微孢子感染东亚飞蝗实时定量 PCR 内参基因的筛选*

魏笑佳** 何 岚 阿地拉·阿吉 季 荣 扈鸿霞***

（新疆师范大学生命科学学院，中亚区域跨境有害生物联合控制国际研究中心，乌鲁木齐 830054）

摘 要 **【目的】** 筛选出微孢子 *Paranosema locustae* 感染条件下东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 实时定量 PCR 最适内参基因。**【方法】** 本研究应用实时荧光定量 PCR 技术测定东亚飞蝗甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（Glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）、18s 核糖体 RNA（*18sRNA*）、微管蛋白基因（Tubulin，*TUB*）、肌动蛋白基因（Actin，*ACT*）和延伸因子 1 基因（Elongation factor1，*EF1*）5 个候选基因在 3 个微孢子浓度（1×10^4、1×10^6 和 1×10^8 个孢子/头）感染 12 d 后的表达稳定性；应用 geNorm、Bestkeeper 和 Normfinder 3 个软件综合分析 5 个内参基因的稳定性。**【结果】** geNorm 软件对 5 个内参基因在不同微孢子虫浓度感染下稳定性分析结果表明：*18S* 基因稳定性最低，平均表达稳定性值 M 值最高为 0.658 4，*TUB* 基因稳定性最高，M 值最低为 0.278 4。NormFinder 软件分析在不同微孢子虫浓度感染下的 5 个内参基因的稳定值分别为 0.152（*EF1*）、0.181（*ACT*）、0.212（*TUB*）、0.329（*GAPDH*）和 0.395（*18S*），可知内参基因稳定性顺序为：*EF1* > *ACT* > *TUB* > *GAPDH* > *18S*。由 BestKeeper 软件分析表明 5 个候选内参基因的 SD 值均小于 1.0，表达均较稳定。根据其变异系数值 CV 的大小可知，*ACT* 基因最为稳定。**【结论】** 综合 3 种软件分析结果，在不同微孢子虫浓度感染下，可选择的较为稳定的内参基因 *ACT*、*EF1* 和 *TUB* 基因作为相对定量的参照基因。

关键词 微孢子；东亚飞蝗；内参基因；实时定量 PCR；表达稳定性

Identification of stable reference genes for real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in *Locusta migratoria* infected by *Paranosema locustae*

WEI Xiao-Jia** HE Lan ADILA·Aji JI Rong HU Hong-Xia***

(International Center for the Collaborative Management of Cross-border Pest in Central Asia, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract **[Objectives]** To identify stable reference genes in *Locusta migratoria* infected by *paranosema locustae* for real-time quantitative PCR (RT-qPCR). **[Methods]** In this study, five commonly used candidate *L. migratoria* reference genes (glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*. *18sRNA*. tubulin, *TUB*. actin, *ACT*. And elongation factor1, *EF1*) were evaluated to assess their suitability for use in the normalization of RT-qPCR data in locusts infected with different concentrations of *Paranosema locustae* spores (1×10^4、1×10^6 and 1×10^8 spores/individual). Gene expression profiles were analyzed using the geNorm, Normfinder, and BestKeeper software packages. **[Results]** geNorm predicted *TUB* to be the most, and *18S* the least, stable reference genes based on their respective M-values (0.2784 and 0.6584). NormFinder estimates of the stability values (SV) of each candidate reference gene were *EF1*(0.152), *ACT*(0.181), *TUB*(0.212), *GAPDH*(0.329) and

*资助项目 Supported projects：新疆维吾尔自治区高校科研计划项目（XJEDU2017S030），新疆维吾尔自治区天山青年计划青年博士科技人才培养项目（2017Q082）；新疆师范大学校级教学研究与改革项目（SDJG2019-15）

**第一作者 First author，E-mail：1356163423@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：huhongxia111@126.com

收稿日期 Received：2020-02-21；接受日期 Accepted：2020-05-16

18S(0.395), which allows these genes to be ranked in order of stability as follows; *EF1* > *ACT* > *TUB* > *GAPDH* > *18S*. BestKeeper evaluates the expression stability of reference genes by calculating and comparing their variance, including their coefficient of variance (CV) and standard deviation (SD). This analysis indicated that all five genes were stable on the basis of having SD values < 1.0. However, with respect to CV values, the *ACT* gene was the most stable. **[Conclusion]** These results indicate that the best reference genes for *L. migratoria* infected with *P. locustae* are *ACT*、*EF1* and *TUB*.

Key words *Paranosema locustae*; *Locusta migratoria*; real-time PCR; reference genes; expression stability

蝗虫是一种世界性的农业重大害虫。目前空中喷药被视为是应对暴发性蝗灾最有效的方式，但是，此措施对环境以及蝗虫会产生的抗药性等都会带来不可避免的隐患（Tilman *et al.*，2017）。近年来，蝗灾治理主要采取化学防治和生物防治相结合的措施，包括人工招引粉红椋鸟、人工饲养牧鸡牧鸭、喷洒化学农药以及植物农药等（王晗等，2013）。虽然利用动物防治蝗虫已取得了较好的防治效果，但这种防治方法具有一定的局限性。微生物杀虫剂作为一种防治农林害虫的新技术手段，具有安全、有效和可持续性强等优点，在世界范围内受到广泛重视（Dakhel *et al.*，2019）。目前，应用于防治蝗虫的微生物制剂主要有绿僵菌和微孢子 2 种商业化的制剂（石旺鹏和谭树乾，2019）。蝗虫微孢子是 20 世纪 80 年代初期在美国成为第一个注册的生物制剂，并以商品化生产用于草原蝗虫的防治（Henry，1971；星学军，2018）。2005 年阿根廷学者证实了在首次施用微孢子虫 11 年后，蝗虫体内仍然能检测到大量孢子（Lange and Azzaro，2008）；2015 年对 10 年前施用过蝗虫微孢子治蝗的新疆哈密地区巴里坤北山的蝗虫样品进行了微孢子检测，检测结果为 23.3%的阳性（扈鸿霞等，2016），表明蝗虫微孢子在蝗虫种群中具有传播和流行能力。尽管微孢子是一种行之有效的生物治蝗制剂，但其与蝗虫相互作用机制并不清楚，而且微孢子与蝗虫处于共同进化的状态，只有明确微孢子治蝗机理，才能更有效和长久地使用它（Wey *et al.*，2020）。

对于病原与昆虫相互作用机制的研究，目前常用的策略就是探明他们相互作用的靶点以及调控机理（Hanson *et al.*，2019）。而这些病源关键基因功能的鉴定，离不开对基因表达的研究。目前，实时定量 PCR（Quantitative real time polymerase chain reaction，RT-qPCR）已成为研究相关基因表达时最为广泛使用且快速、便捷和准确的技术（Livak and Schmittgen，2001；Wang *et al.*，2014）。然而，要对靶基因的表达量进行准确地分析，受到从生物体中提取 RNA，然后 RNA 反转录成 cDNA 等步骤的影响（Aggarwal *et al.*，2018），为了准确估算目的基因的相对表达量，最通用的方法就是在实验过程中寻找一个能够起到标准化的参考基因作为内控（Ye *et al.*，2018）。因此，内参基因的选择就成为研究靶基因表达量的关键（Zhao *et al.*，2019）。理想的内参基因是不受试验条件的影响和调节都能够稳定表达，然而，在任何试验条件下都能恒定表达的内参基因是不存在的（Yang *et al.*，2014a）。目前，常用的内参基因有甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（Glyceralde-hyde-3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）、18s 核糖体 RNA（*18sRNA*）、微管蛋白基因（Tubulin，*TUB*）和肌动蛋白基因（Actin，*ACT*）（Nicot *et al.*，2005；Zhao *et al.*，2019）。尽管早期 Yang 等（2014b）在对东亚飞蝗发育不同阶段基因表达研究表明，延伸因子 1 基因（Elongation factor1，*EF1*）、热激蛋白 70（Heat shock protein70，*HSP70*）和核糖体蛋白基因（Ribosome protein L32，*RPL32*）是表达最稳定的基因。但是，对微孢子感染后的东亚飞蝗内参基因表达稳定性研究还未见报道。因此，本研究选取 5 个内参基因（*GAPDH*，*18S*，*TUB*，*ACT*，*EF1*），在 3 个不同浓度微孢子感染条件下，分析其表达稳定性。我们使用了 geNorm（Vandesompele *et al.*, 2002），NormFinder（Andersen *et al.*, 2004），和 BestKeeper（Pfaffl *et al.*, 2004）统计学软件来分析哪个内参基因是

在本试验条件下最为稳定的基因。此外，研究选取免疫相关基因双翅杀菌肽基因（Lm-diptericin，*LmDpt*）作为靶基因，分别与不同的内参基因进行相对定量来研究微孢子感染后蝗虫内参基因表达的稳定性。旨在为微孢子感染东亚飞蝗后相关基因表达水平的研究中选择内参基因提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试东亚飞蝗虫卵和微孢子虫均来源于中国农业大学植物保护学院昆虫生物防治实验室。将东亚飞蝗虫卵放置人工气候箱中孵化、饲养，温度设置为（26±2）℃，相对湿度为 50%±5%，光周期为 14L∶10D，约 15 d，孵化后按照常规方法及上述设置条件饲养至 3 龄，待用。

1.2 微孢子感染

配制浓度为 1×10^4、1×10^6 和 1×10^8 个孢子/头的微孢子溶液，采用逐头口服法感染 3 龄东亚飞蝗蝗蝻（扈鸿霞等，2014），并设置未感染的幼虫作为对照组。每个感染浓度设置 3 个生物学重复，每个重复选用 5 头蝗虫，感染后第 12 天收集感染蝗虫和对照组蝗虫，并放入液氮中 2 h 后，取出置于 - 80 ℃的冰箱中储存，待用。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取出 - 80 ℃冰箱储存的蝗虫，使用 RNeasy mini 试剂盒（Qiagen，Germany），依照说明书进行总 RNA 的提取。采用琼脂糖凝胶电泳以及 ND2000（Thermo Fisher，USA）测量吸光度值对 RNA 的完整性及纯度进行分析。

每个样品取 1 μg RNA，用 oligo dT15 和 M-MLV（Takara，Japan）对 RNA 进行反转录，合成 cDNA，保存在 - 20 ℃的冰箱，待用。

1.4 内参基因的选择以及引物设计

根据参考文献选择肌动蛋白 *β* 基因（*β-Actin*）、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶基因（*GAPDH*）、真核生物翻译起始因子 1α（*EIF1α*）、18S 核糖体 RNA（*18S*）和微管蛋白 α（*TUB*）5 个基因作为内参候选基因，东亚飞蝗双翅杀菌肽基因（*LmDpt*），利用 PrimerSelect 软件（DNASTAR，USA）设计荧光定量引物（表 1）。引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5 荧光定量 PCR

在 LightCycler96 荧光定量 PCR 仪（Roche，USA）上，采用 TB Green Premix Ex Taq II（Tli RNase H Plus）（Takara，Japan）进行荧光定量 PCR 反应。每个反应设置 3 个技术重复，每对引物设置一个阴性对照。采用三步法进行反应，程序如下：95 ℃预变性 10 s；95 ℃变性 5 s，62 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 15 s，40 个循环，并收集荧光信号。65 ℃到 95 ℃每隔 6 s 收集荧光信号绘制溶解曲线，根据融解曲线判断引物的特异性。此外，将 cDNA 模板进行 10 倍梯度稀释，根据荧光定量结果绘制各对引物的标准曲线，计算其扩增效率。

1.6 内参基因稳定性分析

对基因的表达稳定性分别采用 geNorm、NormFinder 和 Bestkeeper 软件进行分析。geNorm 和 NormFinder 软件对数据的分析需要先把各基因的 Cq 值转换为 $2^{-\Delta Cq}$ 然后进行计算。其中 $-\Delta Cq = Cq$（每个样品）$-$ Cq（最低样品）。而 Bestkeeper 软件只需要每个样品 Cq 值的平均值。geNorm 软件计算出的 M 值、NormFinder 软件计算出的 SV 值以及 NormFinder 软件计算出的 CV（变异系数）值和 SD（标准偏差）值越低，表示候选内参基因的表达越稳定。

1.7 *LmDpt* 基因相对表达量分析

利用表 1 中 *LmDpt* 基因的引物，对 *LmDpt* 基因进行相对定量分析。采用 SYBR Green 荧光定量的方法，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$（Livak）方法分别以 5 个内参基因为标准对其基因 mRNA 表达量分析。

表 1　扩增引物信息

Table 1　List of primers and their characteristics

基因 Gene	全称 Full name	引物序列 Primers sequence（5′-3′）	扩增长度 Amplication length (bp)	回归系数 （R^2） Regression coefficients	扩增效率 （%） Eficiencies	平均值 Mean Cq ± SD	变异系数 Coefficient of variation (CV%)	参考序列 Refrence gene number
GAPDH	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGAAATTGTTGAGGGATTGATGA CACTGGAACTCTGAAAGCCAT	208	0.99	95	16.56 ± 0.73	5.11%	JF915526
EF1	延伸因子 Elongation factor 1 alpha	GTGGGCCGAGTAGAAACAGG TGAATCACCAGCAACATAACCAC	198	0.99	116	14.90 ± 0.61	3.25%	AB583233
TUB	微管蛋白 Alpha-tubulin	CGAGCCATACAATTCCATCCTTAC GAAACTATCTGGCCAATCAACCTG	161	1.00	105	16.90 ± 0.60	9.28%	JN676091
ACT	肌动蛋白 *β*-Actin	CGAAACCTTTAATACCCCAG CCATCACCAGAATCCAACAC	113	0.99	108	18.21 ± 0.55	2.20%	KC118986
18S	18S 核糖体 RNA 18S ribosomal RNA	ATGCAAACAGAGTCCCGACCAGA CCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAA	185	0.99	105	11.45 ± 0.51	3.24%	AF370793
LmDpt	东亚飞蝗双翅杀菌肽 Lm-diptericin	GCGGTGCTCCTCGTCGTTCTGA TGGTCCTGCCGTCGTCGCTCTT	121	0.99	110			AB757753

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量检测

各样品 RNA 经 ND2000 检测，A_{260}/A_{280} 值都在 1.9-2.0 之间，A_{260}/A_{230} 值都在 2.0 左右。琼脂糖凝胶电泳结果带型清晰，表明 RNA 样品的纯度和完整性可以用于后续试验。

2.2 候选内参基因引物特异性和扩增效率分析

qPCR 结果表明，5 对内参基因引物的溶解曲线均有明显单一的一个峰（图 1），qPCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后，只有单一的符合目的片段大小的条带（图 2），说明引物能够特异地扩增出相应的内参基因。5 对内参基因的扩增效率为 95%-116%，回归系数 R^2 值均在 99%以上，说明各内参基因的引物可以作为后续对目的基因相对定量中使用。

2.3 候选内参基因表达谱分析

根据 5 个基因的箱形图看出（图 3），在不同浓度微孢子虫感染条件下 5 对基因的表达量 C_t 值的变化范围分别为 10.50-12.21（*18S*）、15.22-17.81（*GAPDH*）、15.82-17.82（*TUB*）、17.3-19.01（*ACT*）和 13.81-15.10（*EF1*），其中标准偏差值大小排序为 *GAPDH* > *EF1* > *TUB* > *ACT* > *18S*，基因表达最为稳定的为 *18S*，然后是 *ACT* 和 *TUB*。利用 GraphPad Prism 软件计算各候选内参基因的平均 Cq 值、标准差（Standard deviation，SD）和变异系数（Co-variance，CV）如表 2 所示，表达量最高的基因是 *18S*，平均 Cq 值为 11.45，表达量最低的基因是 *ACT*，平均

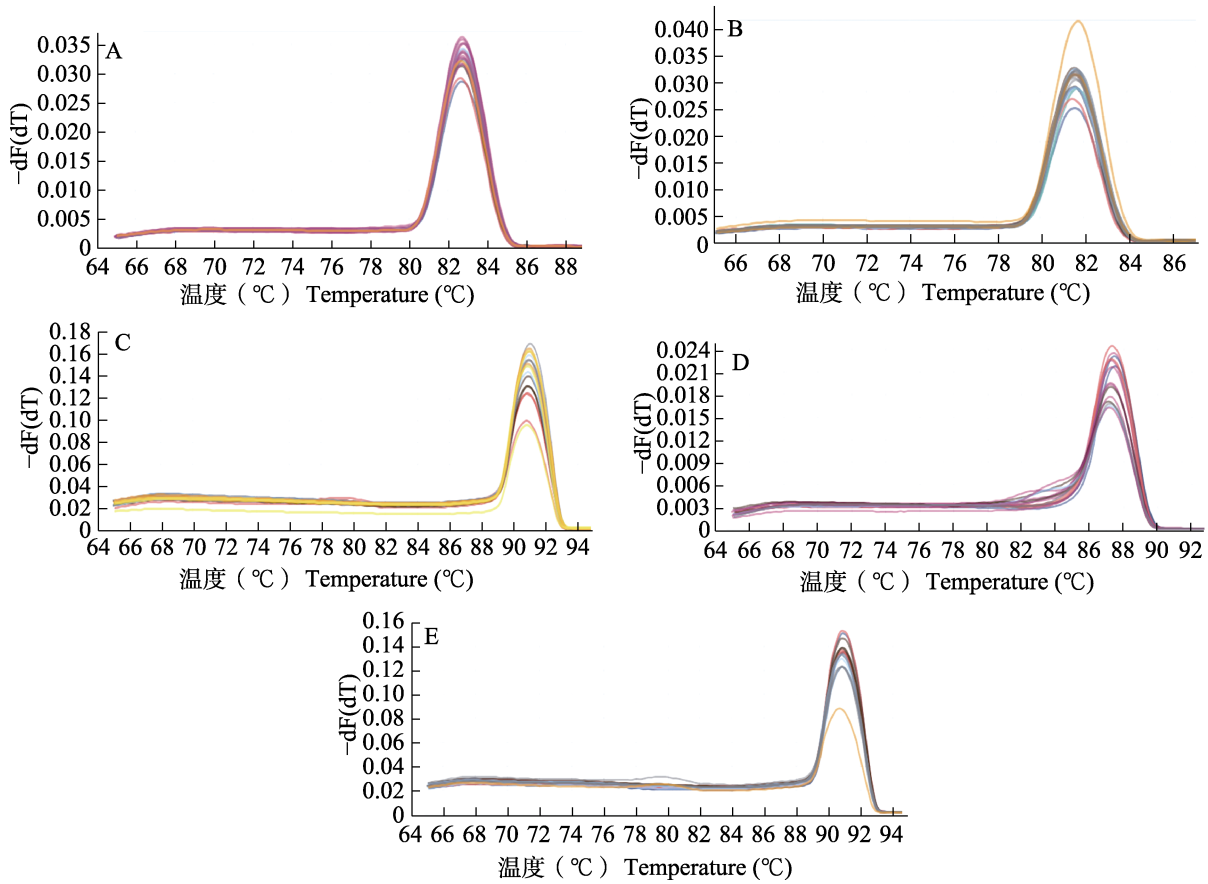

图 1 内参基因的溶解曲线（纵坐标为单位时间内的相对荧光强度：-dF/dT）

Fig. 1 Melting curves of reference genes

A. *18S* 基因；B. *ACT* 基因；C. *EF1* 基因；D. *GAPDH* 基因；E. *TUB* 基因。

A. Gene *18S*; B. Gene *ACT*; C. Gene *EF1*; D. Gene *GAPDH*; E. Gene *TUB*.

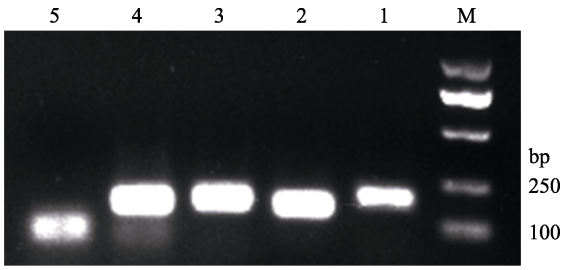

图 2　内参基因 Real-time PCR 结果电泳图

Fig. 2　Real-time PCR results for reference genes

M: DL 2000 DNA 标准分子量；1：*GAPDH*；2：*18S*；3：*EF1*；4：*TUB*；5：*ACT*。

M: DNA marker DL2000; 1: *GAPDH*; 2: *18S*; 3: *EF1*; 4: *TUB*; 5: *ACT*.

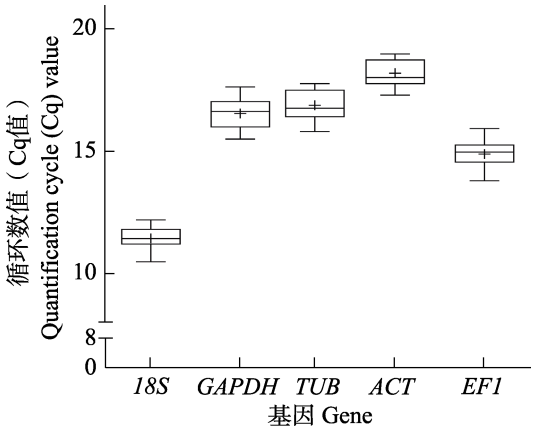

图 3　候选基因的箱式图 Cq 值分布图

Fig. 3　Distribution of the Cq values obtained for the five housekeeping genes in *Locusta migratoria* under different infection condition

方框由分别表示上下四分位数，中线表示中位数，须状线则表示最大及最小值，“+”表示平均值。

The boxes indicate the 25th to 75th percentiles. The horizontal lines dividing the boxes indicate the median values, while whiskers represent the maximum and the minimum values. The “+” symbols represent the means.

Cq 值为 18.21。根据 CV 值，可以初步判定，*GAPDH* 稳定性最差（4.43%），稳定性较好的基因为 *ACT*（3.01%）和 *TUB*（3.52%）。

2.4　获选内参基因稳定性分析

利用 geNorm 软件对 5 个内参基因在不同微孢子虫浓度感染下稳定性分析（图 4），M 值最高的为 0.658 4，最低的为 0.278 4，可知内参基因稳定性顺序为 *TUB* > *ACT* > *EF1* > *GAPDH* > *18S*。通过对 5 个内参基因在不同微孢子虫浓度感染下的 NormFinder 软件分析（图 5），可知 5 个内参基因稳定值分别为 0.152（*EF1*）、0.181

表 2　候选基因 Cq 值分析

Table 2　Analysis of values and expression of candidate reference genes

基因 Gene	循环数平均值 Mean quantification cycle (Cq)	标准差 SD	变异系数 Coefficient of variation (CV%)
GAPDH	16.56	0.733 3	4.43%
EF1	14.90	0.610 1	4.09%
TUB	16.90	0.595 5	3.52%
ACT	18.21	0.547 6	3.01%
18S	11.45	0.506 1	4.42%

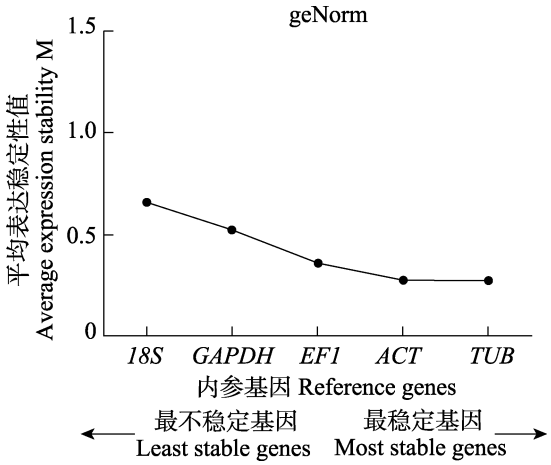

图 4　GeNorm 软件分析候选基因表达稳定性

Fig. 4　Evaluation of stability of candidate reference gene expression using geNorm software

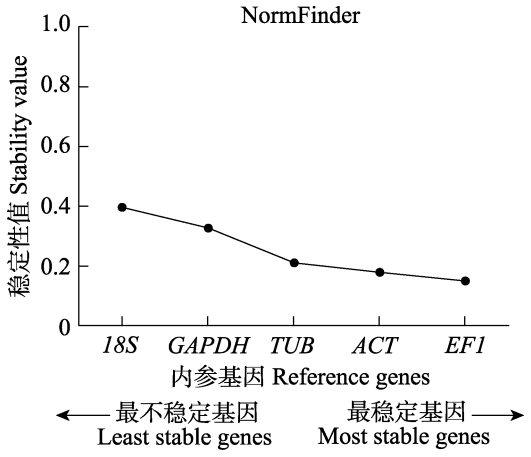

图 5　NormFinder 软件分析候选基因表达稳定性

Fig. 5　Evaluation of stability of candidate reference gene expression using NormFinder software

表 3 BestKeeper 软件分析结果
Table 3 BestKeeper analysis results

参数 Parameters	基因 Gene				
	EF1α	*TUB*	*18S*	*GAPDH*	*ACT*
几何平均数 Geometric mean	14.89	16.89	11.44	16.55	18.20
算术平均数 Arithmetic mean [Cq]	14.90	16.90	11.45	16.56	18.20
最小值 Min. [Cq]	13.81	15.82	10.50	15.22	17.30
最大值 Max. [Cq]	15.95	17.80	12.21	17.81	19.01
标准差 SD [± Cq]	0.47	0.50	0.40	0.59	0.49
变异系数 Coefficient of variation CV [% Cq]	3.14	2.97	3.46	3.57	2.69

（*ACT*）、0.212（*TUB*）、0.329（*GAPDH*）和 0.395（*18S*），可知内参基因稳定性顺序为 *EF1* > *ACT* > *TUB* > *GAPDH* > *18S*。由 BestKeeper 软件分析显示 5 个候选内参基因的 SD 值均小于 1.0，表达均较稳定（表 3）。根据其变异系数值 CV 的大小可知，*ACT* 基因最为稳定。综合 3 种软件分析结果，在不同微孢子虫浓度感染下较为稳定的内参基因是 *ACT*、*EF1* 和 *TUB* 基因。

2.5 *LmDpt* 基因相对表达量分析

荧光定量结果表明（图 6），选择不同的内参基因进行相对定量分析，*LmDpt* 基因表达的结果有明显不同。

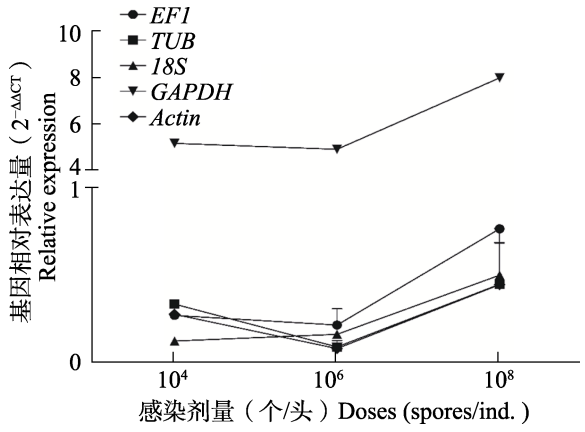

图 6 不同内参基因分析 *LmDpt* 基因表达量
Fig. 6 Relative quantification of *LmDpt* gene using various reference genes for normalization

3 讨论

荧光定量 PCR 作为一种非常有力的基因表达分析技术，荧光定量 PCR 已经被越来越多地应用在基因的功能分析方面（Pfaffl，2001）。而在不同的试验条件下，选择一个稳定的内参基因对于采用荧光定量 PCR 方法进行目标基因的相对定量又是必不可少的步骤（Zhao *et al.*，2019）。在不同的试验条件下，能够稳定表达的内参基因几乎是不存在的。在对蝗科昆虫内参基因的研究中发现，在低压缺氧的条件下，3 个经典的内参基因 *18S*，*GAPDH* 和 *β-actin* 的表达量是会受到其影响的，其中 *18S* 基因在所有样品中表达量最高，然后依次是 *GAPDH* 和 *β-actin* 基因。（Zhao *et al.*，2012）。在另外一项对于不同发育阶段蝗虫脑组织内参基因表达稳定性分析研究中发现，在成虫脑组织内，表达最稳定的基因是 *GAPDH*、*Ubi* 和 *EF1α*，但是在 5 龄蝗蝻脑组织中，表达最稳定的基因则是 *RP49*、*EF1α* 和 *ACT*（Van Hiel *et al.*，2009）。通过对 *LmDpt* 基因表达研究的结果也表明，不同的内参基因会导致靶基因的表达量不同。综上考虑，对在一定试验条件下内参基因的稳定性进行预分析，对于寻找合适的内参基因来说是非常必要的。

本研究在分析不同微孢子虫浓度感染下，选取了 5 个候选内参基因 *EF1α*、*ACT*、*TUB*、*GAPDH* 和 *18S*，并采用 geNorm、NormFinder 和 BestKeeper 3 种软件，对不同浓度微孢子感染的蝗虫的 5 个内参基因的表达稳定性进行计算分析。其中，*EF1α* 作为一种蛋白质合成延伸因子，常被用来作为昆虫的内参基因（Wang *et al.*，2018）。本研究通过 NormFinder 算法也显示出在

微孢子不同感染浓度条件下，*EF1α* 基因最为稳定。然而，通过 geNorm 算法分析结果却显示微管蛋白基因（*TUB*）的表达最为稳定。此外，通过这 2 种算法结果显示，肌动蛋白基因 *ACT* 的表达量稳定性均排在第 2。而通过 BestKeeper 软件分析的结果表明，*18S* 和 *EF1α* 基因的稳定性分别排在第 1 和第 2，*ACT* 基因则排在第 3。综合分析 3 种软件计算结果，*ACT* 基因和 *EF1α* 基因可以选择作为不同感染浓度条件下表达稳定的内参基因。考虑到当目的基因的表达变化较小时，如果内参基因的表达量过高，会导致无法检测到内参基因的微小变化（Yang *et al.*，2018）。本研究结果表明 *ACT* 基因的平均 Cq 值为 18.21 ± 0.55，而 *EF1α* 基因的平均 Cq 值仅为 14.90 ± 0.61（表 1）。综上所述，本研究认为 *ACT* 基因是不同浓度微孢子感染蝗虫后最为稳定的最佳选择内参基因。

参考文献 (References)

Aggarwal A, Jamwal M, Viswanathan GK, Sharma P, Sachdeva MS, Bansal D, Malhotra P, Das R, 2018. Optimal reference gene selection for expression studies in human reticulocytes. *J. Mol. Diagn*., 20(3): 326–333.

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 Res.,* 64(15): 5245–5250.

Dakhel WH, Latchininsky AV, Jaronski ST, 2019. Efficacy of two entomopathogenic fungi, *Metarhizium brunneum*, strain F52 alone and combined with *Paranosema locustae* against the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, under laboratory and greenhouse conditions. *Insects*, doi: 10. 3390/insects10040094.

Hanson MA, Lemaitre B, 2020. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Curr. Opin. Immunol.*, doi: 10. 1016/j. coi. 2019. 11. 008.

Henry JE, 1971. *Nosema cuneatum* sp. n. (Microsporida: Nosematidae) in grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *J. Invertebr. Pathol.*, 17(2): 164–171.

Hu HX, Ma YX, Wang YH, Lin J, Li ZW, Ji R, 2016. Establishment and application of nested-PCR method for detection of *Paranosema locustae*. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(21): 4239–4245. [扈鸿霞, 马宇轩, 王艳红, 林峻, 李占武, 季荣, 2016. 蝗虫微孢子虫套式 PCR 检测方法的建立及应用. 中国农业科学, 49(21): 4239–4245.]

Hu HX, Wang H, Shi WP, Yu F, Wang ZY, Ji R, 2014. Pathogenicity of nosema locustae to *Dociostaurus kraussi kraussi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(2): 490–495. [扈鸿霞, 王晗, 石旺鹏, 于非, 王志勇, 季荣, 2014. 蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 对红胫戟纹蝗 *Dociostaurus kraussi kraussi* 致病性及呼吸代谢的影响. 应用昆虫学报, 51(2): 490–495.]

Lange CE, Azzaro FG, 2008. New case of long-term persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) of Argentina. *J. Invertebr Pathol.,* 99(3): 357–359.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Method. Methods*, 25(4): 402–408.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D, 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.,* 56(421): 2907–2914.

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids. Res.,* 29(9): e45.

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. *Biotechnol. Lett.,* 26(6): 509–515.

Tilman D, Clark M, Williams DR, Kimmel K, Polasky S, Packer C, 2017. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature*, 546(7656): 73–81.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.,* doi: 10. 1186/gb-2002-3-7-research0034.

Van Hiel MB, Wielendaele PV, 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 Mol. Biol.,* doi: 10. 1186/1471-2199-10-56.

Wang H, Yu F, Wu Y, Ji R, 2013. Climatic evolution characteristics of a habitat for pink starlins in Xjinjiang in nearly 50 years. *Arid Land Geography*, 36: 601–608. [王晗, 于非, 吴烨, 季荣. 2013. 近 50a 新疆粉红椋鸟栖息地气候演变特征. 干旱区地理, 36: 601–608.]

Wang H, Fang Y, Wang L, Zhu W, Ji H, Xu S, Sima Y, 2014.

Transcriptome analysis of the *Bombyx mori* fat body after constant high temperature treatment shows differences between the sexes. *Mol. Biol. Rep.,* 41(9): 6039–6049.

Wang JJ, Han S, Yin W, Xia X, Liu C, 2018. Comparison of reliable reference genes following different hormone treatments by various algorithms for qRT-PCR analysis of metasequoia. *Int. J. Mol. Sci.,* doi: 10. 3390/ijms20010034.

Wey B, Heavner ME, Wittmeyer KT, Briese T, Hopper KR, Govind S, 2020. Immune suppressive extracellular vesicle proteins of *Leptopilina heterotoma* are encoded in the wasp genome. *G3* (*Bethesda*), 10(1): 1–12.

Shi WP, Tan SQ, 2019. Current status and trend on grasshopper and locust biological control. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(3): 307–324. [石旺鹏, 谭树乾, 2019. 蝗虫生物防治发展现状及趋势. 中国生物防治学报, 35(3): 307–324.]

Xin XJ, 2018. Grasshopper control by combined appliction of *Paranosema locustae* and an insect growth regulator in rangelands. *Acta Agrestia Sinica*, 26(1): 184–188. [星学军, 2018. 蝗虫微孢子与昆虫生长调节剂协同控制草原蝗虫作用机制. 草地学报, 26(1): 184–188.]

Yang Q, Li Z, Cao J, Zhang S, Zhang H, Wu X, Zhang Q, Liu X, 2014a. Selection and assessment of reference genes for quantitative PCR normalization in migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *PLoS ONE*, 9(6): e98164.

Yang Q, Yin J, Li G, Qi L, Yang F, Wang R, 2014b. Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. *Mol. Biol. Rep.,* 41(4): 2325–2334.

Yang X, Pan H, Yuan L, Zhou X, 2018. Reference gene selection for RT-qPCR analysis in *Harmonia axyridis*, a global invasive lady beetle. *Sci. Rep.,* 8: 2689.

Ye J, Jin CF, Li N, Liu MH, Fei ZX, Dong LZ, Li L, Li ZQ, 2018. Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalisation under different experimental conditions in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Scientific Reports*, 8: 15043.

Zhao DJ, Guo K, Kang L, 2012. Identification of condition-specific reference genes from microarray data for locusts exposed to hypobaric hypoxia. *FEBS Open Bio*, 2: 235–240.

Zhao ZJ, Wang LM, Yue DM, Ye B, Li BB, Zhang B, Fan Q, 2019. Evaluation of reference genes for normalization of RT-qPCR gene expression data for *Trichoplusia ni* cells during *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) multicapsid nucleopolyhedrovirus (AnpeNPV) infection. *J. Insect. Sci.*, doi: 10. 1093/jisesa/iey133.

****

封面介绍

拖鞋肋园蛛 *Alenatea touxie* Song *et* Zhu

蜘蛛是节肢动物门 Arthropoda 蛛形纲 Arachnida 蜘蛛目 Araneae)种的通称。《应用昆虫学报》不仅发表昆虫（节肢动物门的昆虫纲 Insecta）的各类研究成果，同时也从广义角度关注蜘蛛等相关研究成果的报道，同时很多蜘蛛是昆虫的天敌。本期封面照片提供了拖鞋肋园蛛 *Alenatea touxie* Song *et* Zhu（园蛛科 Araneidae，李枢强鉴定物种名称，张润志拍摄照片）的皮蜕和蜘蛛，2020 年 9 月 27 日拍摄于北京农业展览馆院内。蜘蛛在发育过程中，在激素的作用下，要经历多次蜕皮才能慢慢长大。蜘蛛蜕去旧皮之前就长出了新的上表皮，蜕皮的时候通常仰卧，背部的外骨骼开裂，蜘蛛用足把旧表皮蹬掉并从中爬出，就想挣脱了外衣。蜕皮后的蜘蛛爬走后，留下一个美丽的皮蜕。

（张润志，中国科学院动物研究所）