# 光处理下粘虫头部组织定量 PCR 分析中内参基因的筛选*

段 云** 巩中军 吴仁海 吴潇博 苗 进
李 彤 蒋月丽 武予清***

（河南省农业科学院植物保护研究所，河南省农作物病虫害防治重点实验室，
农业部华北南部有害生物治理重点实验室，郑州 450002）

**摘 要** 【目的】筛选不同光处理下粘虫 *Mythimna separata* 稳定表达的内参基因，为基因定量研究提供基础。【方法】以粘虫头部组织为材料，选取 *18s rRNA*、*EF-1α*、*β-actin*、*GAPDH* 和 *AK* 5 种候选内参基因进行实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）分析，然后通过 ΔCt 法，BestKeeper、GeNorm、Normfinder 和 RefFinder 软件对候选内参基因的稳定性进行分析；利用 GeNorm 软件进行基因配对差异分析，以判断内参基因的最适组合。【结果】5 种候选内参基因的 Ct 值都处于 15-28 之间。4 种软件对 5 个候选基因稳定性的分析结果存在一定差异。综合分析各种软件的分析结果，推荐粘虫成虫不同光处理条件下采用 *AK* 和 *GAPDH* 作为内参基因。【结论】根据特定试验体系选择合适的内参基因对于 qRT-PCR 定量结果的准确定和可靠性具有重要意义。本研究对后续粘虫在不同光处理条件下目标基因的准确定量具有重要意义。

**关键词** 粘虫；光处理；内参基因；qRT-PCR

# Identification of reference genes in the heads of *Mythimna separata* with real-time quantitative PCR under different light sources

DUAN Yun** GONG Zhong-Jun WU Ren-Hai WU Xiao-Bo MIAO Jin
LI Tong JIANG Yue-Li WU Yu-Qing***

(Key Laboratory of Crop Pest Control of Henan Province, Key Laboratory of Crop Integrated Pest Management of the Southern of North China, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract** **[Objectives]** To select the most stable reference genes for real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in *Mythimna separate*. **[Methods]** We assessed mRNA expression of candidate reference genes in the heads of *M. separata* under different light sources. Five candidate genes, including *18s rRNA*, *EF-1α*, *β-actin*, *GAPDH*, and *AK*, were selected for qRT-PCR analysis. The expression stabilities of these genes were evaluated with the Ct method, BestKeeper, GeNorm, Normfinder and RefFinder. Pairwise variation (*V*) of candidate reference genes were calculated by geNorm. **[Results]** The Ct values of candidate genes were between 15 and 28. The four software packages differed somewhat in estimating gene stability, however, overall, *AK* and *GAPDH* were the best reference genes for *M. separata* adults under different light conditions. **[Conclusion]** It is important to select suitable reference genes for specific conditions to ensure the accurate quantification target genes in qRT-PCR. This study has important practical value for the accurate quantification of target genes of *M. separata* adults exposed to different light conditions.

**Key words** *Mythimna separata*; light treatment; reference gene; qRT-PCR

---

*资助项目 Supported projects：国家公益性行业（农业）科研专项项目（201403031）；国家小麦体系地下虫害岗位（CARS-03）
**第一作者 First author，E-mail：duanyunhao@163.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yuqingwu36@hotmail.com
收稿日期 Received：2019-09-02；接受日期 Accepted：2019-12-20

实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测来实现对起始模板定量及定性的分析。与传统 PCR 相比，qRT-PCR 技术具有特异性强、自动化程度高和使用范围广等特点（Huggett *et al.*，2005；董恩妮等，2013）。近些年来，qRT-PCR 技术已被广泛应用于分子生物学和医学等领域，并且在 DNA 或 RNA 的定量分析，基因表达差异分析和基因分型等方面发挥了重要作用（赵焕英和包金风，2007；董恩妮等，2013）。随着对昆虫研究的深入，qRT-PCR 技术也逐渐发展成为昆虫学领域中重要的生物技术之一（岳秀利等，2013）。

在核酸的定量分析中，qRT-PCR 有两种定量方法，一种是绝对定量，一种是相对定量。目前，qRT-PCR 的相对定量法已广泛应用于基因表达的差异分析中。该方法通常以一个常用的内参基因为基准，把目的基因与内参基因的比值作为结果进行比较（赵焕英和包金风，2007）。在研究基因的表达情况时，为避免样品之间和样品内部的差异，必须引入拷贝数高、表达稳定的内参基因对目标基因的表达量进行校正。然而，大量研究表明，生物体中没有表达绝对稳定的基因（董恩妮等，2013）。任何一种内参基因的所谓稳定表达都只是在特定试验条件下的恒定（王佳等，2014）。在实际中，很多传统的内参基因（如 *β-actin*）在某些实验条件下表达水平变异很大，不适合作为内参基因应用（周世豪等，2016）。所以，在进行荧光定量 PCR 前，对特定实验条件的内参基因进行评估，并选择一个合适的内参基因对后续基因表达研究非常重要（Andemen *et al.*，2004；Van *et al.*，2008；Derveaux *et al.*，2010；王佳等，2014）。

目前，昆虫中关于候选内参基因筛选的报道很多，涉及的内参基因主要有：18S 核糖体 RNA（18S ribosomal RNA，*18S rRNA*）、3-磷酸甘油醛脱氢酶（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，*GAPDH*）、*β* 肌动蛋白（*β-actin*）、α-微管蛋白（Alpha microtubules protein，*α-tubulin*）、延伸因子（Elongation factor 1，*EF-1α*）和精氨酸激酶（Arginine kinase，*AK*）等持家基因（Lu *et al.*，2013；岳秀利等，2013；周世豪等，2016）。选择哪种合适的内参基因取决于昆虫种类、组织器官、处理因素及实验条件等（吴家红等，2011；王佳等，2014；王芮等，2016）。如琥珀酸脱氢酶基因（Succinate dehydrogenase，*SD*）最适合作为内参基因研究高温胁迫下瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 基因的表达情况（周世豪等，2016）。*EF-1* 可以作为研究灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 抗药性基因表达情况的内参基因（王芮等，2016）。*UBQ* 和 *GAPDH* 可以作为内参基因研究柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* 不同虫态下基因的表达（王佳等，2014）。

粘虫 *Mythimna separata* 隶属鳞翅目 Lepidoptera，夜蛾科 Noctuidae，是一种重要的农业害虫，在世界范围内广泛分布。该害虫可取食危害小麦、水稻、玉米等农作物，给农业带来严重的经济损失（张云慧等，2012；江幸福等，2014）。随着分子生物学技术在粘虫研究中的不断应用，基因表达分析也逐渐被应用到粘虫的相关研究中（李柯等，2010；He *et al.*，2017）。尽管目前已有关于甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等鳞翅目害虫内参基因筛选的报道（Lu *et al.*，2013；Zhu *et al.*，2014；Zhang *et al.*，2015），但目前国内外有关粘虫内参基因筛选的研究报道却很少（Li *et al.*，2018）。本研究选择粘虫在不同光处理下头部组织样品，利用 qRT-PCR 方法分析了 *18s rRNA*、*β-actin*、*GAPDH*、*AK* 和 *EF-1α* 5 种昆虫中常用的内参基因 mRNA 的表达差异情况，并运用软件 BestKeeper（Pfaff *et al.*，2004），GeNorm（Vandesompele *et al.*，2002）和 Normfinder（Andemen *et al.*，2004）对检测结果进行表达稳定性分析。本文为研究粘虫在不同光处理下目的基因表达情况提供了基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　供试昆虫

供试粘虫为河南省农业科学院植物保护研

究所实验室内连续继代饲养 10 代的种群。幼虫用新鲜玉米叶进行饲养。饲养条件：温度为（25±1）℃，相对湿度为（70%±5%），光照周期为 L：D=14：10。粘虫化蛹后进行雌雄鉴定，并分开进行羽化。成虫羽化后喂以 10%的蜂蜜水。

选择健壮一致的 3 日龄成虫（雌：雄=1：1）进行试验。白光处理从早上 6:00 开始，进行连续 6 h 的光照（400-750 nm，1 500 lx）。其中一部分作为白光处理样品，另一部分样品分别进行黑暗、黄光或紫外光处理。取各种光照条件下的粘虫头部，迅速放入液氮中速冻，置于 - 70 ℃下备用。各处理均设 3 个重复。

黑暗处理：白光处理 6 h 后，进行 3 h 的黑暗处理；

黄光处理：经过 6 h 的白光处理及 3 h 的黑暗处理后，再进行 3 h 的黄光处理（589 nm，110 lx）；

紫外光处理：经过 6 h 的白光处理及 3 h 的黑暗处理后，再进行 3 h 的紫外光处理（365 nm，110 lx）。

### 1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司；分子量标准、反转录试剂 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR premix Ex TaqⅡ均购自宝生物工程大连有限公司（Takara）；Agarose 琼脂糖为西班牙产品；异丙醇，氯仿等其他试剂为国产分析纯。普通 PCR 仪（Sensoquest LabCycler）为德国 SENSO 公司产品；全自动荧光定量 PCR 反应扩增仪器（ABI 7500）为美国 ABI 公司产品。

### 1.3 内参基因的选择与引物的设计合成

在 NCBI 网站搜索粘虫 *18s rRNA*、*β-actin*、*GAPDH*、*AK* 和 *EF-1α* 的基因序列。参照 qRT-PCR 引物设计的一般原则，设计合成用于 qRT-PCR 的引物，引物信息见表 1。引物由生工生物工程（上海）有限公司合成。

**表 1 用于内参基因 qRT-PCR 的引物及相关信息**

**Table 1 Primers and relative information of reference genes in qRT-PCR**

| 基因名称 Gene name | 引物序列 Primer sequence (5′-3′) | 扩增产物长度 Length of amplified product (bp) | 扩增效率 Amplificaton efficiency (%) | 决定系数 Determination coefficient ($R^2$) |
|---|---|---|---|---|
| *18S rRNA* | F: GCATTCGTATTGCGACGTTAG<br>R: ATCTTTGGTTTCCCGGAAGCT | 217 | 89.89 | 0.998 |
| *β-actin* | F: ATGTGCGACGACGATGTTGCT<br>R: GGGTACTTGAGCGTGAGGATAC | 212 | 115.35 | 0.991 |
| *GAPDH* | F: CTACCTCTTCAAGTACGACTCC<br>R: ACCTTCTTGGCACCACCCTCT | 225 | 99.69 | 0.997 |
| *AK* | F: CAGTCTGGTGTTGAGAACTTGG<br>R: TAGCCCTCCATGGAGCGTCC | 239 | 90.13 | 0.992 |
| *EF-1α* | F: GCGCTGGACACTAACCAAGAAG<br>R: TAGCCAACATGGCATGCTCTCG | 247 | 90.18 | 0.992 |

### 1.4 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

供试粘虫头部用液氮充分研磨后，加入 Trizol 1 mL，然后按照 Trizol Reagent Kit 说明书进行总 RNA 的提取。采用 1%琼脂糖电泳检测总 RNA 的完整性，经 Nanovue 超微量分光光度计（GE Healthcare，英国）测定浓度后，再根据 $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ 的值确定 RNA 的纯度。按照反转录试剂盒（宝生物工程大连有限公司（Takara））的操作说明进行 cDNA 第 1 链的合成。取 1 μg 总 RNA，10 × RT mix 2 μL，dNTP 混合液（2. 5 mmol·L$^{-1}$ each）2 μL，Quant reverse transcriptase 1 μL，Oligo-dT15 或 Random（10 μmol·L$^{-1}$）2 μL，补充 RNase-free $ddH_2O$ 至

20 μL。混匀，点动离心。37 ℃孵育 60 min。产物保存在 - 20 ℃备用。

### 1.5　实时荧光定量 PCR

取上述 4 ng 逆转录产物（cDNA），按照荧光定量 PCR 说明书进行。反应体系为 25 μL，包括 10.4 μL Real Master Mix 混合液，10 μmol·L$^{-1}$ 上、下游引物各 0.8 μL，cDNA 模板 1 μL，加水 7 μL。反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s；72 ℃ 34 s，共 40 个循环；最后在 60-95 ℃测定溶解曲线过程。反应结束后分析 Real-time PCR 反应的扩增曲线和溶解曲线，确认所设计的引物没有非特异性扩增及引物二聚体后，将 cDNA 模板按照 1-10 梯度稀释成 5 个浓度梯度进行标准曲线分析，并参照 Pfaffl（2001）计算不同引物的扩增效率和 $R^2$。每个样品重复 3 次。对照用处理过的灭菌水代替模板。

### 1.6　数据处理及内参基因稳定性评价

qRT-PCR 扩增完毕后，采用 Pfaffl（2001）比较 Ct 值的方法计算 4 个处理下 5 种内参基因的表达量。利用软件 Excel 2010、Origin8.0 和 3 种常用内参基因稳定性评价软件 GeNorm (ver.3.5)、NormFinder (ver.0.953)和 Bestkeeper (ver.1.0)对候选内参基因的平均表达稳定性（*M*）进行分析，根据 *M* 值的大小进行排序，*M* 值越小，稳定性越高（Vandesompele *et al.*，2002；Andemen *et al.*，2004）。另外，geNorm 还可以通过标准化因子配对差异分析得出两两比较的变异值 $V(V=V_n/V_{n+1})$，当 $V_n/V_{n+1}<0.15$ 时，按照稳定性排序确定合适内参基因数目为 *n* 个。最后通过 RefFinder 在线软件（http://www.leonxie.com/referencegeiie.Php）对以上 3 种分析结果进行综合分析，筛选合适的内参基因。

## 2　结果及分析

### 2.1　样品总 RNA 提取及检测

粘虫 4 个处理样品总 RNA 的电泳检测结果如图 1。测定其浓度时，$A_{260/280}$ 在 1.9-2.1，$A_{260/230}$ 在 2.0-2.4，纯度和质量均较好；经 1%琼脂糖凝胶电泳显示出 28S rRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 3 条带，其中 28S rRNA 和 18S rRNA 2 条带明亮，5S rRNA 带较暗淡，说明 RNA 完整性较好。

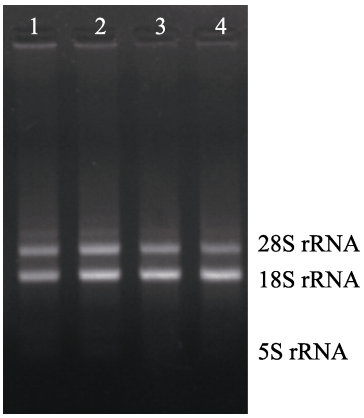


**图 1　粘虫头部组织总 RNA 电泳图**

**Fig. 1　Total RNA agrose gel electrophoresis from four treatments of *Mythimna separata* heads**

1：白光；2：黑暗；3: 紫外光；4: 黄光。

1: White light; 2: Dark; 3: Ultraviolet light; 4: Yellow light.

### 2.2　溶解曲线及标准曲线分析

通过对 5 个候选内参基因熔解曲线的分析，发现其熔解曲线均为单峰，反应过程中无非特异性扩增和引物二聚体。将 4 个处理样品的 cDNA 模板分别稀释成相同倍数的浓度梯度（$10^{-1}$-$10^3$），以 Ct 值为纵坐标，相对拷贝数的对数为横坐标，进行标准曲线分析，得出所有内参基因的扩增效率为 89.89%-115.3%，决定系数（$R^2$）为 0.991-0.998（表 1）。熔解曲线和标准曲线的共同分析表明，所设计的 5 个内参基因引物符合 qRT-PCR 实验要求。

### 2.3　内参基因稳定性评价

**2.3.1　BestKeeper 软件的评价结果**　经 Bestkeeper 分析，4 种光处理条件下粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的稳定性结果如表 2 所示。BestKeeper 是以标准差（SD）与调节系数标准差 SD[±X-fold]评判基因的表达稳定性，其值越小表示越稳定。5 种内参基因的稳定性平均值 *M* 从大到小依次为：*18S-rRNA>ACT>GAPDH>EF=AK*。BestKeeper 评价显示以 *AK* 和 *EF* 为最稳定的内参基因，*GAPDH* 第 3，最不稳定的是 *18S-rRNA* 和 *ACT*。

**表 2 利用 Bestkeeper 软件评价不同光处理下粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的表达稳定性**

**Table 2 Summary statistic generated by the BestKeeper analysis for candidate reference genes in the head of *Mythimn separata* after exposure to different light based on quantification cycle value (Cq)**

| 参数 Parameter | 基因 Gene | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *18s-rRNA* | *β-actin* | *GAPDH* | *AK* | *EF-1α* |
| 数 n | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| geo 平均值 geo mean [CP] | 16.75 | 25.44 | 25.92 | 26.24 | 26.37 |
| AR 平均值 AR mean [CP] | 16.78 | 25.45 | 25.93 | 26.25 | 26.37 |
| 最小值 min [CP] | 15.60 | 24.37 | 24.92 | 25.23 | 25.49 |
| 最大值 max [CP] | 17.88 | 26.31 | 26.61 | 26.95 | 27.25 |
| 标准差 std dev [+/- CP] | 0.86 | 0.66 | 0.63 | 0.56 | 0.56 |
| 变异系数 CV [% CP] | 5.14 | 2.59 | 2.41 | 2.12 | 2.14 |
| 最小值 min [x-fold] | - 2.23 | - 2.10 | - 2.01 | - 2.01 | - 1.84 |
| 最大值 max [x-fold] | 2.19 | 1.83 | 1.61 | 1.63 | 1.85 |
| 调节系数标准差 std dev [+/-x-fold] | 1.82 | 1.58 | 1.54 | 1.47 | 1.48 |

**2.3.2 GeNorm 软件的评价结果** GerNorm 软件对内参基因的评价是根据表达稳定度的平均值 *M* 的大小来衡量，*M* 值越小，内参基因表达越稳定；反之，稳定性越差。经 GerNorm 软件评价分析，不同光处理后粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的稳定性见图 2（A）。在不同处理样品中，5 种内参基因的稳定性平均值 *M* 从大到小依次为：*18s-rRNA>EF-1α>β-actin>AK=GAPDH*。由此可见，稳定性最好的内参基因是 *AK* 和 *GAPDH*，1*8s-rRNA* 的 *M* 值最大，稳定性最差。

本研究中 $V_{2/3}$ 小于 0.15 阈值（图 2：B），表明研究粘虫灯光处理后目的基因表达情况时，最佳内参那基因数为 2 个，即可使用 *AK* 和 *GAPDH* 组合作为内参基因。

**2.3.3 NormFinder 软件评价结果** 用 NormFinder 分析内参基因的原理是根据基因稳定值的大小衡量，与 GeNorm 软件分析类似，稳定值越小，其内参基因的表达稳定性越高。经 NormFinder 分析，粘虫经过 4 种光处理后，5 种候选内参基因在头部中表达的稳定性顺序为：*β-actin*（0.066）>*GAPDH*（0.118）>*AK*（0.141）>*EF-1*（0.168）>*18S-rRNA*（0.307），如图 3 所

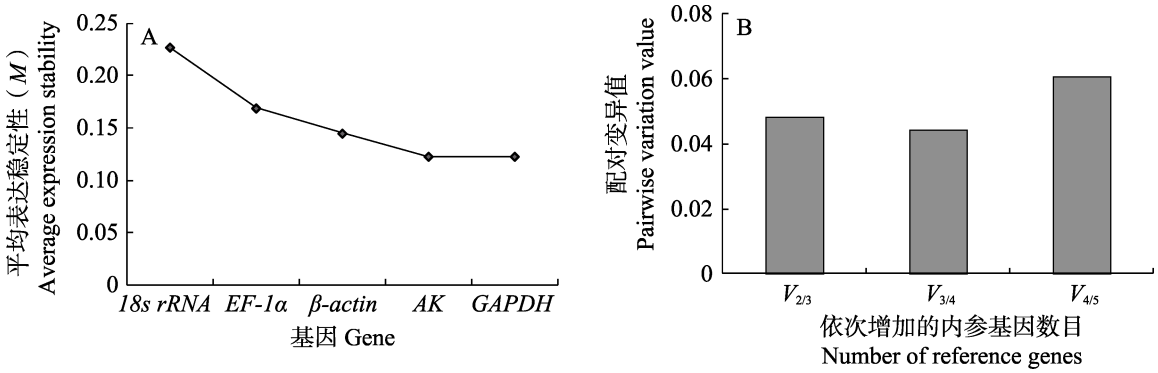


**图 2 利用 GeNorm 评价不同光处理下粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的表达稳定性**

**Fig. 2 Average expression stability value (*M*) of the candidate reference genes in the heads of *Mythimna separata* after exposure to different light analyzed by Genorm**

A. GeNorm 软件分析 5 个内参基因表达稳定性值；B. 内参基因配对组合。

A. Expression stability of 5 candidate reference genes calculated by GeNorm; B. Pairwise group of reference genes.

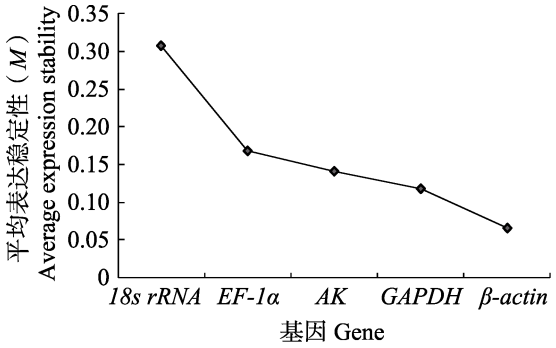


**图 3　利用 NormFinder 软件评价不同光处理下粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的表达稳定性**

**Fig. 3　Average expression stability value (*M*) of the candidate reference genes in the heads of *Mythimna separata* after exposure to different light analyzed by NormFinder**

示。其中，基因 *β-actin* 稳定值最小，即：*β-actin* 的表达稳定性最高，可以作为候选内参基因，其次为 *GAPDH* 和 *AK*，而 *18S-rRNA* 和 *EF-1α* 的稳定性均较差，不适合作为内参基因。

**2.3.4　3 种软件综合分析结果**　综合比较 3 种软件的评价结果（图 4），发现 BestKeeper 软件分析得出表达最稳定的基因是 *AK* 和 *EF-1α*，GeNorm 软件评价结果是 *AK* 和 *GAPDH* 最稳定，而软件 NormFinder 的评价结果是 *β-actin* 最稳定，其次是基因 *GAPDH* 和 *AK*。因此，4 种光处理条件下，5 种候选内参基因在粘虫头部中表达最稳定性的是 *AK*，其次是基因 *GAPDH*；而稳定性最差的是 *18S-rRNA*，不适合作为光处理下黏虫目的基因相对定量表达的内参基因。

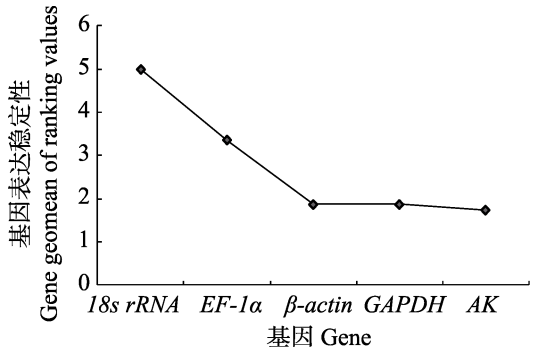


**图 4　综合评价光处理下粘虫头部组织中 5 种候选内参基因的表达稳定性**

**Fig. 4　The comprehensive ranking values of the candidate reference genes in the heads of *Mythimna separata* after exposure to different light**

## 3　讨论

目前，qRT-PCR 已被广泛应用于昆虫基因表达分析中。为了减少不同样本 RNA 产量的差异及反转录效率的影响，需要对内参基因进行校正和标准化（Bustin *et al.*，2005）。因此，选择一种稳定表达的内参基因是保证目的基因表达结果准确可靠的前提条件（Van *et al.*，2008；Derveaux *et al.*，2010）。

内参基因的筛选一般选取 3-18 个候选内参基因（Andemen *et al.*，2004）。本研究选取了 5 种昆虫中常用的内参基因 *18SrRNA*、*β-actin*、*GAPDH*、*AK* 和 *EF-1*。采用 BestKeeper、GeNorm、NorFinder 和 RefFinder 4 种软件对 5 种候选内参基因的稳定性的评价结果表明，不同软件对内参基因的稳定性排序有一定差异，这是由软件的算法不同导致的（符伟等，2012）。BestKeeper 程序主要通过比较 Ct 值的标准偏差和变异系数来选择表达最稳定的基因（Pfaffl *et al.*，2004）。经过统计分析，本研究的候选内参基因中 *AK* 和 *EF-1* 是最稳定的。GeNorm 软件是通过计算内参基因表达稳定性的 *M* 值，来分析其在不同样品中的表达稳定性。*M* 值越大稳定性越差；反之，稳定性越好（Vandesompele *et al.*，2002）。该软件对本研究的分析结果显示，*AK* 和 *GAPDH* 的 *M* 值最小，最适合作为内参基因。NormFinder 软件是基于方差分析评价内参基因在不同样品中的表达稳定性（Andemen *et al.*，2004）。在本研究中，该软件的计算分析表明 *β-actin* 是最稳定的。综合 3 种软件的排序结果，本研究发现 *18S rRNA* 在 4 种不同的光处理下稳定性最差，不适合作为研究光处理下粘虫目的基因表达情况的内参基因；而 *AK* 的表达稳定性最好，为理想的内参基因。另外，利用 GeNorm 进行标准化因子配对差异分析后确定合适的内参基因数目为 2 个，即本研究中可使用 *AK* 和 *GAPDH* 组合作为内参基因。

粘虫是一种夜出型害虫，其飞行、交尾和产卵等活动都在夜间进行。夜间的光照条件对粘虫

的行为活动和生殖能力等都有重要影响（Ali *et al*., 2016；段云等，2016；Duan *et al*.，2017）。本文采用 qRT-PCR 方法对 5 种候选内参基因进行评价，结果发现所选取的 5 种内参基因的表达稳定性受光处理条件的影响不同。该研究结果为今后研究粘虫在不同光处理下目的基因的表达情况提供了基础。

## 参考文献 (References)


Ali A, Rashid MA, Huang QY, Lei CL, 2016. Effect of UV-A radiation as an environmental stress on the development, longevity, and reproduction of the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17): 17002–17007.

Andemen CL, Jensen JL, Ørntoft TF, 2004. Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation appmach to identify genes suited fornormalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15): 5245–5250.

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

Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J, 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4): 227–230.

Dong EN, Liang Q, Li L, Wang LJ, Zhong T, Wang Y, Zhang HP, 2013. The selection of reference gene in real-time quantitative reverse transcription PCR. *Chinese Journal of Animal Science*, 49(11): 92–96. [董恩妮, 梁青, 李利, 王林杰, 仲涛, 王永, 张红平, 2013. 实时荧光定量PCR内参基因的选择. 中国畜牧杂志, 49(11): 92–96.]

Duan Y, Miao J, Gong ZJ, Jiang YL, Li T, Li HL, Wu YQ, 2016. Effect of yellow light on the oviposition and adult longevity of *Mythimna separata*. *Plant Protection*, 42(3): 175–177. [段云, 苗进, 巩中军, 蒋月丽, 李彤, 李慧玲, 武予清, 2016. 黄色光对黏虫成虫产卵和寿命的影响. 植物保护, 42(3): 175–177.]

Duan Y, Gong ZJ, Wu RH, Miao J, Jiang YL, Li T, Wu XB, Wu YQ, 2017. Transcriptome analysis of molecular mechanisms responsible for light-stress response in *Mythimna separata* (Walker). *Scientific Reports*, 7: 45188.

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): 1 406–1 412.]

He YQ, Feng B, Guo QS, Du YJ, 2017. Age influences the olfactory profiles of the migratory oriental armyworm *Mythimna separata* at the molecular level. *BMC Genomics*, 18(1): 32.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A, 2005. Real-time RT-PCR normalization: Strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4): 279–284.

Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014. Current status and trends in research on the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker) in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(4): 881–889. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014, 我国粘虫研究现状及发展趋势. 应用昆虫学报, 51(4): 881–889.]

Li K, Yin H, Xi GS, Lian ZM, 2010. Molecular cloning, sequence analysis and expression detection of *β-actin* gene in the oriental armyworm, *Mythimna separate*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1089–1094. [李柯, 阴环, 奚耕思, 廉振民, 2010. 粘虫β-actin 基因 cDNA 的克隆、序列分析及表达量检测. 昆虫知识, 47(6): 1089–1094.]

Li HB, Dai CG, Zhang CR, He YF, Ran HY, Chen SH, 2018. Screening potential reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *PLoS ONE*, 13(4): e0195096.

Lu YH, Yuan M, Gao XW, Kang TH, Zhan S, Wan H, Li JH, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002–2007.

Pfaff 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.

Van GH, Vrana K, Freeman W, 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5): 619–626.

Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De Paepe A, 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.

Wang R, Fu R, Yang QW, Mu LL, Wu M, 2016. Identification of reference genes in resistant small brown plant hopper, *Laodelphax striatellus*. *Journal of Nanjing Agricultural University*,

39(5): 763–770. [王芮, 符蓉, 杨倩文, 幕莉莉, 吴敏, 2016. 抗药性灰飞虱稳定内参基因的筛选. 南京农业大学学报, 39(5): 763–770].

Wang J, Zhao J, Liu YH, 2014. Evaluation of endogenous reference genes in *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(12): 1375–1380. [王佳, 赵静, 刘映红, 2014. 柑橘大实蝇内参基因的评估. 昆虫学报, 57(12): 1375–1380.]

Wu JH, Cheng JZ, Sun Y, Chen L, 2011. Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in *Aedes albopictus*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 27(5): 432–435. [吴家红, 程金芝, 孙宇, 陈璐, 2011. 白纹伊蚊基因表达定量 PCR 内参基因的选择. 中国人兽共患病学报, 27(5): 432–435.]

Yue XL, Gao XJ, Wang JJ, Lv JJ, Shen HM, 2013. Selection of reference genes and study of the expression levels of detoxifying enzymes of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(21): 4542–4549. [岳秀利, 高新菊, 王进军, 吕娟娟, 沈慧敏, 2013. 二斑叶螨内参基因的筛选及解毒酶基因的表达水平. 中国农业科学, 46(21): 4542–4549.]

Zhao HY, Bao JF, 2007. Progress of the principle of real-time fluorescence quantitative PCR and its application research. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 16(4): 492–497. [赵焕英, 包金风, 2007. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展. 中国组织化学与细胞化学杂志, 16(4): 492–497.]

Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF, 2012. Preliminary analysis of the outbreak of the third-generation armyworm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Protection*, 38(5): 1–8. [张云慧, 张智, 姜玉英, 曾娟, 高月波, 程登发, 2012. 2012 年三代粘虫大发生原因初步分析. 植物保护, 38(5): 1–8.]

Zhang S, An S, Li Z, Wu F, Yang Q, Liu Y, Cao J, Zhang H, Zhang Q, Liu X, 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402.

Zhou SH, Li L, Fu YG, 2016. Selection of reference genes in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) under high temperature stress. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 37(1): 131–135. [周世豪, 李磊, 符悦冠, 2016. 高温胁迫下瓜实蝇的内参基因筛选. 热带作物学报, 37(1): 131–135.]

Zhu X, Yuan M, Shakeel M, Zhang YJ, Wang SL, Wang X, Zhan S, Kang TH, Li JH, 2014. Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 9(1): e84730.