

近零磁场下粘虫雌蛾内参基因 转录表达稳定性评价*

闫蒙蒙** 张 蕾 程云霞 江幸福***

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘 要 【目的】筛选近零磁场下粘虫 *Mythimna separata* 雌蛾内稳定表达的内参基因, 为在近零磁场下的粘虫靶标基因表达的定量分析准确性提供依据。【方法】利用亥姆霍兹线圈产生近零磁场, 分别在近零磁场 (<500 nT) 和地磁场 (约 50 μ T) 2 种磁场强度下饲养粘虫。采用 qRT-PCR 技术测定 2 种磁场强度下饲养的粘虫初羽化雌蛾 10 种内参基因: β -肌动蛋白 (β -Actin)、 β -微管蛋白 (β -TUB)、TATA 盒结合蛋白 (*TBP*)、延伸因子 (*EF-1 α*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、18S 核糖体 RNA (*18S rRNA*)、28S 核糖体 RNA (*28S rRNA*)、cGMP 依赖性蛋白激酶 (*PKG*)、核糖体蛋白 L12 (*RPL12*) 和腺苷三磷酸酶 (*ATPase*) 的定量表达, 利用 geNorm、NormFinder、BestKeeper 以及在线综合分析系统 RefFinder 内参筛选分析软件分别对 2 种磁场强度下粘虫的内参基因稳定性进行评估筛选。【结果】 β -Actin 和 *18S rRNA* 的稳定性在 NormFinder 结果中居于前两位, geNorm 和 BestKeeper 结果中 β -Actin 和 *PKG* 基因稳定性最好, RefFinder 综合分析表明, β -Actin 稳定性最好, 其次为 *18S rRNA* 和 *PKG* 基因, β -TUB 和 *TBP* 的表达稳定性在三个软件分析结果中都较差。geNorm 软件进一步对内参基因的分析表明引入 β -Actin 和 *18S rRNA* 两个内参基因最佳。【结论】明确了近零磁场强度下适用于粘虫初羽化雌蛾稳定表达的内参基因, 确保了近零磁场下粘虫靶标基因转录表达水平的准确测定, 为粘虫磁感受分子机制研究提供了重要工具。

关键词 近零磁场; 地磁场; 粘虫; 内参基因; 实时荧光定量 PCR

Evaluation of the stability of reference genes in adult female *Mythimna separata* under a near-zero magnetic field

YAN Meng-Meng** ZHANG Lei CHENG Yun-Xia JIANG Xing-Fu***

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract 【Objectives】To identify a stable reference gene in adult *Mythimna separata* under a near-zero magnetic field in order to provide a way of assessing the accuracy of quantitative analysis of target gene expression in this species. 【Methods】*M. separata* were raised under a near-zero magnetic field generated by a Helmholtz coil, with a control group raised under a geomagnetic field. 10 reference genes were chosen and evaluated, including β -actin (β -Actin), β -tubulin (β -TUB), TATA box binding protein (*TBP*), elongation factor (*EF-1 α*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 18S RNA ribosome (*18S rRNA*), 28S ribosome RNA (*28S rRNA*), cGMP-dependent protein kinase (*PKG*), ribosomal protein L12 (*RPL12*) and adenosine triphosphatase (*ATPase*). RT-PCR technology was used to determine the expression level of these genes in newly emerged females raised under either the near-zero magnetic, or geomagnetic, fields, and four reference screening analysis software packages, geNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder, were used to evaluate the stability of reference genes in

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31672019, 31871951); 国家绿肥产业技术体系 (CARS-22); 国家重点研发计划 (2017YFD0201701, 2017YFD0201802)

**第一作者 First author, E-mail: 912692093@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xfjiang@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2020-08-12; 接受日期 Accepted: 2020-12-31

each group. **[Results]** β -Actin and 18S were ranked the most stable by NormFinder, and β -Actin and PKG by geNorm and BestKeeper. RefFinder analysis indicates that the most stable internal reference genes under the two different magnetic field treatments were the β -Actin, 18S and the PKG, genes. β -TUB and TBP were the most unstable expression reference genes. Further analysis using geNorm software indicates that it is best to use two reference genes. **[Conclusion]** The most stable reference genes for adult female *M. separata* under different magnetic field intensities were identified, providing a foundation for the accurate quantification of the transcription of key genes involved in the magnetic reception mechanism in this species.

Key words near-zero magnetic field; geomagnetic field; *Mythimna separata*; reference gene; quantitative real-time PCR

选择合适的内参基因对评估靶标基因的准确性至关重要,理想的内参基因通常选择在不同实验条件下、不同组织和细胞内均稳定表达的基因 (Su *et al.*, 2013)。最近的研究表明,内参基因在不同的生物条件(如不同的昆虫组织和发育阶段)和非生物条件(如温度、农药、光周期)下具有可变的表达水平 (Selvey *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010; Bansal *et al.*, 2015)。选择未经验证的内参基因,可能会掩盖目的基因的实际差异表达,给实验结果带来偏差 (Huggett *et al.*, 2005)。大量研究表明,即使在单个物种中,也没有单个“通用”内参基因可用于多种实验条件 (Andersen *et al.*, 2004; Silver *et al.*, 2006)。内参基因选择是否合适,直接关系到基因转录表达定量结果的准确性。因此,选择合适的内参基因对确保基因转录水平表达的准确测定具有重要意义。目前,关于磁场变化的研究中, Wan 等 (2014, 2015) 在近零磁场下稻飞虱的研究中选用 *ACT1* 和 *Ribosomal proteinL9* (*RPL9*) 做为内参基因。刘凡奇等 (2019) 对近零磁场下初羽化灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的内参基因的筛选结果表明:雌成虫中 *EF-1 α* 和 *RPL9* 表达较为稳定, *α 2TUB* 和 *RPL9* 在雄成虫中表达最稳定;在中等磁场强度下对人成骨细胞的研究中, Cunha 等 (2012) 选用 *GAPDH* 作为内参基因。生物对强磁场和弱磁场的磁感受机制可能不同,近零磁场等弱磁场可能与动物的磁定向等行为的磁感受机制有关 (贺静澜等, 2018), 因此有必要筛选出近零磁场作为磁场强度变化处理下的稳定表达内参基因,为后续磁感受机制研究提供有效工具。

粘虫 *Mythimna separata* 是我国重要的农业害虫之一,每年在我国南北往返季节性迁飞 (李

光博, 1993; 江幸福等, 2014), 其迁飞过程中, 不仅湿度和温度在逐渐变化, 地磁场强度和方向也在不断变化, 地磁场强度从磁赤道的约 25 μ T 向磁两极逐渐递增至约 65 μ T, 不同强度的磁场可依据强度范围划分为弱磁场 (<1 mT)、中等强度磁场 (1 mT-1 T) 和强磁场 (>1 T) (Finlay *et al.*, 2010)。目前,有关磁场强度的变化对粘虫的影响研究较少,高月波等 (2014) 及王伟弘等 (2018) 研究表明近零磁场和强磁场下粘虫的共同定向行为均消失;野外不同地理种群粘虫定向方向也不同,表明粘虫最可能根据地磁场进行定位 (Xu *et al.*, 2017)。磁场变化不仅会影响昆虫的定向行为,还会对昆虫生长发育产生影响,如磁场强度的降低会延长棉铃虫和褐飞虱生长发育历期,降低褐飞虱产卵量,影响飞虱翅型分化等 (董兆克和戈峰, 2013; Wan *et al.*, 2014)。生物的磁感受机制是当前生物磁学的研究热点之一,基因表达分析在昆虫磁感受机理的研究中具有重要的作用,而评估筛选在不同磁场强度下稳定表达的内参基因对于相关研究中靶标基因的准确定量至关重要。因此,本研究选择常见的内参基因 β -肌动蛋白 (β -Actin)、 β -微管蛋白 (β -TUB)、TATA 盒结合蛋白 (*TBP*)、延伸因子 (*EF-1 α*)、油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、18S 核糖体 RNA (*18S rRNA*)、28S 核糖体 RNA (*28S rRNA*)、cGMP 依赖性蛋白激酶 (*PKG*)、核糖体蛋白 L12 (*RPL12*) 和腺苷三磷酸酶 (*ATPase*) 作为候选基因,以近零磁场 (<500 nT) 为处理磁场强度,地磁场为对照磁场强度,考察不同磁场强度下粘虫初羽化雌蛾待测内参基因转录表达的稳定性,为粘虫磁感受关键基因及信号通路的精准分析提供了有力工具。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本实验所用昆虫为室内连续繁殖多代的粘虫, 饲养密度为 10 头/瓶(直径 9 cm, 高 13 cm), 饲养环境温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $70\% \pm 10\%$, 光周期 L:D=14:10, 用人工饲料喂养至幼虫老熟后, 将其放入含水量为 10%-15% 的土中化蛹。待成虫羽化后单头放置在养虫罩(直径 9 cm, 高 21 cm)中饲养, 并饲喂 5% 的蜂蜜水。

1.2 实验装置

磁场发生装置为方形三维亥姆霍兹线圈(中国科学院电工所制), 线框直径为 1 m, 通过调节直流电流可在线圈中心区域(20 cm×20 cm×20 cm)内产生低于 500 nT 的磁场。两个磁场发生装置放置在同一房间(间隔 3 m, 两个线圈互不干扰), 分别用于产生近零磁场和假暴露以避免实验装置带来的误差。粘虫自卵期开始置于亥姆霍兹线圈中饲养, 每次实验前及实验过程中均使用磁强计(CH-330F, 精度 ± 10 nT, 北京翠海科技有限公司)进行监测和校准。

1.3 粘虫 RNA 提取

取近零磁场和正常磁场下生长的初羽化雌

蛾, 放入编号的离心管中, 每个处理取 5 头雌蛾, 每头雌蛾为一个生物学重复, 液氮中速冻后, 放入 -80°C 冰箱待用。采用 Trizol 法提取样品总 RNA, 利用 NanoDrop2000 检测粘虫总 RNA 的浓度与质量, 若 $\text{OD}_{260/230}$ 与 $\text{OD}_{260/280}$ 在 1.8-2.4 和 1.8-2.0 之间说明所提取的总 RNA 的质量较好, 可以满足后续实验要求。将样品 RNA 浓度定量至 $1\,000\text{ ng}/\mu\text{L}$, 此外, 使用 1.5% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。cDNA 的合成使用 Fast Quant RT Kit 反转录试剂盒(天根)完成。

1.4 粘虫 RT-PCR 分析

利用 Beacon Designer 软件设计引物(Bustin, 2002), 对粘虫内参基因: β -肌动蛋白($\beta\text{-Actin}$)、 β -微管蛋白($\beta\text{-TUB}$)、TATA 盒结合蛋白(TBP)、延伸因子($EF\text{-}1\alpha$)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶($GAPDH$)、18S 核糖体 RNA($18S\text{ rRNA}$)、28S 核糖体 RNA($28S\text{ rRNA}$)、cGMP 依赖性蛋白激酶(PKG)、核糖体蛋白 L12($RPL12$)和腺苷三磷酸酶($ATPase$)进行引物设计。引物的合成由上海生物工程有限公司完成。选择 PCR 扩增效率在 90%-120% 之间的引物序列进行后续实验, 最后用于稳定性评价的内参基因序列如表 1 所示。荧光定量 PCR 采用 20 μL 体系, 反应过程: 35 个循环, 在 95°C 下

表 1 内参基因引物序列信息
Table 1 Primer sequences of reference genes

内参基因 Reference gene	正向引物 5'-3' Forward primer	反向引物 5'-3' Reverse primer
<i>Actin</i>	AACCTCCCGACGGTCAAGTCAT	TGTTGGCGTACAAGTCCTTACG
<i>EF1α</i>	AAGAAATCTGCCCGCGGTAT	TGCGGTTTAGCGATGGAAGT
<i>18S rRNA</i>	GGAAGGATTGACAGATTAACA	GCTCCACCAACTAAGAAC
<i>28S rRNA</i>	GCAGCGGAACCGTTTCAATA	ATGGAACCTCGAACGCTCAGG
$\beta\text{-TUB}$	CTCGCTGAAGAAGGTGTTGAA	CGGTAATGCCTGCTGGGAA
<i>TBP</i>	GGCACTACAACAAGCACATGG	CTCGTGCCGTACCATTCTG
<i>GAPDH</i>	AAAATCTCCGTCCTCTCCGA	ACCTTCTTGGCACCACCCT
<i>PKG</i>	TTACCGGCTCACCACCTTTC	CTCTGTGATGCCACCTCGTT
<i>RPL12</i>	ACGTTTGATTGCAGTTCGCC	TTAGGCGGCATTGTGCTGTA
<i>ATPase</i>	ACCTGCTTGTTATGATTGAT	TTCCAGTCCTACCTTCAC

变性 15 s, 在退火温度 60 °C 下变性 30 s, 在 72 °C 下延长 30 s。绘制熔解曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。上述反应在 Bio-Rad 仪器上进行。每次均在同一 96 孔反应板上进行, 每一个反应技术重复 3 次。

1.5 数据分析

所有数据使用基于 Excel 的 geNorm、NormFinder、BestKeeper 软件及在线分析软件 RefFinder 进行分析。使用 GeNorm 分析时, 将原始数据进行转化, 设定样本中某一内参基因 Ct 值最小者的相对表达量为 1, 其他样本内参基因的相对表达量则为 $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt =各样本 Ct 值-最小 Ct 值), 通过这些数据输入到 geNorm 程序中计算候选内参基因表达稳定度的平均平均值 M, 对内参基因的表达稳定度进行排序 (M 值越小, 表达越稳定), 程序默认设定当 $M > 1.5$ 时, 该基因不适合作为内参。geNorm 程序还能通过内参基因标准化因子配对变异分析 $V_{n/n+1}$ 来评估该实验条件下基因表达研究所需的最适内参基因数量, 程序以 0.15 为默认取舍值, 即当 $V_{n/n+1} < 0.15$ 时, 则最适内参基因的数量是 n 个; 而如果 $V_{n/n+1} > 0.15$, 则最适内参基因的数量是 $n+1$ 个, 其中 n 表示内参基因的数量 (Vandesompele *et al.*, 2002)。

2 结果与分析

2.1 粘虫候选内参基因表达水平

10 个候选内参基因在粘虫雌蛾体内的表达水平如图 1 所示。粘虫蛾中内参基因 28S rRNA 的 CT 值最小, 平均值为 9.5, 表明 28S rRNA 在是 10 个候选内参基因中雌蛾体内表达量最高的基因; 内参基因 TBP 的 CT 值最大为 22.7, 表明 TBP 是 10 个候选的内参基因中表达量最低的基因。从 CT 值看, 内参基因 β -TUB 的 TBP 的 CT 值标准差最大, 变化量较大, β -Actin、PKG 和 18S rRNA 的 CT 值变化量最小。

2.2 近零磁场下粘虫内参基因稳定性表达分析

利用 geNorm、NormFinder 和 RefFinder 对

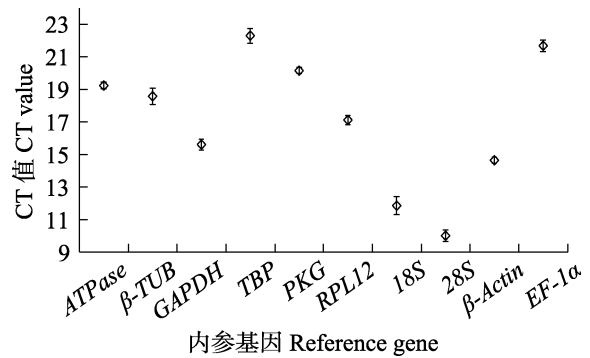


图 1 粘虫初羽化雌蛾中 10 个候选内参基因的表达水平
Fig. 1 Transcript expression levels of eleven candidate reference genes in male adults of *Mythimna separata*

β -Actin: β -肌动蛋白; β -TUB: β -微管蛋白; TBP: TATA 盒结合蛋白; EF-1a: 延伸因子; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 18S: 18S 核糖体 rRNA; 28S: 28S 核糖体 RNA; PKG: cGMP 依赖性蛋白激酶; RPL12: 核糖体蛋白 L12; ATPase: 腺苷三磷酸酶。
 β -Actin: β -Actin; β -TUB: β -tubulin; TBP: TATA box binding protein; EF-1a: Elongation factor 1 alpha; GAPDH: Olealdehyde-3-phosphate dehydrogenase; 18S: 18S ribosome rRNA; 28S: 28S ribosome RNA; PKG: cGMP-dependent protein kinase, RPL12: Ribosomal protein L12; ATPase: Adenosine triphosphatase.

粘虫雌虫 10 个候选内参基因稳定性分析结果如表 2 所示 β -Actin 和 18S rRNA 的稳定性在 NormFinder 结果中居于前两位, geNorm 和 BestKeeper 结果中 β -Actin 和 PKG 基因稳定性最好, 总体分析结果表明, 不同磁场下粘虫雌蛾中稳定性好的内参基因为 β -Actin 和 18S rRNA, β -TUB 和 TBP 的表达稳定性较差。

采用 geNorm 软件进一步对内参基因进行分析, 找出引入内参基因的最佳数量 (图 2), $V_{2/3}$ 为 0.063, 小于 0.15, 故在后续实验中使用两个内参基因即可。后续对粘虫雌蛾进行 qRT-PCR 反应时, 引入 β -Actin 和 18S rRNA 这两个内参基因。

3 讨论

目前, 基因转录表达分析是生物各领域研究中的常用技术手段, 而生物基因转录表达水平受多种因素影响, 引入合适的内参基因对实验结果进行标准化校正具有重要意义。内参基因表达水平因环境条件不同而变化, 不同组织、性别、温

表 2 利用 geNorm, BestKeeper, NormFinder 和 RefFinder 分析粘虫雌成虫中各内参基因稳定性
Table 2 The expression stability of the candidate reference genes in female adults of *Mythimna separata* by geNorm, BestKeeper, NormFinder and RefFinder

排名 Rank	geNorm		Normfinder		BestKeeper		RefFinder	
	基因 Gene	稳定值 Stability value	基因 Gene	稳定值 Stability value	基因 Gene	标准偏差 Standard deviation	基因 Gene	稳定值 Stability value
1	<i>PKG</i>	0.260	<i>18S</i>	0.178	<i>β-Actin</i>	0.144	<i>β-Actin</i>	1.41
2	<i>β-Actin</i>	0.260	<i>β-Actin</i>	0.183	<i>PKG</i>	0.158	<i>18S</i>	2.00
3	<i>ATPase</i>	0.276	<i>ATPase</i>	0.220	<i>RPL12</i>	0.177	<i>PKG</i>	2.51
4	<i>18S</i>	0.287	<i>EF-1α</i>	0.253	<i>18S</i>	0.180	<i>ATPase</i>	3.41
5	<i>28S</i>	0.305	<i>PKG</i>	0.261	<i>ATPase</i>	1.189	<i>RPL12</i>	5.05
6	<i>RPL12</i>	0.321	<i>RPL12</i>	0.286	<i>GAPDH</i>	0.250	<i>EF-1α</i>	5.79
7	<i>EF-1α</i>	0.336	<i>28S</i>	0.302	<i>28S</i>	0.262	<i>28S</i>	6.44
8	<i>GAPDH</i>	0.358	<i>GAPDH</i>	0.347	<i>EF-1α</i>	0.302	<i>GAPDH</i>	7.44
9	<i>β-TUB</i>	0.382	<i>β-TUB</i>	0.377	<i>β-TUB</i>	0.381	<i>β-TUB</i>	9.00
10	<i>TBP</i>	0.401	<i>TBP</i>	0.394	<i>TBP</i>	0.403	<i>TBP</i>	10.00

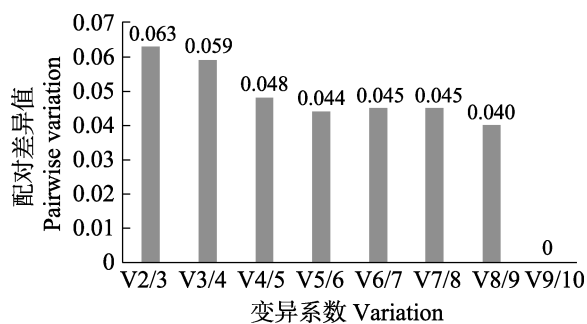


图 2 利用 geNorm 软件分析候选内参基因的配对差异值 (V)

Fig. 2 Average pairwise variation (V) analysis of candidate reference genes by geNorm

度、湿度及病毒等胁迫处理下的内参基因表达也会产生一定的差异 (史彩华和张友军, 2016)。RPS18 和 α -TUB 在朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 不同发育历期表达量稳定, 可作为理想的内参基因; GAPDH 和 UCCR 在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 不同发育历期表达稳定 (Lu et al., 2013); 在金纹细蛾 *Phyllonorycter Ringoniell* 中, β -TUB 和 β -Actin 可作为各个虫态的内参基因 (郭长宁, 2014); α -TUB 和 ACTIN2 在不同性别桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的中肠和马氏管中可稳定表达, α -TUB 和 ACTIN1 在桔小实蝇脂肪体中转录水平稳定 (Shen et al.,

2010)。杨丽红 (2011) 发现柑橘全爪螨 *Panonychus citri* (McGregor) 雌成螨中 α -TUB 和 *PcRpII* 的转录水平在受温度胁迫影响最小; *Actin* 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 不同发育阶段转录水平稳定, *EF-1 α* 在 Bt 毒素处理下变化较小 (符伟等, 2012)。Li 等 (2018) 对不同发育阶段以及不同环境条件下粘虫的内参基因进行筛选, 结果表明, *ACTIN*, *EF1- α* 和 *TUB* 在粘虫不同的发育阶段表达量相对稳定; *TUB*, *RPS13* 和 *EF1- α* 不同的组织中转录水平最稳定; *RPS13* 和 *18S rRNA* 是高温条件下的最佳参考基因; *TUB*、*RPS13* 和 *RPS7* 在幼虫不同密度下表达量最稳定; *RPS7*、*EF1- α* 、*RPL32* 和 *GAPDH* 是农药胁迫下理想的内参基因。除不同虫态、组织、温度、不同品系、地理种群和农药等处理会对昆虫的内参基因的表达产生影响外, 取食不同食物、光周期和机械损伤等都会对昆虫体内“管家基因”的表达水平产生一定影响 (史彩华和张友军, 2016), 因此, 在进行基因表达分析实验前, 要根据实际实验条件筛选稳定表达的内参基因, 不应盲目借鉴。

刘凡奇等 (2019) 对近零磁场下灰飞虱的内参基因筛选中, *EF-1 α* 和 *RPL9* 在短翅雌成虫表达最稳定, 短翅雄成虫中 α 2TUB 稳定性最好,

其次为 *RPL9*, 表明内参基因的稳定性可因性别而异, 而本研究结果中, 近零磁场下粘虫雌蛾中 *18S rRNA* 和 β -*Actin* 表达最稳定, 表明这可能是由于不同物种对近零磁场的响应存在特异性差异。 β -*TUB* 在近零磁场下粘虫雌蛾表达稳定性较差, 表明微管蛋白基因可能对磁场强度的变化更为敏感, 这可能与近零磁场下微管蛋白构象无序变化, 组装紊乱有关 (Wang *et al.*, 2008)。Mo 等 (2016) 利用细胞系开展磁场强度变化磁响应研究表明, 屏蔽地磁场会改变人神经母瘤细胞肌动蛋白(Actin)的组装, 从而可能影响参与 Actin 蛋白表达调控的相关基因, 而在本研究中, β -*Actin* 在粘虫雌蛾中表达最稳定, 受到近零磁场影响较小, 可能由于细胞系和活体动物内细胞外环境存在较大差异导致。本研究仅评价了近零磁场下初羽化粘虫雌蛾内参基因稳定性, 未对近零磁场下粘虫幼虫及雄蛾的内参基因进行评价, 且研究仅涉及了近零磁场, 此结果是否同样适用于其他磁场强度下仍需进一步验证。

参考文献 (References)

- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft 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.
- Bansal R, Mittapelly P, Cassone BJ, Mamidala P, Redinbaugh MG, Michel A, 2015. Recommended reference genes for quantitative PCR analysis in soybean have variable stabilities during diverse biotic stresses. *PLoS ONE*, 10(8): e0134890.
- Bustin SA, 2002. Quantification of mRNA using real-time reversetranscription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Molecular Endocrinology*, 29(1): 23–39.
- Cunha C, Panseri S, Marcacci M, Tampieri A, 2012. Evaluation of the effects of a moderate intensity static magnetic field application on human osteoblast-like cells. *American Journal of Biomedical Engineering*, 2(6): 263–268.
- Dong ZK, Ge F, 2013. Effects of magnetic field on the development and reproduction of cotton bollworm *Helicoverpa armiger* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Journal of Ecology*, 32(5): 1265–1268. [董兆克, 戈峰, 2013. 磁场对棉铃虫生长发育及繁殖的影响. 生态学杂志, 32(5): 1265–1268.]
- Finlay CC, Maus S, Beggan CD, Bondar TN, Chambodut A, Chernova TA, Chulliat A, Golovkov VP, Hamilton B, Hamoudi M, Holme R, Hulot G, Kuang W, Langlais B, Lesur V, Lowers FJ, Lühr H, Macmillan S, Mande M, McLean S, Manoj C, Menvielle M, Michaelis I, Olsen N, Rauberg J, Rother M, Sabaka TJ, Tangborn A, Tøffner-Clausen L, Thébault E, Thomson AWP, Wardinski I, Wei Z, Zvereva TI, 2010. International geomagnetic reference field: The eleventh generation. *Geophysical Journal International*, 183(3): 1216–1230.
- Fu W, Xie W, Zhang Z, Wu QJ, Wang SL, Zhang YJ, 2012. Selection of valid reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) after exposure to Bt toxin. *Acta Entomologica Sinica*, 55(12): 1406–1412. [符伟, 谢文, 张卓, 吴青君, 王少丽, 张友军, 2012. Bt 毒素诱导下小菜蛾实时定量 PCR 内参基因的筛选. 昆虫学报, 55(12): 1406–1412.]
- Gao YB, Hu Gao, Zhai BP, 2014. The effect of converted magnetic fields on orientation behavior of armyworm moths *Mythimna separata* (Walker). *Journal of Applied Entomology*, 51(4): 899–905. [高月波, 胡高, 翟保平, 2014. 磁场变化对粘虫飞行定向行为的影响. 应用昆虫学报, 51(4): 899–905.]
- Guo CN, 2014. Cloning and stability analysis of reference gene from *Phyllonorycter ringoniell*. Master dissertation. Shaanxi: Northwest A&F University. [郭长宁, 2014. 金纹细蛾内参基因克隆分析及稳定性评价. 硕士学位论文. 陕西: 西北农林科技大学.]
- He JL, Wan GJ, Zhang M, Pan WD, Chen FJ, 2018. Progress in the study of geomagnetic response of organisms. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 45(7): 689–704. [贺静澜, 万贵钧, 张明, 潘卫东, 陈法军, 2018. 生物地磁响应研究进展. 生物化学与生物物理进展, 45(7): 689–704.]
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations. *Genes Immunity*, 6(4): 279–284.
- Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014. Novel features, occurrence trends and economic impact of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Journal of Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444–1449.]
- Li GB, 1993. General situation and main progress of the oriental armyworm (*Mythimna separata*) research in China. *Plant Protection*, 19(4): 2–4. [李光博, 1993. 我国粘虫研究概况及主要进展. 植物保护, 19(4): 2–4.]
- Li HB, Dai CG, Zhang CR, He YF, Ranh Y, Chen SH, 2018. Screening potential reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the oriental armyworm, *Mythimna separata*.

- PLoS ONE*, 13(4): e0195096.
- Liu FQ, Wan GJ, Zeng LY, Li CX, Pan WD, Chen FJ, 2019. Selection of stable internal reference genes for transcript expression analyses in *Laodelphax striatellus* under near-zero magnetic field. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(19): 3346–3356. [刘凡奇, 万贵钧, 曾路影, 李春绪, 潘卫东, 陈法军, 2019. 近零磁场下灰飞虱转录表达分析稳定性内参基因筛选. 中国农业科学, 52(19): 3346–3356.]
- Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Wan H, Li J, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.
- Mo WC, Zhang ZJ, Wang DL, Liu Y, Bartlett PF, He RQ, 2016. Shielding of the geomagnetic field alters actin assembly and inhibits cell motility in human neuroblastoma cells. *Scientific Reports*, 6: 22624.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR, 2001. β -ACT—an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol. Cell. Probes*, 15(5): 307–311.
- 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 Molecule Biology*, 11(1): 76.
- Shi CH, Zhang YJ, 2016. Advances in reference gene for real-time quantitative reverse transcription PCR(qRT-PCR) of insects research. *Journal of Applied Entomology*, 53(2): 237–246. [史彩华, 张友军, 2016. 内参基因在昆虫实时荧光定量 PCR 中的研究进展. 应用昆虫学报, 53(2): 237–246.]
- 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 Mol. Biol.*, 7(1): 33.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Wan GJ, Jiang SL, Zhao ZC, Xu JJ, Tao XR, Sword GA, Gao YB, Pan WD, Chen FJ, 2014. Bio-effects of near-zero magnetic fields on the growth, development and reproduction of small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology*, 68: 7–15.
- Wan GJ, Wang WJ, Xu JJ, Yang QF, Dai MJ, Zhang FJ, Sword GA, Pan WD, Chen FJ, 2015. Cryptochromes and hormone signal transduction under near-zero magnetic fields: New clues to magnetoreception in a rice planthopper. *PLoS ONE*, 10(7): e0132966.
- Wang DL, Wang XS, Xiao R, Liu Y, He RQ, 2008. Tubulin assembly is disordered in a hypogeomagnetic field. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(2): 363–368.
- Wang WH, Zhang L, Cheng YX, Jiang XF, 2018. Effect of magnetic fields on the orientation behavior of the oriental armyworm *Mythimna separata* (Walker). *Journal of Applied Entomology*, 55(5): 28–35. [王伟弘, 张蕾, 程云霞, 江幸福, 2018. 粘虫飞行定向行为与不同磁场环境的关系. 应用昆虫学报, 55(5): 28–35.]
- Wang Y, Han Z, Yan S, Mao A, Wang B, Ren H, Chi Y, Han ZC, 2010. Evaluation of suitable reference gene for real-time PCR in human umbilical cord mesenchymal stem cells with long-term in vitro expansion. *Vitro. Cell Dev. Biol. Anim.*, 46(7): 595–599.
- Xu JJ, Pan W, Zhang Y, Li Y, Wan G J, Chen FJ, Sword GA, Pan WD, 2017. Behavioral evidence for a magnetic sense in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Biology Open*, 6(3): 340–347.
- Yang LH, 2011. Study on mechanisms of *Panonychus citri* (McGregor) in response to thermal stress. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [杨丽红, 2011. 柑橘全爪螨对热胁迫的响应机制研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]