



重金属、农药和植物病毒胁迫下白背飞虱内参基因的筛选

吴羽，王一明，朱雁飞，高俏，邱林，李有志*

(湖南农业大学植物保护学院，长沙 410128)

摘要：本研究旨在筛选白背飞虱 *Sogatella furcifera* 在重金属、农药及其传播的南方水稻黑条矮缩病毒 (SRBSDV) 胁迫下稳定表达的内参基因，使白背飞虱在上述逆境下的基因表达量分析更加趋于标准化。采用 qRT-PCR 技术，通过 GeNorm、Normfinder、BestKeeper、Delta Ct 和 RefFinder 等软件分析了白背飞虱 8 个内参基因 (*EF1- α* 、*RPS18*、*ACT*、*TUB*、*GAPDH*、*RPL9*、*RPL10*、*18S*) 在重金属镉胁迫、Flupyrimin 和 Dinotefuran 药剂胁迫及 SRBSDV 胁迫下的表达稳定性。结果发现在不同胁迫下 8 个候选内参基因引物扩增特异性良好，重金属镉和 Flupyrimin 胁迫下最稳定的内参基因为 *RPL9* 和 *RPL10*；Dinotefuran 胁迫下最稳定的内参基因为 *ACT* 和 *RPL9*；SRBSDV 胁迫下最稳定的内参基因为 *TUB* 和 *RPL9*。利用 *gstd1* 和 *Vg1* 为靶标基因对筛选到的内参基因稳定性进行鉴定，结果显示组合内参基因标准误差较单一内参基因的标准误差低，为最佳归一标准。本研究为利用 qRT-PCR 技术分析白背飞虱在重金属镉胁迫、Flupyrimin 和 Dinotefuran 药剂胁迫以及 SRBSDV 胁迫下相关基因的表达研究提供了稳定的内参基因，为后续基因功能的研究奠定了基础。

关键词：白背飞虱；重金属镉；Flupyrimin；Dinotefuran；南方水稻黑条矮缩病毒；内参基因

中图分类号：Q968.1；Q963

文献标识码：A

Screening of reference genes in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) under heavy metal, pesticide, and plant virus stress

WU Yu, WANG Yi-Ming, ZHU Yan-Fei, GAO Qiao, QIU Lin, LI You-Zhi* (College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The study aims to identify stable reference genes for *Sogatella furcifera* under the stress of heavy metals, pesticides, and the Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) that it transmits, thereby standardizing gene expression analysis under these adverse conditions. Using qRT-PCR technology, we evaluated the expression stability of eight candidate reference genes (*EF1- α* , *RPS18*, *ACT*, *TUB*, *GAPDH*, *RPL9*, *RPL10*, *18S*) under the stress of heavy metal

基金项目：国家重点研发计划项目 (2021YFD1401100)；国家自然科学基金项目 (32202304, 32172405)

作者简介：吴羽，硕士研究生，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail: 15285680174@163.com

*通讯作者 Author for correspondence: 李有志，博士，教授，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail: liyouzhi@hunau.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-10-12; 修回日期 Revision received: 2025-02-24; 接受日期 Accepted: 2025-02-25

cadmium(Cd), Flupyrimin, Dinotefuran, and SRBSDV through GeNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta Ct, and RefFinder software. The results demonstrated that all primers for the eight candidate reference genes exhibited high amplification specificity across different stress conditions. Under Cd and Flupyrimin stress, *RPL9* and *RPL10* were the most stable reference genes; Dinotefuran stress, *ACT* and *RPL9* showed the highest stability; and SRBSDV stress, *TUB* and *RPL9* were the most stable. The stability of the selected reference genes was further validated using *gstd1* and *Vgl* as target genes. The results indicated that the combined use of multiple reference genes resulted in a lower standard error compared to single reference genes, providing the optimal normalization standard. This study provides a set of stable reference genes for qRT-PCR-based gene expression analysis of *S. furcifera* under the stress of Cd, Flupyrimin, Dinotefuran, and SRBSDV, laying a foundation for subsequent research on gene function.

Key words: *Sogatella furcifera*; cadmium; flupyrimin; dinotefuran; southern rice black stripe dwarf virus; reference gene

基因表达是生物体生长发育和正常生理活动的基础, 基因的表达量通常受到多种因素的影响, 特别是在生物遭受不同生物和非生物胁迫时, 基因表达量的变化可以反映生物体在应对胁迫时发生的行为、发育和生理等方面变化的内在分子机制, 因此研究基因表达量的变化对于在分子水平上理解生物之间以及生物与环境之间的相互关系至关重要 (Kang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2024)。实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 就是基因表达分析的核心工具之一, 它能够通过检测 PCR 过程中产生的荧光信号定量地对目的基因的表达水平进行分析。因其具有敏感性高、重复性好、污染少等优点, 使得 PCR 技术在很多领域得到广泛应用 (Radonic *et al.*, 2004)。而在利用 qRT-PCR 技术研究目的基因的表达水平时, 实验结果会受到很多因素的影响, 其中首要的因素就是内参基因表达是否稳定, 稳定的内参基因能够对目的基因的表达进行归一和校正, 降低实验过程中一些不可控因素的差异对实验结果造成的影响 (Fleige *et al.*, 2006)。理想的内参基因应在不同的实验条件或者是在不同的组织、龄期、性别中都能够稳定表达, 通常情况下管家基因会被作为内参基因使用 (Chapman *et al.*, 2015)。但是相继有研究报道称这些管家基因在不同的环境条件、发育阶段和组织中并不是绝对稳定表达的。例如, 在稻飞虱感染马德里约柯托病毒 *Mal de Rio Cuarto virus MRCV* 后, 通过比较感染组和未感染组的 5 个内参基因内参基因的稳定性, 发现 *TUB* 和 *EF1- α* 基因由于稳定性变化范围较大而不被用作合适的内参基因 (Maroniche *et al.*, 2011)。对绿豆象虫 (*Callosobruchus chinensis*) 的 8 个内参基因 (β -*Actin*、 β -*Tub*、 α -*Tub*、*AK*、*GAPDH*、*RPL40*、*Hsc70*、*eEF1- α*) 在不同龄期和不同组织中的表达稳定性进行分析, 结果表明, 在若虫阶段仅 β -*Act* 和 β -*Tub* 的稳定性最高, 而在成虫阶段, β -*Tub* 和 α -*Tub* 的稳定性最高, 其余内参基因由于稳定性变化较大, 被排除在外 (张敏等, 2024)。在以柑橘橘虱 *Bemisiatabaci* 为研究对象, 对其 5 个特定实验条件下 (不同的发育阶段、性别、组织、种群及不同温度处理) 的 8 个内参基因进行筛选, 发现在不同的条件下最稳定内参基因各不

相同，在不同组织样品中推荐使用的内参基因为 *EF1A* 和 α -*Tub*、在不同温度样品中推荐使用的内参基因为 *RPS18* 和 *RPL13* (Kong *et al.*, 2024)。因此并不存在绝对稳定，适用于任何条件的内参基因，所以在对目的基因进行表达量分析时选择合适内参基因显得尤为重要。

白背飞虱 *Sogatella furcifera* 属刺吸式口器害虫，主要通过刺吸式口器刺吸水稻韧皮部汁液造成危害，对水稻生产具有极大的破坏作用 (Wang *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2018)。目前白背飞虱的防治以化学防治为主，田间白背飞虱不可避免的会受到各种药剂胁迫。呋虫胺 *Dinotefuran* 是目前用于防治稻飞虱的主要药剂之一 (刘娇等, 2024)，对作物、人畜和环境十分安全，因此被大力推广使用。此外 *Flupyrimin* 也是稻飞虱防治的关键药剂之一，它是一种新开发的作用于烟碱乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 的杀虫剂，对半翅目、鳞翅目、缨翅目和双翅目的多种害虫均有杀虫活性，目前还未报道有抗性的产生 (顾林玲, 2022)。此外由于人类活动的不当而导致农田重金属污染日益严重，且重金属不能被自然降解，易被农作物吸收富集，导致农田生态系统中的植食性昆虫和天敌昆虫面临重金属胁迫概率越来越高 (Di *et al.*, 2016; 王杰等, 2024)。白背飞虱是目前唯一能够高效传播南方水稻黑条矮缩病 (Southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 的介体昆虫，它能以持久型不经卵方式传播 SRBSDV，一旦获毒后可终生带毒 (曹杨等, 2011; Li *et al.*, 2024)。随着研究的深入，准确定量基因表达水平对于研究白背飞虱抗药性、重金属耐受性以及揭示白背飞虱与 SRBSDV 的互作关系等现象背后的分子机制具有越来越重要的作用，想要精准定量其基因的表达水平，需要可靠的内参基因进行校准，因此对白背飞虱内参基因的筛选具有关键意义。

本研究选取白背飞虱的 8 个管家基因作为候选内参基因，包括延伸因子 1- α (*EF1- α*)、核糖体蛋白 S18 (*RPS18*)、肌动蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、核糖体蛋白 L9 (*RPL9*)、核糖体蛋白 L10 (*RPL10*) 和 18S 核糖体 RNA (*18S*)。通过 *GeNorm*、*Normfinder*、*BestKeeper*、*Delta Ct* 和 *RefFinder* 等软件对这些基因的表达稳定性进行系统评估 (Yin *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023)，旨在筛选出在重金属镉、农药 *Flupyrimin*、*Dinotefuran* 以及 SRBSDV 胁迫条件下表达最稳定的内参基因。研究结果将为白背飞虱的基因表达分析和功能研究提供可靠的内参依据。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

供试白背飞虱虫源采自湖南省长沙市水稻田 (28°18'N, 113°03'E)，经室内饲养多代后作为实验用虫使用。初孵若虫饲养于透明塑料杯中 (直径 9.5 cm, 高 15.5 cm)，杯中放置 10~15 株 6 日龄的新鲜水稻苗，饲养密度为 30 头/杯，每 3 d 更换一次稻苗。饲养条件：光周期 16 L : 8 D、温度 26°C \pm 1°C、相对湿度 70%~80%。

1.2 试验样品处理及收集

1.2.1 重金属镉胁迫

实验设置 3 个镉浓度处理组，分别用 5 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg 的 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液处理土壤，以未处理的土壤为对照。分别将 4 种不同处理的土壤分装到直径 9.5 cm，高 15.5 cm 的塑料杯中，使土壤高度约为 5 cm，经催芽至露白后的水稻种子单粒种到处理后的土壤中，培育 20 d 后备用。在 4 种不同处理的水稻苗上分别接入 1 对 6 日龄雌成虫，待 24 h 移走，4~6 d 后陆续开始有若虫孵出，将初孵若虫转移到新的处理水稻苗上，每 3 d 更换一次稻苗，若虫饲养条件同上 1.1；待若虫发育到 4 龄时进行随机取样，样品用液氮速冻后于 -80°C 超低温冰箱中保存备用。每个处理设置 3 个生物学重复，每个重复取 10 头虫。

1.2.2 药剂胁迫

供试农药 Dinotefuran (98%活性成分, $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$, CAS: 1165252-70-0) 和 Flupyrimin (94.2%活性成分, $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$, CAS: 16859566-03-7) 均购自广西天元生物股份有限公司。以 Triton X-100 water 为助溶剂溶解，分别设置 LC_{10} 和 LC_{20} 两种浓度处理，其中 Dinotefuran 的 LC_{10} 和 LC_{20} 分别为 1.00 mg/L 和 1.55 mg/L，Flupyrimin 的 LC_{10} 和 LC_{20} 分别为 1.24 mg/L 和 1.82 mg/L (Wu *et al.*, 2024)，处理组采用稻苗浸渍法对白背飞虱 3 龄若虫进行处理，处理 72 h 后转移到未经药剂处理的水稻苗上持续饲养，对照组为未经药剂胁迫的白背飞虱，饲养条件同上 1.1，羽化 3 d 后进行随机取样，样品于液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱冻存备用。每个处理设置 4 个生物学重复，每个重复取 4 头虫。

1.2.3 SRBSDV 胁迫

取 200 头 1~2 龄若虫在感染 SRBSDV 病毒的水稻植株上饲养 24 h，随后将其移至未感染 SRBSDV 病毒的水稻植株上饲养 10 d，对照组白背飞虱于健康水稻植株上饲养，饲养条件同上 1.1。处理组试虫饲养至第 7 天时，随机取 20 头若虫进行 qRT-PCR 检测，若病毒感染比例超过 80%，则认为处理群体已基本感染病毒，可用于后续进行实验。对对照组和 SRBSDV 处理组试虫进行随机取样，样品于液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱冻存备用。每个处理设置 3 个生物学重复，每个重复取 10 头虫。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

采用总 RNA 提取试剂盒 (RNAiso Plus9108, Takara, 日本) 提取样品的总 RNA，利用可见分光光度计 (NanoDrop 1000, 赛默飞世尔科技有限公司, 中国) 对总 RNA 的质量和浓度进行检测，记录在波长 OD_{260} 和 OD_{280} 下的吸光度比值，比值均在 1.8~2.0 之间，利用凝胶电泳检测总 RNA 的完整性，质检合格的 RNA 于 -80°C 低温保存，用于 cDNA 合成。

按照反转录试剂盒 (Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus) 11139ES10) 说明书，对总 cDNA 进行合成。过程如下：

(1) gDNA 消化：在 200 μL 的离心管中配置混合液 (5 \times gDNA Digester Mix 3 μL 、Total RNA 1 μg 、RNase-free H_2O 补充到 15 μL)，用移液枪轻轻吹打混匀后于 PCR 仪中 42°C 孵育

2 min。(2) 逆转录体系配置：上一步的反应液 15 μ L、10 \times Hifair[®] III Supre Buffer 2 μ L、Hifair III RT Enzyme Mix 1 μ L、Random Primers N6 (50 μ M) 0.5 μ L、Olig (dT) 18 (50 μ M) 0.5 μ L、RNase-free H₂O 补充到 20 μ L。(3) 逆转录标准程序设置：25 $^{\circ}$ C持续 5min、55 $^{\circ}$ C持续 15min、85 $^{\circ}$ C持续 5min。总 cDNA 于-20 $^{\circ}$ C低温保存，用于 qRT-PCR 实验。

1.4 候选内参基因的确定及引物设计

参考白背飞虱、褐飞虱 *Nilaparvatalugens*、灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 以及长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* 等昆虫进行内参评价时选用的基因，选择白背飞虱的延伸因子 1- α (*EFI- α*)、核糖体蛋白 S18 (*RPS18*)、肌动蛋白 (*ACT*)、微管蛋白 (*TUB*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、核糖体蛋白 L9 (*RPL9*)、核糖体蛋白 L10 (*RPL10*)、18S 核糖体 RNA (*18S*) 等 8 个内参基因 (Majerowicz *et al.*, 2011; He *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2014; An *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019)。根据基因序列信息，利用 NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 设计 qRT-PCR 引物，基因及引物信息见表 1。

1.5 候选内参基因表达稳定性分析

分别以 1.2 中合成的 cDNA 为模板，利用 qRT-PCR 分析 8 个候选内参基因在不同处理下的 mRNA 表达水平。采用 GeNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 软件对重金属镉胁迫、Flupyrimin 胁迫、Dinotefuran 胁迫和 SRBSDV 病毒胁迫下的内参基因表达稳定性进行分析。GeNorm 通过计算每个内参基因稳定性的 M 值来筛选稳定性较好的内参基因，其判定标准为 M 值越小的内参基因稳定性越好；该软件还可计算引入 1 个新的内参基因后标准化因子的配对变异 V 值，并根据 V_n/V_{n+1} 值来确定所需最适内参基因的数目，默认 V 值为 0.15，如果 $V_n/V_{n+1} < 0.15$ ，则最适内参基因的数量是 n 个。NormFinder 通过计算并对各基因表达稳定值 (Stability value, SV) 进行排序，SV 值越小则基因表达越稳定。BestKeeper 软件通过计算每个基因产生配对的相关系数 (Related coefficient, R)、标准偏差 (Standard deviation, SD) 和变异系数 (Coefficient of variation, CV)，根据 SD 和 CV 值越小则基因越稳定的原则，最终对各基因进行排名，SD < 1 的基因被视为表达水平较为稳定。Delta Ct 程序通过计算并比较不同基因之间表达量的标准偏差 (SD) 大小来确定稳定性，SD 值越小则基因稳定性越好，反之则越差。最后，根据 GeNorm 软件推荐的最适内参基因的数量，利用 RefFinder 在线分析软件 (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/?type=reference>) 对上述 4 种方法的分析结果进行综合评价，最终确定各胁迫下适用的内参基因。

1.6 候选内参基因引物特异性及标准曲线绘制

以 1.2 中对照处理 RNA 反转录的 cDNA 为模板，使用 2 \times Hieff ultra-Rapid hotstart PCR Master Mix (上海翌圣生物科技股份有限公司) 对各基因引物进行 PCR 扩增，使用 1% 浓度的琼脂糖凝胶对所选基因引物的 PCR 扩增片段进行分离鉴定。模版 cDNA 依次稀释 5 个浓

度梯度，每个梯度稀释 4 倍后使用 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix（上海翌圣生物科技股份有限公司）进行标准曲线绘制，根据检测结果得到线性相关系数（ R^2 ）和扩增效率（E）。

2 结果与分析

2.1 候选内参基因引物特异性和扩增效率检测

8 个候选内参基因的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离后，电泳结果显示各目的条带单一且明亮，扩增产物大小与预期设置一致，没有出现引物二聚体（图 1）。此外，qPCR 扩增效率评估显示，8 个候选内参基因引物的熔解曲线分析均为单一峰（图 2），证明各内参基因引物具有良好的扩增特异性。标准曲线结果显示候选内参基因引物扩增效率范围在 92.6%~106.4%之间，线性相关系数 $R^2 \geq 0.994$ （表 1），表明模板 cDNA 浓度与相应的循环数之间存在一定的线性相关性，绘制的标准曲线准确可信，各基因引物设计合理，符合引物设计规范，可以用于后续开展实验。

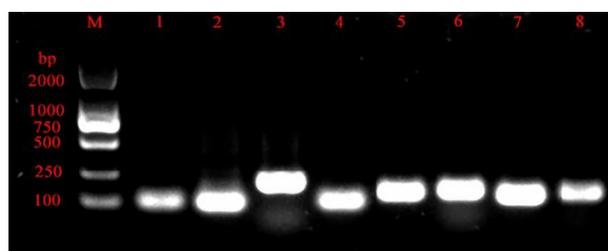


图 1 候选内参基因 RT-PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of RT-PCR products of candidate reference genes

注：M, 2 000 bp DNA Maker; 1, *18S*; 2, *ACT*; 3, *EF1- α* ; 4, *GAPDH*; 5, *RPS18*; 6, *RPL9*; 7, *RPL10*; 8, *TUB*。

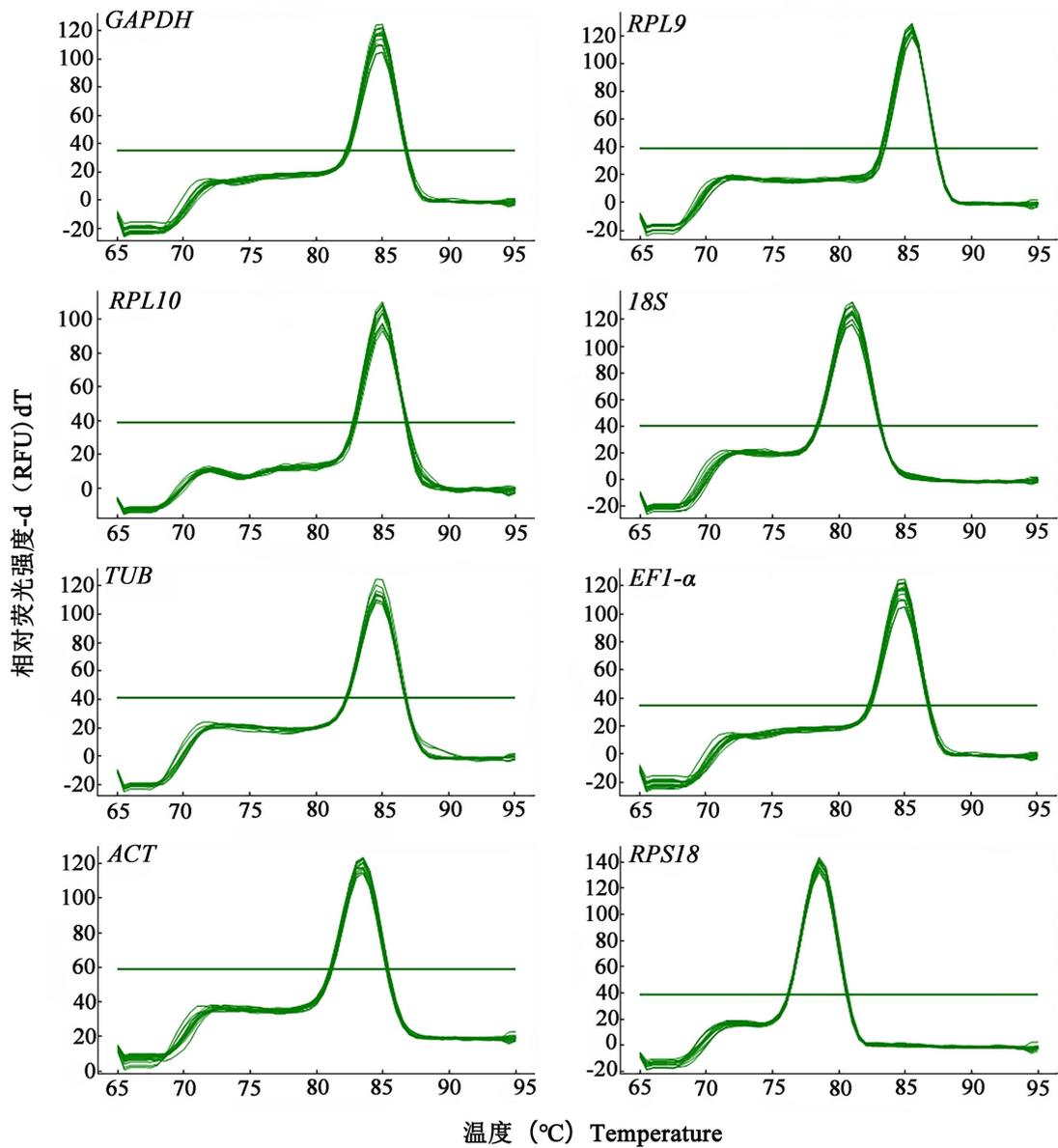


图2 白背飞虱 8 个候选内参基因 qRT-PCR 熔解曲线

Fig. 2 qRT-PCR melting curves of 8 candidate endogenous reference genes in *Sogatella furcifera*

表 1 白背飞虱 8 个候选内参基因 qRT-PCR 引物的基本信息

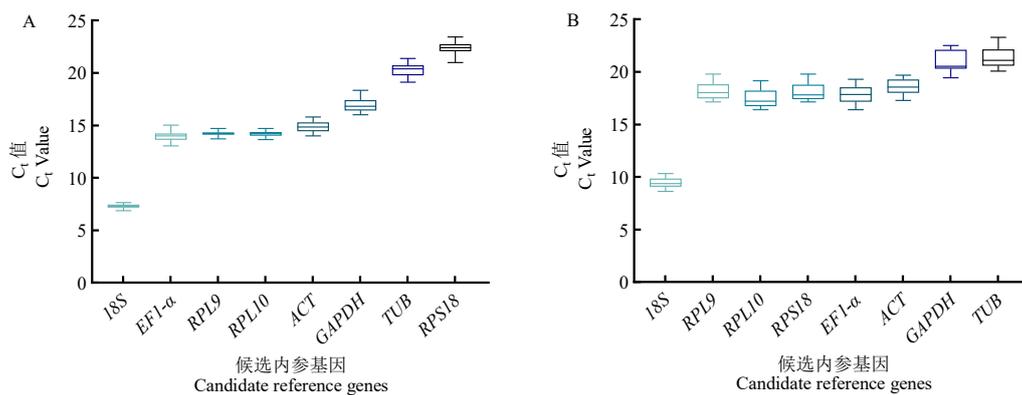
Table 1 Information of primers of 8 candidate reference genes used for qRT-PCR in *Sogatella furcifera*

基因 Gene	基因 ID 号 Gene ID	引物序列 (5'-3') Primer sequence	引物扩增长度 (bp) Amplification size	扩增效率 (%) Amplification efficiency	标准曲线决定系数 R ² Coefficient of determination in standard curves
<i>RPL9</i>	KP735523	F: CAAGATGAGAGCCGTGTA R: CGAGTTGGTAACAGTGAC	142	101.7	0.999
<i>RPL10</i>	KP735524	F: CACTCTAGCCACTGTTCCTT R: GCGACTTCATCCGTTCCA	121	92.8	0.995
<i>EF1-α</i>	KP735517	F: ATTGTGCTGTGCTGATTGT R: TGCTCACCTCCTTCTTGAT	198	92.6	0.995
<i>ACT</i>	KP735520	F: TGCCATCTATGAAGGTTATGC R: GAGGTAGTCGGTCAAGTCA	79	106.0	0.996
<i>18S</i>	JX556779	F: CGGAAGGATTGACAGATTGAT	78	105.4	0.998

		R: TCGCTCCACCAACTAAGA			
<i>RPS18</i>	KP735519	F: CTGAAGAGGAGGTGGAGAA	133	98.9	0.997
		R: TCAAGGTTGGATGATGTTAGC			
<i>GAPDH</i>	KP735522	F: CAGAAGACCGTCGATGGA	78	104.9	0.998
		R: CGCTGCTGGAATGATGTT			
<i>TUB</i>	KP735521	F: CAACAACACTACGCCAGAGG	126	106.4	0.994
		R: CCGAATGAGTGGAAGATGAG			

2.2 不同样品中候选内参基因 mRNA 表达水平分析

mRNA 表达丰度汇总结果分析显示, 不同的内参基因在不同胁迫下的 mRNA 表达丰度存在差异。8 个内参基因的 mRNA 表达丰度在重金属镉胁迫下的排序为 *18S* (6.87~7.63) > *EF1- α* (13.05~15.02) > *RPL10* (13.65~14.69) > *RPL9* (13.73~14.71) > *ACT* (14.00~15.08) > *GAPDH* (16.00~18.34) > *TUB* (19.13~21.37) > *RPS18* (21.00~23.43) (图 3-A)。Flupyrimin 胁迫下的排序为 *18S* (8.62~10.32) > *RPL10* (16.40~19.17) > *EF1- α* (16.41~19.30) > *RPS18* (17.15~19.78) > *RPL9* (17.16~19.78) > *ACT* (17.28~19.70) > *GAPDH* (19.44~22.51) > *TUB* (21.18~23.30) (图 3-B)。Dinotefuran 胁迫下的排序为 *18S* (8.69~10.31) > *RPL10* (16.94~19.16) > *RPS18* (17.08~19.40) > *RPL9* (17.59~19.64) > *EF1- α* (17.03~20.48) > *ACT* (18.50~20.31) > *GAPDH* (20.19~22.90) > *TUB* (20.628~23.28) (图 3C)。SRDSBV 胁迫下的排序为 *18S* (6.38~12.06) > *EF1- α* (15.23~17.13) > *ACT* (15.18~18.07) > *RPL10* (16.09~17.52) > *RPL9* (16.67~17.32) > *RPS18* (16.84~18.26) > *GAPDH* (17.22~20.39) > *TUB* (18.20~19.00) (图 3-D)。在 4 个不同的样品中, 除 *18S* 表达丰度相对较高外, *EF1- α* 、*ACT*、*RPS18*、*RPL9*、*RPL10*、*TUB*、*GAPDH* 均属于正常水平范围。在重金属镉胁迫下, *18S*、*RPL9*、*RPL10* 的 Ct 值差异较小, 在 Flupyrimin 和 Dinotefuran 胁迫下 *18S*、*ACT*、*RPL9* 的 Ct 值差异较小, 在 SRBSDV 胁迫下, *TUB* 和 *RPL9* 的 Ct 值差异最小, 总体来看 *GAPDH* 在 4 个处理下的 Ct 值差异都较大 (图 3)。



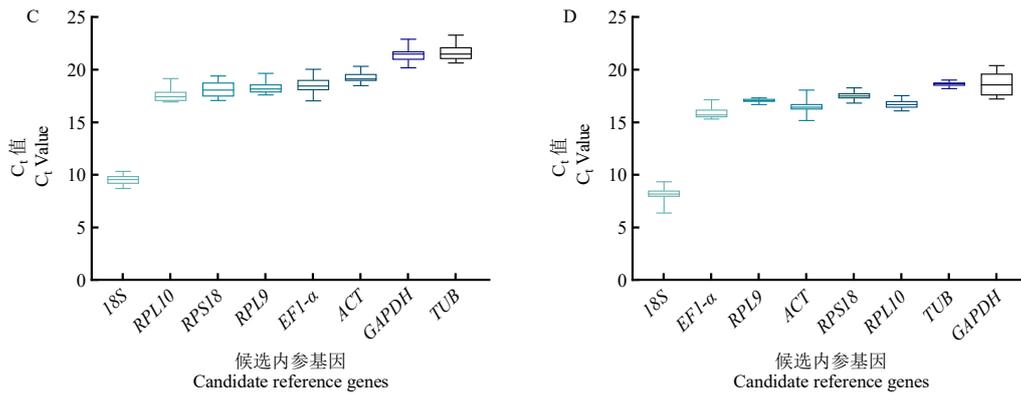


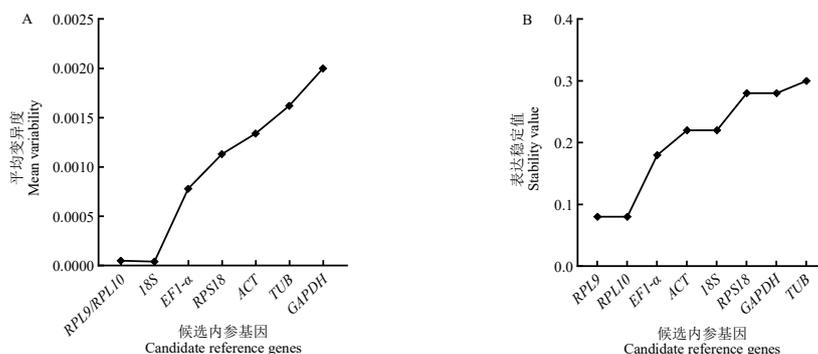
图3 8个候选内参基因在不同胁迫下的表达水平分析

Fig. 3 Expression levels of eight candidate reference genes in different stress

注: A, 重金属镉胁迫; B, Flupyrimin 胁迫; C, Dinotefuran 胁迫; D, SRBSDV 胁迫。Note: A, Heavy metal cadmium stress; B, Flupyrimin stress; C, Dinotefuran stress; D, SRBSDV stress.

2.3 重金属镉胁迫下内参基因稳定性分析

GeNorm 分析结果表明, 实验选择的 8 个内参基因的平均变异度 M 值均低于 1.5, 表明候选的 8 个内参基因在重金属镉胁迫下均可作为内参基因考虑, 其中 *RPL9* 和 *RPL10* 的 M 值同为 0.161, 是 8 个候选内参基因中 M 值最小的, 为最稳定的内参基因; *GAPDH* 的 M 值为 0.564, 是 8 个内参基因中 M 值最大的, 为相对最不稳定的内参基因, 稳定性排序依次为 *RPL9/RPL10* (0.00005) > *18S* (0.0004) > *EF1-α* (0.0007) > *RPS18* (0.0011) > *ACT* (0.00163) > *TUB* (0.00162) > *GAPDH* (0.0020) (图 4-A)。NormFinder 分析结果显示 *RPL9* 和 *RPL10* 的 SV 值最小, 同为 0.08, 是 Normfinder 软件推荐最稳定的内参基因, 稳定性排序依次为 *RPL9/RPL10* (0.08) > *EF1-α* (0.18) > *ACT/18S* (0.22) > *RPS18/GAPDH* (0.28) > *TUB* (0.3) (图 4-B)。Delta Ct 分析结果显示 *RPL9* 和 *RPL10* 的 SD (0.41) 值最小, 为最合适的内参基因选择, 稳定性排序依次为 *RPL9/RPL10* (0.41) > *18S* (0.48) > *EF1-α* (0.49) > *ACT* (0.60) > *RPS18* (0.61) > *TUB* (0.67) > *GAPDH* (0.69) (图 4-C)。BestKeeper 分析结果显示, 8 个内参基因的 SD 值均小于 1, 都可作为内参基因考虑, 但是 *RPL9* 和 *RPL10* 的 SV (0.93 和 1.15) 值最小, 相关系数 r (0.880 和 0.806) 值最大, 因此推测 *RPL9* 和 *RPL10* 为最稳定的内参基因。基因稳定性排序依次为 *18S* (0.12) > *RPL9* (0.13) > *RPL10* (0.16) > *EF1-α* (0.32) > *RPS18* (0.34) > *ACT* (0.40) > *TUB* (0.43) > *GAPDH* (0.54) (图 4-D)。



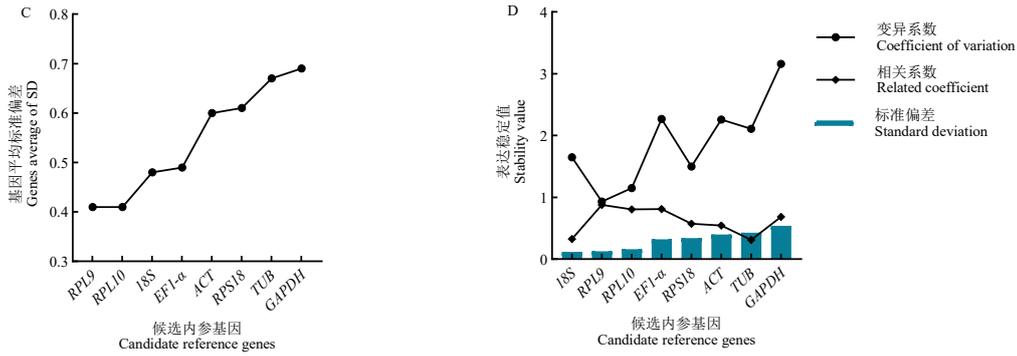


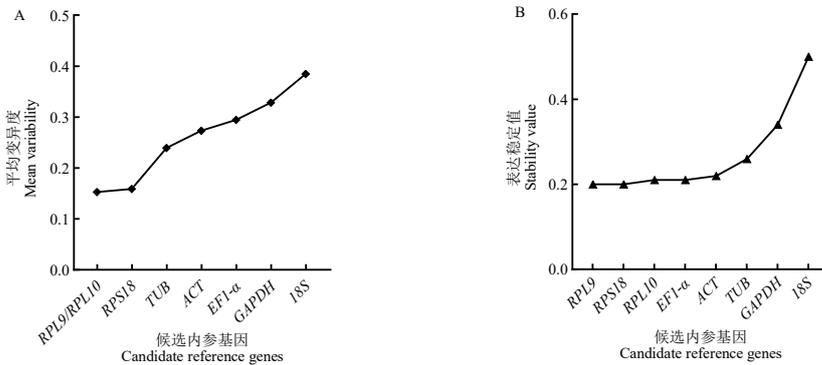
图 4 8 个候选内参基因在镉胁迫下的表达稳定性分析

Fig. 4 Expression stability analysis of 8 candidate reference genes in cadmium stress

注释: A, GeNorm 分析结果; B, NormFinder 分析结果; C, Delta Ct 分析结果; D, BestKeeper 分析结果, 图 5~图 7 同。Note: A, GeNorm analysis results; B, NormFinder analysis results; C, Delta Ct analysis results; D, BestKeeper analysis results, Fig. 5-7 same.

2.4 药剂 Flupyrimin 胁迫下内参基因稳定性分析

在 Flupyrimin 胁迫下, Delta Ct 和 GeNorm 两种程序都计算出 *RPL9* 和 *RPL10* 同时为最稳定的内参基因, *18S* 为最不稳定的内参基因。GeNorm 计算出 8 个内参基因的稳定性排序依次为 *RPL9/RPL10* (0.1529) > *RPS18* (0.1588) > *TUB* (0.2395) > *ACT* (0.2735) > *EF1- α* (0.2943) > *GAPDH* (0.3283) > *18S* (0.3844) (图 5-A)。Delta Ct 计算出的稳定性排序依次为 *RPL9* (0.32) > *RPL10* (0.33) > *RPS18* (0.33) > *ACT* (0.35) > *EF1- α* (0.37) > *TUB* (0.38) > *GAPDH* (0.45) > *18S* (0.54) (图 5-C)。NormFinder 计算出 *RPL9* 和 *RPS18* 的 SV (0.2) 值最小, 为最稳定的候选内参基因, *18S* 的 SV (0.5) 值最大, 为最不稳定的内参基因, 稳定性的排序依次为 *RPL9* (0.20) > *RPS18* (0.20) > *RPL10* (0.21) > *EF1- α* (0.21) > *ACT* (0.22) > *TUB* (0.26) > *GAPDH* (0.34) > *18S* (0.5) (图 5-B)。BestKeeper 软件计算出 *18S* 和 *RPL9* 的 SD 值最小, 分别为 0.36 和 0.61, 可作为较为稳定的内参基因选择, 但是 *18S* 的 CV 值比较大, 且相关系数为 8 个内参基因中最低的, 所以通过 BestKeeper 计算认为 *RPL9* 是最稳定的基因 (图 5-D)。



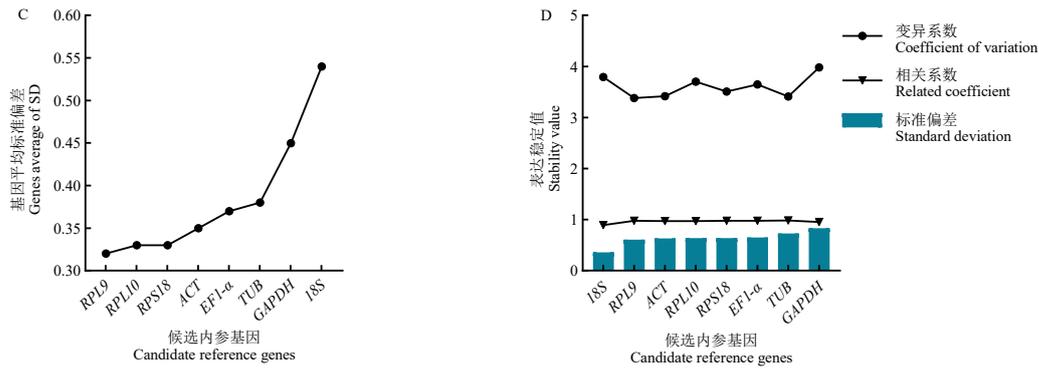
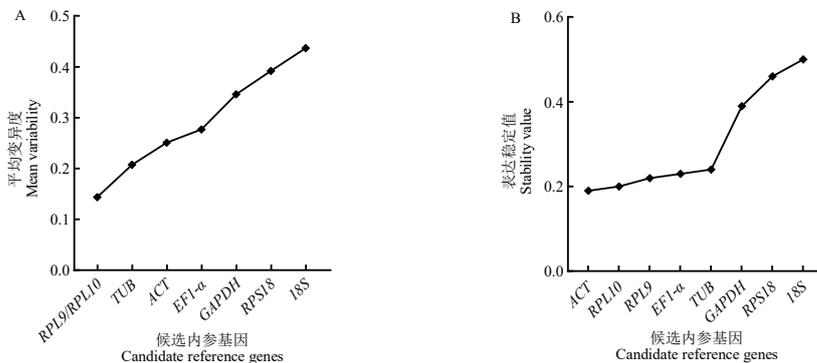


图 5 8 个候选内参基因在 Flupyrimin 胁迫下表达稳定性分析

Fig.5 Expression stability analysis of 8 candidate reference genes in Flupyrimin stress

2.5 药剂 Dinotefuran 胁迫下内参基因稳定性分析

在 Dinotefuran 胁迫下，GeNorm 计算出 *RPL9* 和 *RPL10* 为最稳定的内参基因，两者的 M 值同为 0.1435，是 8 个内参基因中最小的，而 *18S* 的 M 值最大，为 0.43658，是最不稳定的内参基因。GeNorm 计算出 8 个内参基因的稳定性排序依次为 *RPL9/RPL10* (0.1435) > *TUB* (0.20718) > *ACT* (0.2509) > *EF1- α* (0.2770) > *GAPDH* (0.3457) > *RPS18* (0.3918) > *18S* (0.43658) (图 6-A)。Normfinder 计算结果显示 *ACT* 的稳定值 CV 最小，其 CV 值是 0.19，稳定性排序依次为 *ACT* (0.19) > *RPL10* (0.20) > *RPL9* (0.22) > *EF1- α* (0.23) > *TUB* (0.24) > *GAPDH* (0.39) > *RPS18* (0.46) > *18S* (0.50) (图 6-B)。Delta Ct 计算结果显示 *ACT* 为最稳定的基因，其 SD 值为 0.34，其次是 *RPL9*，SD 值为 0.35，然后依次为 *RPL10* (0.35) > *TUB* (0.38) > *EF1- α* (0.39) > *18S* (0.45) > *GAPDH* (0.48) > *RPS18* (0.52) (图 6-C)。BestKeeper 计算结果显示各基因的 SD 值依次为 *18S* (0.35) > *ACT* (0.42) > *EF1- α* (0.60) > *RPL9* (0.49) > *RPL10* (0.53) > *GAPDH* (0.53) > *TUB* (0.63) > *RPS18* (3.26)，*18S* 排在最前面，但是其 CV 值太大，相关系数 r 较小，所以推荐 *ACT* 和 *RPL9* 为最稳定的内参基因 (图 6-D)。



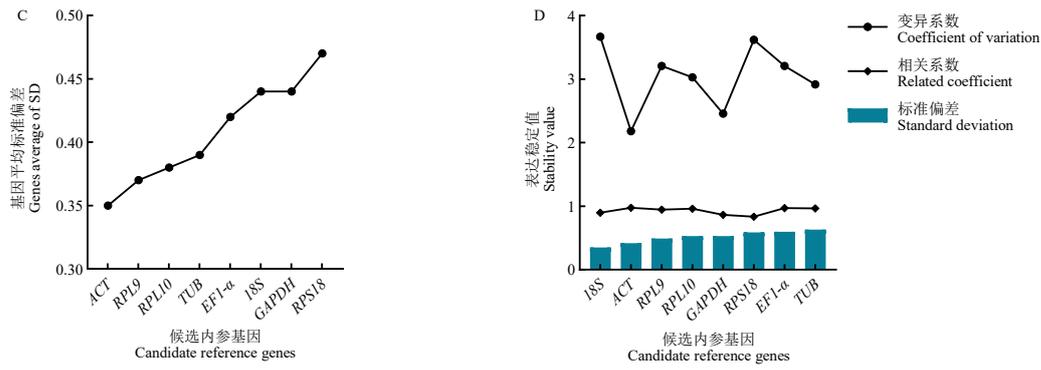
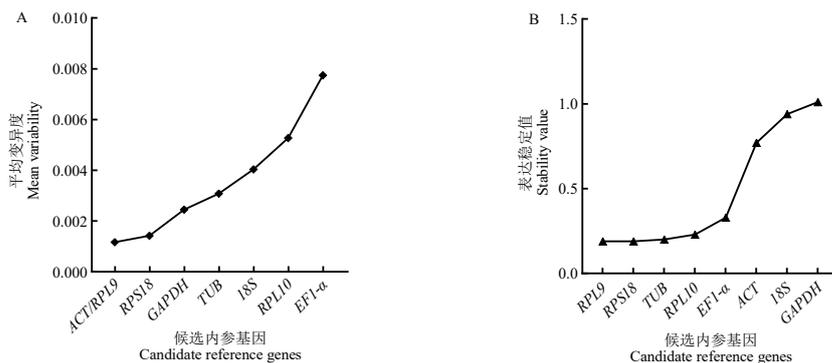


图 6 8 个候选内参基因在 Dinotefuran 胁迫下的表达稳定性分析

Fig. 6 Expression stability analysis of 8 candidate reference genes in Dinotefuran stress

2.6 SRBSDV 胁迫下内参基因稳定性分析

GeNorm 计算结果显示 8 个内参基因的稳定性排序依次为 *ACT/RPL9* (0.0011) > *RPS18* (0.0014) > *GAPDH* (0.0024) > *TUB* (0.0030) > *18S* (0.0040) > *RPL10* (0.0052) > *EF1- α* (0.0077) (图 7-A), 其中 *ACT* 和 *RPL9* 是 M 值最小的两个内参基因, *EF1- α* 的 M 值最大, 是最不稳定的内参基因。Normfinder 计算结果显示 *RPL9* 和 *RPS18* 的稳定值 CV (0.19) 最小, 为 Normfinder 推荐的最稳定的内参基因, 稳定性排序依次分别为 *RPL9/RPS18* (0.19) > *TUB* (0.20) > *RPL10* (0.23) > *EF1- α* (0.33) > *ACT* (0.77) > *18S* (0.94) > *GAPDH* (1.01) (图 7-B)。Delta Ct 计算结果显示 *TUB* 为最稳定的基因, 其稳定值为 1.01, 其次是 *RPL10*, 其稳定值为 1.02, 然后依次为 *RPL9* (1.03) > *RPS18* (1.04) > *EF1- α* (1.07) > *ACT* (1.28) > *18S* (1.48) > *GAPDH* (3.98) (图 7-C)。BestKeeper 计算结果显示各基因的 SD 值从大到小依次为 *RPL9* (0.11) > *TUB* (0.15) > *RPS18* (0.26) > *RPL10* (0.28) > *18S* (0.42) > *EF1- α* (0.42) > *GAPDH* (1.03) > *ACT* (1.61), *RPL9* 的 SD 值最小, 为稳定的内参基因, 其次是 *TUB* 基因 (图 7-D)。



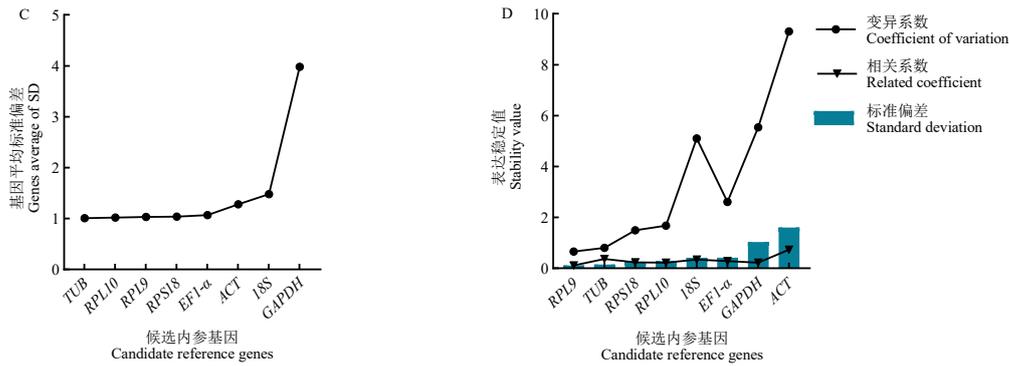


图 7 8 个候选内参基因在 SRBSDV 胁迫下的表达稳定性分析

Fig. 7 Expression stability analysis of 8 candidate reference genes in SRBSDV stress

2.7 不同胁迫下最佳内参基因及数目的确定

GeNorm 计算的 V_n/V_{n+1} 值显示，以上不同胁迫下的 V_2/V_3 值均小于阈值 0.15 (图 8)，因此，在研究白背飞虱的重金属镉胁迫、药剂 Flupyrimin 和 Dinotefuran 胁迫和 SRDSBV 胁迫下的目的基因表达分析时，需引入两个内参基因对目的基因的表达水平进行归一。最后利用 RefFinder 对不同处理下内参基因稳定性的几何平均值进行排序，结果显示在镉胁迫下白背飞虱的 8 个内参基因综合稳定性排序从高到低依次为 $RPL9 > RPL10 > 18S > EF1-\alpha > ACT > RPS18 > TUB > GAPDH$ ；Flupyrimin 胁迫下的稳定性排序依次为 $RPL9 > RPL10 > RPS18 > ACT > 18S > EF1-\alpha > TUB > GAPDH$ ；Dinotefuran 胁迫下的稳定性排序依次为 $ACT > RPL9 > RPL10 > TUB > EF1-\alpha > 18S > GAPDH > RPS18$ ；SRBSDV 胁迫下的排序依次为 $TUB > RPL9 > RPL10 > RPS18 > EF1-\alpha > ACT > 18S > GAPDH$ 。综合 GeNorm 和 RefFinder 分析结果，得出在以上 4 种胁迫下对靶标基因进行表达量分析时需引入 2 个内参基因进行标准化，具体分别为重金属镉胁迫下的最佳内参基因为 $RPL9$ 和 $RPL10$ ，Flupyrimin 胁迫下最稳定的内参基因为 $RPL9$ 和 $RPL10$ ，Dinotefuran 胁迫下最稳定的内参基因为 ACT 和 $RPL9$ ，SRDSBV 胁迫下最稳定的内参基因为 TUB 和 $RPL9$ 。

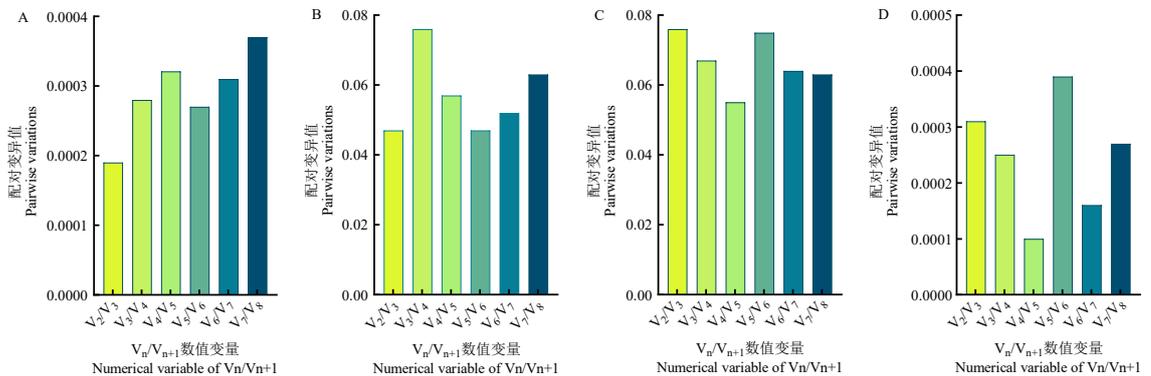


图 8 不同胁迫下白背飞虱候选内参基因数量的配对差异分析 (V_n/V_{n+1})

Fig. 8 Pairwise variation analysis (V_n/V_{n+1}) of the number of candidate reference genes in *Sogatella furcifera* various stress

注释: A, 重金属镉胁迫; B, Flupyrimin 胁迫; C, Dinotefuran 胁迫; D, SRBSDV 胁迫。Note: A, Heavy metal cadmium stress; B, Flupyrimin stress; C, Dinotefuran stress; D, SRBSDV stress

表 2 基于 RefFinder 软件分析候选内参基因的表达稳定性

Table 2 Expression stability of the candidate reference genes was analyzed by RefFinder software

排序 Rank	镉胁迫		Flupyrimin 胁迫		Dinotefuran 胁迫		SRBSDV 胁迫	
	cadmium stress		Flupyrimin stress		Dinotefuran stress		SRBSDV stress	
	基因 gene	稳定值 Stability value						
1	<i>RPL9</i>	1.00	<i>RPL9</i>	1.19	<i>ACT</i>	1.68	<i>TUB</i>	1.19
2	<i>RPL10</i>	1.86	<i>RPL10</i>	2.00	<i>RPL9</i>	1.86	<i>RPL9</i>	1.97
3	<i>18S</i>	2.71	<i>RPS18</i>	3.57	<i>RPL10</i>	2.59	<i>RPL10</i>	2.71
4	<i>EF1-α</i>	4.0	<i>ACT</i>	3.94	<i>TUB</i>	3.83	<i>RPS18</i>	4.00
5	<i>ACT</i>	5.23	<i>18S</i>	4.76	<i>EF1-α</i>	4.43	<i>EF1-α</i>	4.16
6	<i>RPS18</i>	5.73	<i>EF1-α</i>	5.23	<i>18S</i>	5.44	<i>ACT</i>	5.73
7	<i>TUB</i>	7.00	<i>TUB</i>	5.63	<i>GAPDH</i>	6.09	<i>18S</i>	7.00
8	<i>GAPDH</i>	8.00	<i>GAPDH</i>	7.24	<i>RPS18</i>	7.44	<i>GAPDH</i>	8.00

表 3 多算法综合评估后各胁迫最优内参基因确定

Table 3 Identification of Optimal Reference Genes under Various Stress through Multi-Algorithm Evaluation

胁迫条件 Stress conditions	推荐内参基因 Recommended reference genes
重金属镉胁迫 (Heavy metal cadmium stress)	<i>RPL9</i> 和 <i>RPL10</i>
Flupyrimin 胁迫 (Flupyrimin stress)	<i>RPL9</i> 和 <i>RPL10</i>
Dinotefuran 胁迫 (Dinotefuran stress)	<i>ACT</i> 和 <i>RPL9</i>
SRBSDV 胁迫 (SRBSDV stress)	<i>TUB</i> 和 <i>RPL9</i>

2.8 内参基因稳定性验证

以谷胱甘肽-S-转移酶基因 *gstl1* 和卵黄原蛋白基因 *Vg1* 为靶标基因对内参基因的稳定性进行验证, 结果显示 (图 9) 在镉胁迫下, 当选择组合或单独的稳定内参基因进行归一处理时, *gstl1* 基因在不同浓度镉处理下的相对表达模式呈现相似的趋势, 而使用两个内参基因作为归一标准时又比单独使用时效果好; 相反, 当使用相对不稳定的内参基因 *GAPDH* 进行归一时, *gstl1* 的相对表达模式表现出和前两者都不一致。在农药 Flupyrimin 和 Dinotefuran 胁迫下, 当选择单独或组合的稳定内参基因进行归一处理时, *gstl1* 基因在不同剂量农药胁迫下表达量的标准误差均较小, 同样是组合使用的效果比单独使用的效果好, 但使用不稳定的内参基因 *GAPDH* 和 *RPS18* 作为内参基因时, 两种胁迫下 *gstl1* 的表达水平标准误差较大, 实验结果不可靠。在 SRDSBV 胁迫条件中也是类似, 组合和单独使用筛选到的内参基因 *TUB* 和 *RPL9* 作归一处理时, *Vg1* 基因表达水平误差较小, 而组合使用的误差更小, 使用稳定性最差的 *GAPDH* 为归一因子时, 表达量标准误差较大。

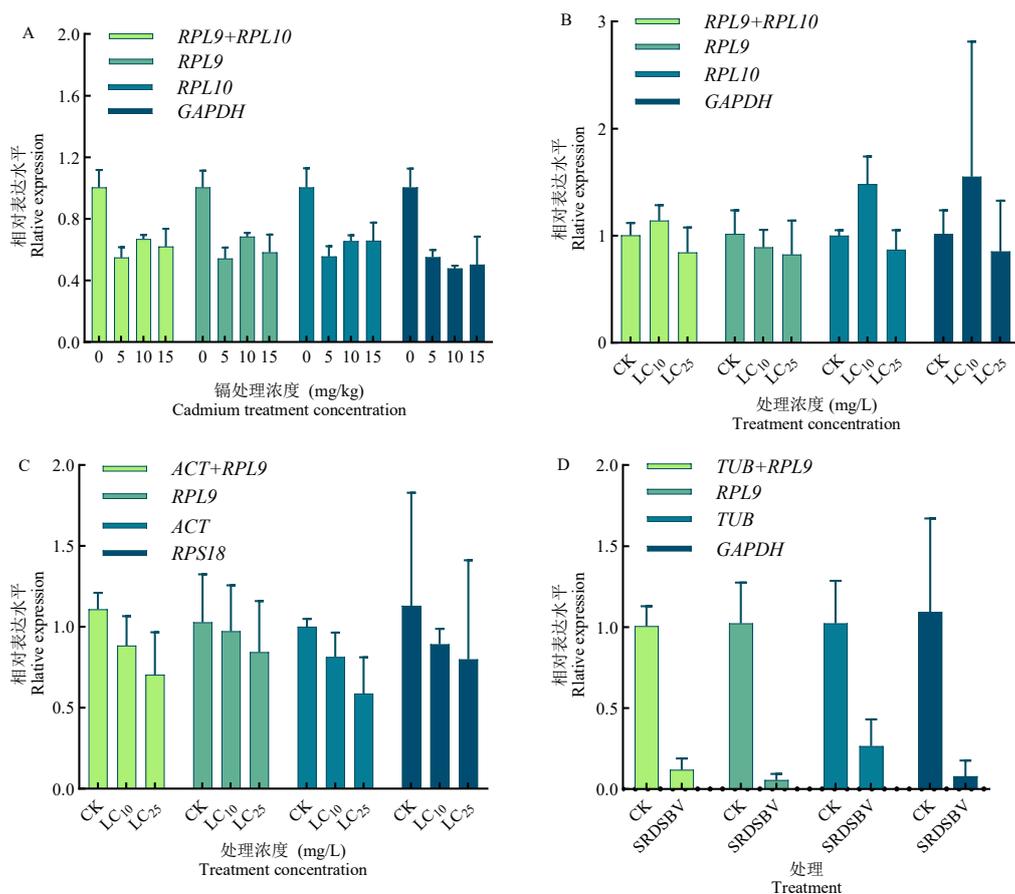


图9 使用不同内参基因分析靶标基因 *gstd1* 和 *Vgl* 在不同胁迫下的相对表达量

Fig. 9 Relative expression level of target genes *gstd1* and *Vgl* in *Sogatella furcifera* under different stress analyzed by using different reference genes

注：A，重金属镉胁迫；B，Flupyrimin 胁迫；C，Dinotefuran 胁迫；D，SRDSBV 胁迫，误差条表示标准误差（SD），图A、B、C的目的基因为 *gstd1*，图D的目的基因为 *Vgl*。Note: A, Heavy metal cadmium stress; B, Flupyrimin stress; C, Dinotefuran stress; D, SRDSBV stress, The error bar represented the standard deviation (SD), the target gene for Fig. A, B, and C was *gstd1*, and the Fig. D was *Vgl*.

3 结论与讨论

利用分子生物学手段揭示白背飞虱的生理及行为学机制，有利于开发防治新技术。实时荧光定量由于操作简易，速度快，污染少等众多优点被广泛用于分子生物学领域分析基因表达，一般分为绝对定量和相对定量两种，对基因的表达量分析主要使用相对定量，这种方法要求计算表达量时选择合适的内参基因对目的基因表达进行归一。内参基因指在大多数下相对表达较稳定的基因，通常情况管家基因会是供选择的对象（Chapman *et al.*, 2015）。目前管家基因在作为内参基因使用时的稳定性评价已经有不少报道，包括有对不同组织、不同性别、不同发育阶段及不同处理条件等的内参基因评价（Yang *et al.*, 2020; Fu *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Yuan *et al.*, 2024）。但是相继有研究报道这些管家基因在不同的条件下的表达稳定性并不是绝对恒定不变的，并不存在一个在任何条件下都能稳

定表达的内参基因 (Maroniche *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2024)。因此在对目的基因表达水平进行研究时应该综合考虑内参基因的选择, 多方面评价和筛选。

本研究分别采用 GeNorm、NormFinder、Delta Ct 和 BestKeeper 对候选内参基因稳定性进行分析, 结果发现即使在相同的胁迫下, 同一内参基因的稳定性排序在不同的软件之间也存在差异。在镉胁迫下, GeNorm、NormFinder、Delta Ct 和 BestKeeper 4 个软件的分析结果都较为一致, 虽然 *RPL9* 和 *RPL10* 都为最稳定的候选内参基因, *TUB* 和 *GAPDH* 都为最不稳定的内参基因, 但是 *18S*、*RPS18*、*EF1- α* 和 *ACT* 在 4 个软件中的稳定性排序都不同。在 Flupyrimin 胁迫和 Dinotefuran 胁迫下各软件之间的分析结果也存在差异, 例如, *18S* 在前三个程序中的稳定性排序均排在最后一位, 而在 BestKeeper 程序中排名第一。在 SRDSBV 胁迫下也存在类似情况, *ACT* 在 GeNorm 中的稳定性排序为第一, 而在其他三个程序中的稳定性排序都比较靠后。造成这种软件之间分析结果差异的原因可能是由于各种软件采用的数据统计方法不同, 导致不同软件得到的候选基因稳定性和排名存在差异。这种现象在叶甲 *Diorhabdarybakowi*、高粱条螟 *Chilo sacchariphagus*、蜜蜂等昆虫中也存在类似 (Xu *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2023; Xi *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024)。所以为了避免单一软件之间分析结果造成的差异性, 最后还需要结合 RefFinder 软件的分析结果, 综合各软件对内参基因的稳定性评价才能选出最佳的内参基因。使用单一的内参基因 qRT-PCR 数据归一可能会影响实验结果的准确性, 需要使用多个内参基因对目的基因进行标准化 (Concha *et al.*, 2012), 因此需根据 GeNorm 软件计算基因配对变异值 V_n/V_{n+1} 来确定所需最佳内参基因数量。GeNorm 软件计算出 $V_2/V_3 < 0.15$, 推荐在重金属镉、Flupyrimin 和 Dinotefuran 胁迫及 SRDSBV 胁迫下进行 qRT-PCR 实验时需引入 2 个内参基因对目的基因进行标准化处理。相关研究报道昆虫在受到重金属胁迫或农药处理后, 其体内的抗氧化解毒酶基因表达水平会受到影响, 如日粮镉暴露抑制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 解毒酶基因 *GST* 的表达, 导致其存活率降低 (Zhan *et al.*, 2017), 经过吡虫啉或高效氯氰菊酯处理后的豆天蛾 *Clanis bilineata* 的谷胱甘肽-S-转移酶活性呈先升高后降低的趋势 (李晓峰等, 2024)。WBPH 感染 SRBSDV 后其繁殖力会显著低于正常种群 (Xu *et al.*, 2014), 推测其 *Vg* 表达水平可能会受到抑制。因此我们利用 *gstl1* 和 *Vg1* 为目的基因对筛选到的内参基因稳定性进行鉴定, 结果显示使用组合内参基因的标准误差是小于使用单独内参基因的, 小于使用稳定性排名最靠后的内参基因的标准误差, 这表明以两个内参基因为归一标准的实验结果更可信。

RPL9 和 *RPL10* 是核糖体大亚基的重要组成成分, 主要参与核糖体的组成及蛋白质的合成, 在白背飞虱的生长发育过程中有着重要的作用。目前, 核糖体蛋白基因在昆虫内参基因的研究上具有普适性, 有助于推进内参基因的筛选工作 (高雨晴等, 2023)。通过对实验结果的分析显示, 在镉胁迫和杀虫剂 Flupyrimin 胁迫下, 相较于其他候选基因, *RPL9* 和 *RPL10* 确实更适合作为内参基因使用, 在 Dinotefuran 胁迫和 SRDSBV 胁迫下 *RPL9* 的适用性也较好。这与灰飞虱若虫内参基因的筛选中报到的 *RPL9* 的稳定性较好, 可作为稳定的内参基因

使用的情况相像 (He *et al.*, 2014); 在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 不同处理下内参基因筛选的实验中, 也证实了 *RPL10* 在不同组织、不同发育阶段及不同温度处理下都能够稳定表达 (Han *et al.*, 2021)。在已报到的白背飞虱的不同发育阶段、不同组织和不同温度胁迫下的内参基因稳定性评价的研究中, 结果也显示 *RPL9* 和 *RPL10* 较稳定, 可推荐为内参基因使用 (An *et al.*, 2016)。可见 *RPL9* 在以上胁迫下的确实存在较广泛的适用范围, 可对后续多种实验条件下白背飞虱内参基因的筛选工作提供一个准确的参考。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*) 是糖酵解的中心酶之一, 在进化上十分保守, 其在许多基因表达研究中常被用作内参基因使用, 例如在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和大螟 *Sesamia inferens* 的不同发育阶段、桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis* 的不同组织、辣椒象鼻虫 *Anthonomus eugeni* Cano 和多异瓢虫 *Hippodamia variegata* 中目的基因的表达水平研究中都有被用作内参基因使用 (Lu *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2021)。在本次实验中 *GAPDH* 都不适宜作为稳定的内参基因使用, 其中 SRDSBV 胁迫下我们筛选到的最稳定的内参基因是 *TUB* 和 *RPL9*, 而 *GAPDH* 稳定性排序最靠后, 为最不稳定的内参基因, 这与已报道的白背飞虱感染 SRDSBV 处理中 *GAPDH* 是最稳定的内参基因的情况相反 (An *et al.*, 2026)。在同为半翅目昆虫的烟粉虱 *Bemisia tabaci* 中有报道, *GAPDH* 在所有研究的样品中显示出最低的稳定性 (Su *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2017)。分析出现这样的结果可能是由于样品龄期之间的差异或者是取食及营养条件等的不同而导致的差异 (徐红星等, 2019; Yin *et al.*, 2020; 娇启启等, 2022)。总之, 任何一个内参基因并不是在所有条件下都适合作为基因表达水平分析的归一标准, 因此, 在使用 qRT-PCR 技术对目的基因表达水平进行分析时, 首先对内参基因的筛选是有必要的, 保证内参基因的表达稳定性能够使我们的研究结果更加具有可靠性和说服力。

本研究针对白背飞虱在重金属镉胁迫、化学药剂胁迫及 SRDSBV 病毒胁迫 3 种特定条件下的内参基因进行了系统性筛选。鉴于不同胁迫对白背飞虱的作用机制存在差异, 本研究筛选获得的内参基因组合在其他胁迫条件下的适用性仍需进一步验证。此外, 由于物种间基因表达调控机制的差异性, 这些内参基因在其他物种中的适用性也仍然有待考证。本研究结果可为利用 qRT-PCR 技术分析白背飞虱在重金属镉胁迫、植物病毒胁迫及抗药性相关基因表达差异提供可靠的内参基因选择方案, 为后续相关基因的功能解析和分子机制研究奠定重要基础。

参考文献 (References)

- An XK, Hou ML, Liu YD. Reference gene selection and evaluation for gene expression studies using qRT-PCR in the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 109 (2): 879-886.
- Cao Y, Pan F, Zhou Q, *et al.* Transmission characteristics of *Sogatella furcifera*: A vector of the southern rice black-streaked dwarf virus [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (5): 1314-1320. [曹杨, 潘峰, 周倩, 等. 南方水稻黑条矮缩病毒介体昆虫白背飞虱的传毒特性 [J]. *应用昆虫学报*, 2011, 48 (5): 1314-1320]
- Chapman JR, Waldenstrom J. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10 (11): e0141853.
- Concha C, Edman RM, Belikoff EJ, *et al.* Organization and expression of the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*) *hsp23*, *hsp24*,

- hsp70* and *hsp83* genes [J]. *Insect Molecular Biology*, 2012, 21 (2): 169-180.
- Dai TM, Lu ZC, Liu WX, *et al.* Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis during biological invasions: The thermal adaptability of *Bemisia tabaci* MED [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (3): e0173821.
- Di N, Hladun KR, Zhang K, *et al.* Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers [J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 530-538.
- Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27 (2-3): 126-139.
- Fu HY, Huang TB, Yin C, *et al.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR normalization in *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) under insecticides stress [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 12: 818210.
- Gao YQ, Ma ZQ, Li ZX, *et al.* Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (5): 663-675. [高雨晴, 马子淇, 李真祥, 等. 豌豆蚜实时荧光定量 PCR 内参基因的评估 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (5): 663-675]
- Gu LL. The new pesticides registered or launched recently [J]. *World Pesticide*, 2022, 44 (3): 9-20, 46. [顾林玲. 新近登记、上市的 16 种农药品种 [J]. 世界农药, 2022, 44 (3): 9-20, 46]
- Han SP, Qin QJ, Wang D, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for qRT-PCR in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Insects*, 2021, 12 (10): 902.
- He XT, Liu CC, Li ZQ, *et al.* Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Laodelphax striatellus* [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13 (4): 811-818.
- Jiao QQ, Ye CL, Feng YL, *et al.* Screening of internal reference genes for RT-qPCR suitable for brown planthopper at the nymphal and the adult stage [J]. *Journal of China University of Metrology*, 2022, 33 (3): 443-452. [矫启启, 叶成龙, 冯娅琳, 等. 褐飞虱若虫, 成虫期荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 中国计量大学学报, 2022, 33 (3): 443-452]
- Kang ZW, Liu FH, Pang RP, *et al.* Effect of Sublethal Doses of Imidacloprid on the Biological Performance of Aphid Endoparasitoid *Aphidius gifuensis* (Hymenoptera: Aphidiidae) and Influence on Its Related Gene Expression [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1729.
- Kim YH, Cha JH, Kim HM, *et al.* Validation of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction assay of honeybee under various pesticide treatment conditions [J]. *Entomological Research*, 2023, 53: 82-92.
- Kong WZ, Lu XL, Ran XT, *et al.* Comprehensive assessment of reference gene expression within the Whitefly *Dialeurodes citri* using RT-qPCR [J]. *Genes (Basel)*, 2024, 15 (3): 318.
- Li S, Huang JY, Wang Y, *et al.* Dynamic gene expression of southern rice black-streaked dwarf virus during its infection in rice plants and vector insects [J]. *Virology Journal*, 2024, 589: 109949.
- Li XF, Guo MM, Fan JW. Influences of four insecticides on virulence and detoxification enzyme activity of larvae of *Clanis bilineata* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2024, 52 (4): 144-149. [李晓峰, 郭明明, 樊继伟. 4 种杀虫剂对豆天蛾幼虫毒力及解毒酶活性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2024, 52 (4): 144-149]
- Liu D, Li Z, Hou M. Comparison of transcriptome responses between *sogatella furcifera* females that acquired southern rice black-streaked dwarf virus and not [J]. *Insects*, 2022, 13 (2): 182.
- Liu J, Cheng JK, He CS, *et al.* Advancements on the insecticides application and key technique in the control of disaster pests in paddy field [J]. *Modern Agrochemicals*, 2024, 23 (4): 7-12. [刘姣, 程季康, 何承帅, 等. 水稻重要害虫防治的杀虫剂应用及关键技术研究进展 [J]. 现代农药, 2024, 23 (4): 7-12]
- Lu YH, Yuan M, Gao XW, *et al.* Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (7): e68059.
- Lu YH, Zheng XS, Liang Q, *et al.* Evaluation and validation of reference genes for SYBR Green qRT-PCR normalization in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2015, 18 (4): 669-675.
- Majerowicz D, Alves-Bezerra M, Logullo R, *et al.* Looking for reference genes for real-time quantitative PCR experiments in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2011, 20 (6): 713-722.
- Maroniche GA, Sagadin M, Mongelli VC, *et al.* Reference gene selection for gene expression studies using RT-qPCR in virus-infected planthoppers [J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 308.
- Miao YT, Deng Y, Jia HK, *et al.* Proteomic analysis of watery saliva secreted by white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (5): e0193831.
- Pinheiro DH, Siegfried BD. Selection of reference genes for normalization of RT-qPCR data in gene expression studies in *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 5070.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, *et al.* Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313 (4): 856-862.
- Su Y, He WB, Wang J, *et al.* Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in the mediterranean species of the

- Bemisiatabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2013, 106 (3): 1446-1455.
- Tang JR, Liang GM, Dong SQ, *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Aethisdissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae) under different conditions [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 842195.
- Wang J, Huang HX, Zhu ZY, *et al.* Transfer of heavy metals along phytophagous insects-natural enemies and their effects on pest biological control in agroecosystems [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2024, 46 (4): 781-795. [王杰, 黄赫曦, 朱正阳, 等. 农田重金属沿植食性昆虫-天敌昆虫传递及对害虫生物防治的影响 [J]. *环境昆虫学报*, 2024, 46 (4): 781-795]
- Wang L, Tang N, Gao XL, *et al.* Genome sequence of a rice pest, the white-backed planthopper (*Sogatella furcifera*) [J]. *Gigascience*, 2017, 6 (1): 1-9.
- Wang Y, Zhang YQ, Wu ZW, *et al.* Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in developing chicken embryonic ovary [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50 (4): 3379-3387.
- Wang ZX, Shang XK, Wei JL, *et al.* Evaluation and validation of reference genes for gene expression analysis using qRT-PCR in the sugarcane stem borer *Chilo sacchariphagus* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Insects*, 2024, 15 (8): 594.
- Wu L, Li YQ, Ding WB, *et al.* Functional roles of nicotinic acetylcholine receptors in dinotefuran and flupyrimin toxicity and their sublethal effects on *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2024, 117 (6): 2618-2627.
- Wu W, Liu HQ, Dong Y, *et al.* Determination of suitable RT-qPCR reference genes for studies of gene functions in *Laodelphax striatellus* (Fallen) [J]. *Genes (Basel)*, 2019, 10 (11): 887.
- Xi BX, Cui XN, Shang SQ, *et al.* Antennal transcriptome evaluation and analysis for odorant-binding proteins, chemosensory proteins, and suitable reference genes in the leaf beetle pest *Diorhabdarybakowiweise* (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. *Insects*, 2024, 15 (4): 251.
- Xie FL, Wang JY, Zhang BH. RefFinder: A web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 23 (2): 125.
- Xie JX, Liu TH, Khashaveh A, *et al.* Identification and evaluation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) under different biotic and abiotic conditions [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 669510.
- Xu H, He X, Zheng X, *et al.* Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) directly affects the feeding and reproduction behavior of its vector, *Sogatella furcifera* (Horvath) (Hemiptera: Delphacidae) [J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 55.
- Xu HX, Wang GR, Lu YH, *et al.* Screening reference genes and evaluating of their expression stability for qRT-PCR normalization in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralididae) [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33 (1): 75-84. [徐红星, 王国荣, 鲁艳辉, 等. 二化螟实时荧光定量 PCR 内参基因筛选和表达稳定性评价 [J]. *中国水稻科学*, 2019, 33 (1): 75-84]
- Xu J, Lu MX, Cui YD, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for expression analysis using qRT-PCR in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2017, 110 (2): 683-691.
- Yang L, Hu XJ, Xu ZF, *et al.* Screening of reference genes for qRT-PCR in *Conogethes punctiferalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (11): 1266-1277.
- Yang XJ, Zheng HL, Liu YY, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Aquaticus leii* (Coleoptera: Lampyridae) under five different experimental conditions [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 555233.
- Yin JJ, Sun LL, Zhang QH, *et al.* Screening and evaluation of the stability of expression of reference genes in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebididae) using qRT-PCR [J]. *Gene*, 2020, 749: 144712.
- Yuan FM, Xie Z, Li Z, *et al.* Screening of reference genes for gene expression study in different tissues from the transcriptome data of the vector leafhopper *Psammotettix striatus* [J]. *Gene*, 2024, 927: 148696.
- Yuan M, Lu YH, Zhu X, *et al.* Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvatalugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (1): e86503.
- Zhan HX, Zhang JP, Chen Z, *et al.* Effects of Cd²⁺ exposure on key life history traits and activities of four metabolic enzymes in *Helicoverpa armigera* (Lepidopteran: Noctuidae) [J]. *Chemistry and Ecology*, 2017, 33 (4): 325-338.
- Zhang M, Li ZP, Zhao XR, *et al.* Selection and validation of candidate reference genes for gene expression analysis in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) by qRT-PCR [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2024, 46 (1): 174-183. [张敏, 李子鹏, 赵欣然, 等. 绿豆象实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. *环境昆虫学报*, 2024, 46 (1): 174-183]
- Zhang QH, Gao BL, Qu C, *et al.* Selection and evaluation of reference genes for miRNA expression analysis in *Bemisiatabaci* under insecticide tolerance [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 899756.
- Zhao SQ, Miao WL, Sheng S, *et al.* Cadmium exposure impairs development, detoxification mechanisms and gene expression of *Glyphodespyloalis Walker* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. *Agronomy*, 2024, 14 (3): 626.