析结果, 推荐在不同虫态下采用 *UBQ*, *GAPDH* 和 *GST* 作为内参基因, 在不同成虫部位中采用 *TUB*, *GAPDH* 和 *GST* 作为内参基因。【结论】为了获取可信的目标基因表达分析结果, 建议根据不同条件选择使用不同的内参基因组合。本研究结果有利于进一步研究柑橘大实蝇在特定条件下的目标基因表达。

关键词: 柑橘大实蝇; 内参基因; 表达稳定性; 基因表达分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2014)12-1375-06

Evaluation of endogenous reference genes in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae)

WANG Jia, ZHAO Jing, LIU Ying-Hong* (Institute of Entomology, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 【Aim】The Chinese citrus fly, *Bactrocera minax*, is a devastating pest of citrus. Our study aims to screen out the stably expressed endogenous reference genes in *B. minax* under specified conditions to assure the reliability of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of target genes. 【Methods】Ten candidate reference genes were selected for qRT-PCR, and five softwares were adopted to determine the stability of candidate reference genes in different developmental stages (low-instar larva, 3rd instar larva, 1 day-old pupa, 80 day-old pupa, 160 day-old pupa, male adult, and female adult) and body parts of male and female adults (head, thorax, abdomen, and whole body) by analyzing the Ct value. 【Results】In different developmental stages and body parts of adults of *B. minax*, the Ct values of candidate reference genes were between 15 and 30. The disparity of the Ct value indicated that the expression levels of genes were different. Based on the comprehensive analysis of stability ranking of candidate reference genes with the five softwares and the optimal reference gene number calculated by geNorm, *UBQ*, *GAPDH* and *GST* were recommended as the reference genes for different developmental stages, and *TUB*, *GAPDH* and *GST* for different body parts of adults. 【Conclusion】To obtain the precise expression patterns of target genes under specified conditions, the combination of reference genes is suggested to use. Our study is conducive to investigating the target gene expressions in *B. minax* under specified conditions.

Key words: *Bactrocera minax*; endogenous reference genes; expression stability; gene expression analysis; quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (Enderlein) 是一种危害严重的寡食性害虫, 主要为害各类柑橘作物 (Allwood *et al.*, 1999), 分布于尼泊尔、印度、巴基

斯坦至中国的广大柑橘生产带 (Wang and Luo, 1995; Dorji *et al.*, 2006; Drew *et al.*, 2006)。柑橘大实蝇的大暴发往往造成重大经济损失, 如 2008

基金项目: 中国博士后科学基金(2014M552307); 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2013C149)

作者简介: 王佳, 男, 1985 年 8 月生, 四川绵阳人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: aimarjia@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yhliu@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-09-02; 接受日期 Accepted: 2014-10-17

年在四川旺苍地区的“蛆柑”事件, 严重影响了全国的柑橘销售, 对柑橘产业造成巨大破坏(Lv *et al.*, 2010)。因此, 柑橘大实蝇已逐渐引起广泛的重视。

柑橘大实蝇为一化性昆虫, 蛹期长达 6 个月并在此期间发生专性滞育以越冬, 滞育可能有利于应对环境压力(Denlinger, 2002; Kostal, 2006)及同步成虫羽化期与柑橘结果期(Wang and Luo, 1995)。由于目前仍无通过人为手段打破滞育的理想办法, 因此无法于实验室人工饲养该害虫, 导致了相关研究的滞后。然而, 通过揭示滞育机理, 并在此基础上发掘打破滞育的方法, 能为解决人工饲养的难题提供帮助, 便于深入开展研究(Dong *et al.*, 2013)。

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 能快速、高效、准确地分析基因表达量(Ginzinger, 2002; Bustin *et al.*, 2005; Van Guilder *et al.*, 2008), 从而被广泛地用于研究生物在不同条件下的基因表达差异以揭示相关分子机理。鉴于不同样品在 RNA 产量、质量以及反转录效率上可能存在的差别, 采用 qRT-PCR 时需要选用稳定的内参基因来实现对不同样品中 RNA 的定量和数据归一化。因此, 内参基因的选择对目标基因表达量的分析具有十分重要的意义。由于“管家基因”在各种细胞中均必不可少, 且在不同条件下的变异最小, 因而通常被选择作为 qRT-PCR 的内参基因(Suzuki *et al.*, 2000)。

昆虫在不同处理条件下, 各种“管家基因”的稳定性往往存在差异(Van Hiel *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Ponton *et al.*, 2011; Bansal *et al.*, 2012; Paim *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014)。为了明确柑橘大实蝇在不同发育阶段以及不同部位表达相对稳定的内参基因, 本研究选取了常用的 10 种“管家基因”作为候选内参基因并对其稳定性进行了评估, 其结果有助于准确分析目标基因的表达量并揭示滞育的相关分子机理。

1 材料与方法

1.1 试虫来源

2013 年 9 - 10 月于重庆武隆县橘园采集柑橘大实蝇为害蛆果, 带回实验室解剖后收集低龄幼虫、部分 3 龄幼虫, 于液氮中保存备用; 同时, 再从蛆果中收集部分 3 龄幼虫, 置于盛有 5 cm 厚沙土的盆中, 使其在室外自然环境中入土化蛹。随着盆中虫体发育, 依次收集 1 日龄蛹、80 日龄蛹、160 日龄蛹、雄成虫、雌成虫, 于液氮中保存备用。

1.2 样品收集

收集于室外自然环境中发育的低龄幼虫、3 龄幼虫、1 日龄蛹、80 日龄蛹、160 日龄蛹、雄成虫、雌成虫用于分析不同发育阶段候选内参基因的稳定性; 分别收集雌、雄成虫的头、胸、腹、整体用于分析成虫不同部位候选内参基因的稳定性。每个处理重复 3 次。

1.3 候选内参基因

选择 10 种“管家基因”作为候选内参基因, 包括: 肌动蛋白基因(*ACT*)、延长因子基因(*EF*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)、谷胱甘肽 S-转移酶基因(*GST*)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因(*G6PDH*)、核糖体蛋白 L32 基因(*RPL32*)、琥珀酸脱氢酶辅酶黄素蛋白亚基基因(*SDHA*)、转录起始因子 TFIID 亚基基因(*TAF*)、 α -微管蛋白基因(*TUB*)、泛素蛋白基因(*UBQ*)。从已获取的转录组数据中筛选出候选内参基因的序列信息, 并使用软件 Primer Premier 6.0 分别对每种候选基因设计多对引物, 随后通过实时荧光定量 PCR 仪绘制每对引物的溶解曲线与梯度浓度扩增的标准曲线以检测每对引物的扩增特异性、扩增效率以及标准曲线的决定系数(R^2), 从中选择一对最佳引物(满足无特异性扩增、扩增效率介于 95% ~ 105% 之间、 $R^2 > 0.99$ 等条件), 随后分别对每种候选基因进行实时荧光定量 PCR 分析(表 1)。

1.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取约 100 mg 于液氮中保存完好的实验材料, 放入经液氮预冷的研钵中研磨成粉末状, 再将样品粉末转移至经液氮预冷的离心管中。使用 Trizol 试剂(Life Technologies 公司)提取样品总 RNA, 再利用无 RNA 酶污染的 DNase I(普洛麦格生物技术有限公司)去除 RNA 样品中存在的少量 DNA, 获得纯化的 RNA。具体操作方法分别参照两种试剂的说明书。最后采用紫外分光光度法与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量, 保证 RNA 的纯度、浓度、完整性。纯化后的 RNA 立即使用 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)进行反转录, 合成 cDNA。具体操作方法参考试剂盒说明书。每个处理重复 3 次, 合成的 cDNA 于 -20℃ 中保存备用。

1.5 实时荧光定量 PCR

使用 SYBR Premix Ex TaqTM II Kit 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)对各个样本的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系为 25 μ L, 包含

表 1 内参基因 qRT-PCR 引物的基本信息

Table 1 Information of primers of endogenous reference genes used for qRT-PCR				
基因名称 Gene name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	扩增长度(bp) Amplicon size	扩增效率(%) Amplification efficiency	标准曲线决定系数(R^2) Coefficient of determination in standard curves
<i>TAF</i>	F: ACAGTAACGCAAATAAGCC R: CGACGAAGGTGGTAAACTA	195	101.91	0.9981
<i>SDHA</i>	F: AACCCATCCCAGTGCTAC R: TCACAGCCGTTCTCATCG	97	98.19	0.9989
<i>GAPDH</i>	F: GCAAACGTGGCGTGATG R: GCTGTTGGGACACGGAAT	136	100.66	0.9975
<i>ACT</i>	F: TCACTCAGCGTCGTCGTA R: AGCTTCTCCCAATGTGGC	218	96.86	0.9987
<i>G6PDH</i>	F: GCATCGCTACAAGGACTC R: CGTAAGGTATGGGCTTCACT	173	97.44	0.9992
<i>UBQ</i>	F: TGATGCGTCCACGAATAG R: CGTTCATATCGTCCACA	151	101.78	0.9992
<i>TUB</i>	F: CTGAACGCTGACTTACGC R: GAGATAACGTCCGTGTCG	198	96.74	0.9984
<i>GST</i>	F: GCTACCGTTTCCACATTC R: AACCTGCCAGTTCTCAT	118	101.28	0.9979
<i>EF</i>	F: AGTGGAGGGCAAGTGTTC R: CCATACCTGGTTTCAGGATA	164	105.38	0.9910
<i>RPL32</i>	F: CGTGCCAAGTGTTGGATT R: TCAATGCTGCGACGATGT	129	99.65	0.9977

SYBR Premix Ex *Taq*TM II 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 样品 1 μL, 无 RNA 酶污染 ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增程序设置: 94℃ 变性 5 s; 然后进行 40 个循环: 94℃ 变性 5 s, 60℃ 延伸 30 s; 溶解曲线: 从 65℃ 加热到 95℃, 每隔 0.5℃ 测定一次荧光信号。根据荧光定量 PCR 仪自动计算得出的每个反应的 Ct 值, 每个样品重复检测 3 次, 计算得出 Ct 值的平均值。

1.6 数据统计与分析

每种处理皆设置 3 个生物学重复。对不同发育阶段而言, 每个基因共得到 21 个 Ct 值用于分析; 对成虫不同部位而言, 每个基因共得到 24 个 Ct 值用于分析。随后分别利用 BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004)、NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) 与 geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) 软件, 并登陆 <http://www.leonxie.com/referencegene.php>, 利用该网站上的 Delta CT (Silver *et al.*, 2006) 以及 RefFinder (Xie *et al.*, 2011) 程序对候选内参基因的 Ct 值进行分析, 计算出各基因表达的稳定性。BestKeeper 根据各组样品候选内参基因的 Ct 值, 对样品进行配对相关分析, 计算标准差(*SD*), *SD* 小于 1 的内参基因被认为是稳定表达的基因, *SD* 越小, 内参基因越稳定。geNorm 通过逐步排除最不稳定的候选内参基因, 计算每个基因的 M 值, M 值越小, 内参基因

越稳定; 此外通过配对差异分析值($V_{n/n+1}$)来判定所需内参基因的最适数目, $V_{n/n+1}$ 的默认值为 0.15, 计算结果高于该值, 表明需要引入第 $n+1$ 个内参基因, 反之则不需要。NormFinder 结合组内方差与组间方差, 计算出稳定值, 稳定值越小, 该内参基因越稳定。Delta Ct 法计算每个候选内参基因与其他基因 Ct 值差异的标准差(*SD*), *SD* 越小, 内参基因越稳定。为减少单一软件分析产生的片面性, 本研究最终采用 RefFinder 程序将上述 4 种方法分析得到的排名求几何平均值, 得到一个更加可靠的综合排名指数, 该指数越小, 说明该内参基因越稳定。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因在柑橘大实蝇不同虫态及成虫不同部位的 Ct 值分析

在不同虫态及成虫不同部位中, 10 种候选内参基因经荧光定量 PCR 扩增以后均得到 Ct 值, 且都处于 15~30 之间。不同基因 Ct 值的不同, 表明候选内参基因的表达量存在差异。在两种条件下, *ACT*, *GAPDH* 与 *TUB* 表达量均相对较大, 而其他基因表达量相对较小(图 1)。不同候选内参基因在各条件下的 Ct 值跨度也存在差异。在不同虫态中, *TUB* 的 Ct 值跨度最小($\Delta Ct = 2.78$), *ACT* 的跨度最大($\Delta Ct = 7.85$)(图 1: A); 在成虫不同部位中,

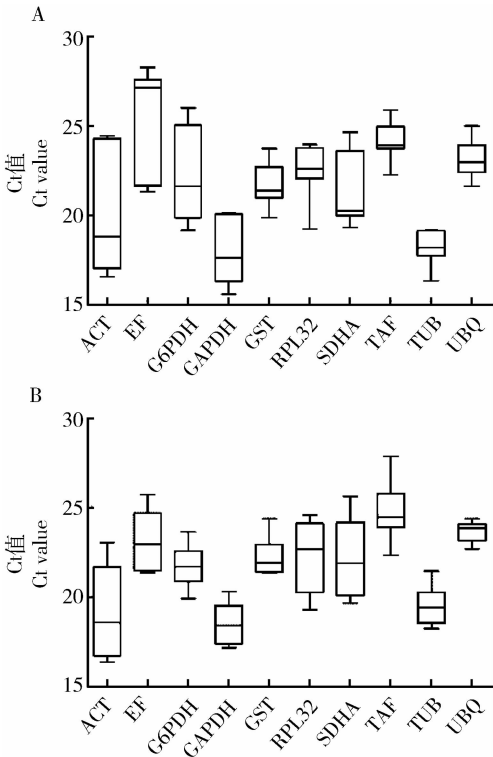


图 1 候选内参基因在柑橘大实蝇不同虫态(A)及成虫不同部位(B)的 Ct 值箱型图分析

Fig. 1 Ct value analysis of candidate reference genes in various developmental stages (A) and adult body parts (B) of *Bactrocera minax*

UBQ 的 Ct 值跨度最小 ($\Delta Ct = 1.665$), *ACT* 的跨度最大 ($\Delta Ct = 6.61$) (图 1: B)。

2.1 候选内参基因的稳定性分析

在不同虫态中, Delta CT 和 NormFinder 软件分析显示 *GAPDH*, *SDHA*, *TAF* 与 *RPL32* 表达相对稳定; BestKeeper 软件分析显示 *UBQ*, *GST* 与 *TUB* ($SD < 1$), geNorm 软件分析显示 *UBQ*, *GST*, *TUB* 与 *TAF* ($M < 1$) 符合单内参条件; RefFinder 软件综合分析上述结果显示 *UBQ*, *GAPDH*, *GST* 与 *SDHA* 稳定性相对较好 (表 2)。geNorm 分析中的配对差异分析 ($V_{n/n+1}$) 值均大于默认值 0.15 (图 2), 说明各候选内参基因在该条件下的表达稳定性并不十分理想, 需要多种内参基因组合使用来分析目标基因的表达。

在不同成虫部位中, Delta CT 和 NormFinder 软件分析显示 *TUB*, *GAPDH*, *GST* 与 *G6PDH* 表达相对稳定; BestKeeper 软件分析显示 *UBQ*, *GST*, *G6PDH* 与 *TUB* ($SD < 1$), geNorm 软件分析显示 *GAPDH*, *TUB*, *GST*, *G6PDH*, *TAF*, *UBQ* 与 *EF* ($M < 1$) 符合单内参条件; RefFinder 软件分析显示 *TUB*, *GAPDH*, *GST* 与 *G6PDH* 稳定性相对较好 (表 3)。geNorm 分析中的 $V_{n/n+1}$ 值均大于 0.15 (图 2), 说明在该条件下同样需要多种内参基因组合使用来分析目标基因的表达。

表 2 候选内参基因在柑橘大实蝇各虫态的稳定性排名

Table 2 Stability ranking of candidate endogenous reference genes for various developmental stages of <i>Bactrocera minax</i>										
排名 Ranking	Delta CT		BestKeeper		NormFinder		geNorm		RefFinder	
	基因 Gene	SD	基因 Gene	SD ± [CP]	基因 Gene	稳定值 Stability value	基因 Gene	M 值 M value	基因 Gene	排名指数 Ranking index
1	<i>GAPDH</i>	1.53	<i>UBQ</i>	0.881	<i>SDHA</i>	0.744	<i>UBQ/GST</i>	0.554	<i>UBQ</i>	2.24
2	<i>SDHA</i>	1.54	<i>GST</i>	0.966	<i>GAPDH</i>	0.817	—	—	<i>GAPDH</i>	2.91
3	<i>TAF</i>	1.57	<i>TUB</i>	0.998	<i>RPL32</i>	0.820	<i>TUB</i>	0.870	<i>GST</i>	3.15
4	<i>RPL32</i>	1.58	<i>TAF</i>	1.009	<i>TAF</i>	0.899	<i>TAF</i>	0.997	<i>SDHA</i>	3.16
5	<i>UBQ</i>	1.60	<i>RPL32</i>	1.286	<i>UBQ</i>	1.092	<i>RPL32</i>	1.105	<i>TAF</i>	3.73
6	<i>TUB</i>	1.63	<i>GAPDH</i>	1.526	<i>TUB</i>	1.117	<i>GAPDH</i>	1.185	<i>RPL32</i>	4.16
7	<i>GST</i>	1.82	<i>SDHA</i>	1.840	<i>GST</i>	1.430	<i>SDHA</i>	1.269	<i>TUB</i>	4.24
8	<i>G6PDH</i>	1.94	<i>G6PDH</i>	2.320	<i>G6PDH</i>	1.509	<i>G6PDH</i>	1.417	<i>G6PDH</i>	8.00
9	<i>ACT</i>	2.36	<i>EF</i>	2.453	<i>ACT</i>	2.043	<i>ACT</i>	1.626	<i>ACT</i>	9.24
10	<i>EF</i>	2.57	<i>ACT</i>	3.021	<i>EF</i>	2.280	<i>EF</i>	1.815	<i>EF</i>	9.74

表 3 候选内参基因在柑橘大实蝇成虫不同部位的稳定性排名

Table 3 Stability ranking of candidate endogenous reference genes for various body parts of <i>Bactrocera minax</i> adults										
排名 Ranking	Delta CT		BestKeeper		NormFinder		geNorm		RefFinder	
	基因 Gene	SD	基因 Gene	SD ± [CP]	基因 Gene	稳定值 Stability value	基因 Gene	M 值 M value	基因 Gene	排名指数 Ranking index
1	<i>TUB</i>	0.99	<i>UBQ</i>	0.470	<i>GAPDH</i>	0.203	<i>GAPDH/TUB</i>	0.387	<i>TUB</i>	1.68
2	<i>GAPDH</i>	1.01	<i>GST</i>	0.773	<i>TUB</i>	0.220	—	—	<i>GAPDH</i>	1.78
3	<i>GST</i>	1.12	<i>G6PDH</i>	0.807	<i>GST</i>	0.609	<i>GST</i>	0.534	<i>GST</i>	2.71
4	<i>G6PDH</i>	1.15	<i>TUB</i>	0.847	<i>G6PDH</i>	0.667	<i>G6PDH</i>	0.633	<i>G6PDH</i>	3.72
5	<i>TAF</i>	1.22	<i>GAPDH</i>	1.059	<i>TAF</i>	0.743	<i>TAF</i>	0.738	<i>UBQ</i>	4.14
6	<i>SDHA</i>	1.23	<i>TAF</i>	1.154	<i>EF</i>	0.783	<i>UBQ</i>	0.828	<i>TAF</i>	5.23
7	<i>EF</i>	1.41	<i>RPL32</i>	1.495	<i>UBQ</i>	1.230	<i>EF</i>	0.927	<i>EF</i>	6.70
8	<i>UBQ</i>	1.43	<i>EF</i>	1.531	<i>SDHA</i>	1.166	<i>SDHA</i>	1.052	<i>SDHA</i>	8.24
9	<i>ACT</i>	1.77	<i>SDHA</i>	2.006	<i>ACT</i>	1.654	<i>ACT</i>	1.185	<i>RPL32</i>	9.15
10	<i>RPL32</i>	1.84	<i>ACT</i>	2.344	<i>RPL32</i>	1.668	<i>RPL32</i>	1.317	<i>ACT</i>	9.24

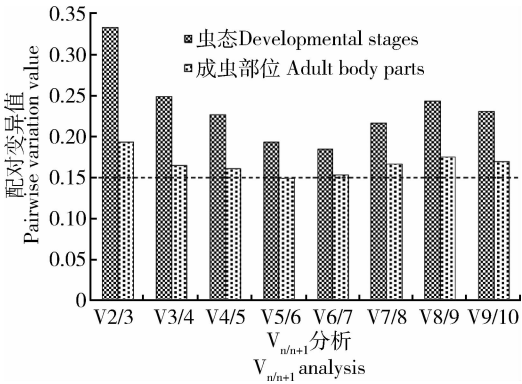


图2 柑橘大实蝇不同虫态及成虫不同部位最佳内参基因数量的配对差异分析($V_{n/n+1}$)

Fig. 2 Pairwise variation analysis ($V_{n/n+1}$) to determine the optimal number of reference genes for various developmental stages and adult body parts of *Bactrocera minax*

3 讨论

内参基因对目标基因表达量的分析具有重要的作用,对不同物种内参基因的评估报道日益增多。从已有的报道来看,不同物种在不同条件下的最佳内参基因往往存在较大差异(Van Hiel *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010; Ponton *et al.*, 2011; Bansal *et al.*, 2012; Paim *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014)。常用的内参基因在某些情况下的表达可能并不稳定,如研究烟粉虱目标基因表达时往往采用常见的 *ACT* 作为内参基因(Li *et al.*, 2011; Luan *et al.*, 2011),而 Su 等(2013)发现烟粉虱 *ACT* 在许多条件下的表达却极不稳定。因此,研究某物种在特定条件下的目标基因表达量时,必须事先对内参基因进行评估和选择,不能在未经验证的情况下使用常见的内参基因,否则可能会对分析结果造成显著影响。鉴于此,在分析柑橘大实蝇滞育阶段的基因表达前,本研究旨在对不同虫态以及成虫不同部位的内参基因进行评估。

由于 geNorm 软件的算法建立于一种假设之上,即两种最理想的内参基因在各种条件下的表达量的比例大致相似,因此,具有共调节现象的候选内参基因在不同条件下的表达量比值可能相对稳定,从而被错误地认定为表达最稳定的内参基因(Vandesompele *et al.*, 2002)。为尽量避免可能出现的共调节现象对分析结果的干扰,本研究选取的 10 个内参基因分别属于不同的生理途径,使其相互之

间具有较高的独立性。此外,内参基因的丰度也能影响分析结果,为保证结果的准确性,内参基因应中度表达,Ct 值应介于 15 ~ 30 之间(Wan *et al.*, 2010; Lilly *et al.*, 2011)。本研究所选取的 10 种内参基因 Ct 值均在该范围以内,表明其可用于进一步筛选。由于采用的算法不同,各个软件分析得到的结果存在差异性,为减少单一软件分析产生的片面性,本研究利用 RefFinder 对其他 4 种软件分析得到的内参基因稳定性排名求几何平均值,得到一个综合排名指数(表 2; 表 3)。另外,根据 geNorm 使用手册,当 $V_{n/n+1}$ 值均大于 0.15 时,可以根据 $V_{n/n+1}$ 值趋势选择 2 ~ 3 个最稳定的内参基因。因此,结合本研究在不同条件下所得 $V_{n/n+1}$ 值(图 2),各自选择 3 个内参基因最为合理。对不同虫态而言,较理想的内参基因为 *UBQ*, *GAPDH* 和 *GST*; 对不同成虫部位而言,较理想的内参基因为 *TUB*, *GAPDH* 和 *GST*。Lü 等(2014)也对柑橘大实蝇内参基因进行了评估,结果显示 *RPL32* 在不同虫态下表达最为稳定,这与本研究结果存在差异,可能是由不同的分析方法导致的。本研究结果有利于进一步揭示柑橘大实蝇滞育期间的分子机理,从而为后续深入研究奠定基础。

参考文献 (References)

Allwood AJ, Chinajariyawong A, Kritsaneepeaboon S, Drew RAI, Hamacek EL, Hancock DL, Hengsawad C, Jinapin JC, Jirasurat M, Krong CK, Leong CTS, Vijayasegaran S, 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. *Raffles Bulletin of Zoology*, 47(Suppl. 7): 1–92.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF, 2004. 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. *Cancer Research*, 64 (15): 5245–5250.

Bansal R, Mamidala P, Mian MAR, Mittapalli O, Michel AP, 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1432–1438.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW, 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34 (3): 597–601.

Denlinger DL, 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47: 93–122.

Dong YC, Wang ZJ, Clarke AR, Pereira R, Desneux N, Niu CY, 2013. Pupal diapause development and termination is driven by low temperature chilling in *Bactrocera minax*. *Journal of Pest Science*, 86(3): 429–436.

Dorji C, Clarke AR, Drew RAI, Fletcher BS, Loday P, Mahat K,

- Raghu S, Romig MC, 2006. Seasonal phenology of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in western Bhutan. *Bulletin of Entomological Research*, 96(5): 531–538.
- Drew RAI, Dorji C, Romig MC, Loday P, 2006. Attractiveness of various combinations of colors and shapes to females and males of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in a commercial mandarin grove in Bhutan. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1651–1656.
- Ginzinger DG, 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6): 503–512.
- Kostal V, 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2): 113–127.
- Li JM, Su YL, Gao XL, He J, Liu SS, Wang XW, 2011. Molecular characterization and oxidative stress response of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase (CuZnSOD) of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 77(3): 118–133.
- Lilly ST, Drummond RSM, Pearson MN, Macdiarmid RM, 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3): 294–304.
- Luan JB, Li JM, Varela N, Wang YL, Li FF, Bao YY, Zhang CX, Liu SS, Wang XW, 2011. Global analysis of the transcriptional response of whitefly to tomato yellow leaf curl China virus reveals the relationship of coevolved adaptations. *Journal of Virology*, 85(7): 3330–3340.
- Lü ZC, Wang LH, Dai RL, Zhang GF, Guo JY, Wan FH, 2014. Evaluation of endogenous reference genes of *Bactrocera (Tetracus) minax* by gene expression profiling under various experimental conditions. *Florida Entomologist*, 97(2): 597–604.
- Lv JX, Pan CK, Qi CJ, 2010. Impact of emergency on influencing mechanism of citrus circulation and its countermeasures – Taking snow disaster and citrus fruit fly events in 2008 as an example. *Journal of Huazhong Agricultural University (Social Science Edition)*, (6): 46–51. [吕建兴, 潘传快, 祁春节, 2010. 突发事件对柑橘流通的影响机理及其对策——以 2008 年雪灾冻害、柑橘大实蝇事件为例. 华中农业大学学报(社会科学版), (6): 46–51]
- Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, Araújo RN, 2012. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. *BMC Research Notes*, 5(1): 128.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6): 509–515.
- Ponton F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ, 2011. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(6): 840–850.
- Shen GM, Jiang HB, Wang XN, Wang JJ, 2010. Evaluation of endogenous references for gene expression profiling in different tissues of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *BMC Molecular Biology*, 11(1): 76.
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL, 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7(1): 33.
- Su YL, He WB, Wang J, Li JM, Liu SS, Wang XW, 2013. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in the Mediterranean species of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex. *Journal of Economic Entomology*, 106(3): 1446–1455.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR, 2000. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29(2): 332–337.
- Van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM, 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechnology*, 44(5): 619–626.
- Van Hiel MB, Van Wielendaele P, Temmerman L, Van Soest S, Vuerinckx K, Huybrechts R, Broeck JV, Simonet G, 2009. Identification and validation of housekeeping genes in brains of the desert locust *Schistocerca gregaria* under different developmental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10(1): 56.
- Wan HJ, Zhao ZG, Qian CT, Sui YH, Malik AA, Chen JF, 2010. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Analytical Biochemistry*, 399(2): 257–261.
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Royn V, Paepe AD, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7): research0034.1–11.
- Wang XJ, Luo LY, 1995. Research progress in the Chinese citrus fruit fly. *Entomological Knowledge*, 32(5): 310–315. [汪兴鉴, 罗禄怡, 1995. 桔大实蝇的研究进展. 昆虫知识, 32(5): 310–315]
- Xie F, Sun G, Stiller JW, Zhang B, 2011. Genome-wide functional analysis of the cotton transcriptome by creating an integrated EST database. *PLoS ONE*, 6(11): e26980.
- Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li JH, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.

(责任编辑: 赵利辉)