

RNAi에 의한 담배가루이(*Bemisia tabaci*, 가루이과, 노린재목)의 개체군 밀도변화

고나연 · 윤영남*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Change of population density of tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*, Aleyrodidae, Hemiptera) by RNAi

Na-Yeon Ko, Young-Nam Youn*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

Received on 23 February 2015, revised on 11 March 2015, accepted on 12 March 2015

Abstract : Ninety genes randomly selected from tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*) cDNA library was studied for selecting target gene in order to control of tobacco whitefly using TRV-VIGS vector (tobacco rattle virus-virus induced gene silencing vector) with RNAi. First of all, the occurrence of *B. tabaci* adult according to agro-infiltration of TRV was no significant difference. And that of TRV inserted tobacco whitefly cDNA showed a significant difference in each sample. P CV and N CV sample were more than 80% could be confirmed in 5 samples, for example, wh11, wh36, wh46, wh50 and wh71. Lastly, the occurrence of nymph and egg also showed a significant difference in each sample. That could be confirmed in 11 samples, for example, wh01, wh09, wh10, wh15, wh16, wh23, wh24, wh48, wh64 and wh66. In case of wh46, wh50 and wh71 sample could be confirmed that occurrence of *B. tabaci* adult was many, but occurrence of *B. tabaci* nymph and egg was a little. So sample showed a physioecological good effect to control of whitefly need to be investigated variation of gene expression in whitefly body using qRT-PCR through individual test.

Key words : *Bemisia tabaci*, cDNA library, RNAi, TRV VIGS vector

I. 서론

노린재목(Hemiptera) 가루이과(Aleyrodidae)에 속하는 담배가루이(*Bemisia tabaci*)는 500종 이상의 넓은 기주 범위를 가지고 있으며, 열대 및 아열대 지방에서 발생하는 주요한 흡즙성 해충이다(Secker et al., 1998; Perring, 1993). 담배가루이는 식물의 체관부 흡즙으로 인한 직접적인 피해를 주고, 간접적으로는 감로배설로 인한 그을음 병을 유발하여 시설재배 작물의 상품성과 수량에 큰 영향을 미친다(Byrne, 1999; Bedford et al., 1994). 뿐만 아니라 100종 이상의 바이러스를 매개한다고 알려져 있어 문제가 되고 있다(Jones, 2003). 특히 TYLCV (Tomato yellow leaf curl virus)는 전 세계적으로 토마토 품종을 광범위하

게 피해를 입히는 바이러스로, 우리나라에서는 2008년에 경상남도 통영에서 처음 발견되어 현재 제주도 지역과 전라도, 경상도 지역의 전체에 빠르게 확산되어 토마토 농가에 큰 피해를 주고 있으며, 담배가루이는 이러한 TYLCV를 전파시키는 유일한 매개충으로도 알려져 있다(Czosnek et al., 2002; Lee et al., 2010).

이러한 담배가루이는 농약을 살포하여 방제하는 것이 일반적이거나, 담배가루이는 발육기간이 짧아 살충제에 대한 저항성이 빠르게 발달할 가능성이 크다고 알려져 있다(Devine and Denholm, 1998). 현재까지 네오니코티노이드계, 피레스로이드계, 곤충성장조절제(IGR)계통 등의 살충제에 대해서 저항성이 발달된 것으로 보고되고 있다(Horowitz et al., 2005; Karatolos et al., 2012; Lee et al., 2002). 이러한 이유로 인하여 담배가루이는 곤충병원성 곰팡이 및 천적, spearmint oil과 같은 식물의 정유를

*Corresponding author: Tel: +82-042-821-5769

E-mail address: youngnam@cnu.ac.kr

이용하는 등 생물학적인 친환경적 방제기술이 활발히 연구되고 있다(Yoon et al., 2010; Kim et al., 2008; Choi and Kim., 2004).

최근 해충방제를 위한 RNAi적용하여 이용하려는 연구가 많이 이루어지고 있다(Baum et al., 2007; Whyard et al., 2009; Huvenne and Smagghe, 2010; Scott et al., 2013). 현재까지는 dsRNA의 직접적인 injection 방법과 인공먹이에 dsRNA를 섞어 섭식시키는 방법이 많이 사용되어져 왔으나(Mutti et al., 2006; Sapountzis et al., 2014; Wynant et al., 2014; Rangasamy and Siegfried, 2012), 해충방제에 직접 적용하기엔 이러한 dsRNA 전달방법은 많은 제약이 따른다. 따라서 최근에는 dsRNA를 발현시키는 transgenic plant를 사용한 dsRNA의 간접적인 전달방법도 많이 연구되었으며, 실제로 서부옥수수뿌리벌레(*Diabrotica virgifera virgifera*)를 비롯한, 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*), 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 등에서 transgenic plant를 이용한 RNAi 효과가 입증되었다(Baum et al., 2007; Mao et al., 2007; Bhatia et al., 2012; Pitino et al., 2011). 그러나 transgenic plant를 이용한 RNAi 실험은 소수의 유전자를 확인하기 위한 방법으로는 이용될 수 있지만, 다양한 유전자를 확인하는 과정에서는 많은 시간과 노동력을 필요로 한다. 그에 반해 target 유전자를 포함하는 재조합 바이러스를 식물에 접종시킨 후, 바이러스 복제 과정에서 생성된 target 유전자의 dsRNA를 통해 유전자의 기능을 확인 할 수 있는 VIGS (virus-induced gene silencing) 방법은 시간이나 노동력을 단축시킬 수 있어 target 유전자 연구에 많이 이용되고 있다(Brigneti et al., 2004; Burch-Smith et al., 2006; Liu et al., 2002; Lu et al., 2003; Vel squez et al., 2009).

본 연구에서는 담배가루이 cDNA library insert를 무작위로 TRV VIGS vector에 클로닝하여 식물에 agro-

infiltration 시킨 뒤 식물에서 발현되는 dsRNA를 곤충에게 섭식 시킴으로써 RNAi를 이용한 담배가루이 방제에 효과적인 유전자 선발을 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 곤충 사육 및 채집

담배가루이(*Bemisia tabaci*)의 사육은 곤충사육실에서 25±1°C, 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건으로 아크릴 케이지(30 × 30 × 50 cm)에서 서광 품종의 토마토를 기주 식물로 하여 누대사육하였다. 누대사육중인 담배가루이를 대량사육한 후, 흡충기로 포집하여 -80°C에 보관하였다가 total RNA를 뽑았다.

2. cDNA library 제작

Trizol reagent (MRC)를 사용하여 담배가루이 total RNA를 추출한 후, 이 total RNA로부터 FastTrack[®] MAG mRNA isolation Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. 정제한 mRNA는 Super Script[®] Full length cDNA Library Construction Kit II protocol을 기본으로 방법을 일부 수정하여 실험을 실시하였다. 다양한 cDNA insert를 생성하기 위해 attB2 sequence에 (N)₂₅를 추가하여 제작된 Biotin-attB2-(N)₂₅ random primer(Table 1)를 사용하여 mRNA를 template로 first strand cDNA 합성 후 sonication을 1초 동안 실시하여 cDNA를 잘라주었다. 정제된 작은 cDNA 단편과 double-strand 5' attB1 adapter (Table 1)를 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation 시킨 후, LA Taq[™] DNA polymerase (Takara)를 사용하여 second strand cDNA를 합성하였다. Gateway cloning이 가능하

Table 1. Mean number of *Bemisia tabaci* adults according to TRV Agro-infiltration.

Plant	Day after releasing				P ^b
	7 days	14 days	21 days	28 days	
Negative con	8.7±2.5 ^a	9.0±5.0	26.7±24.7	63.0±23.6	0.015*
TRV	5.7±0.5	10.0±1.7	26.7±19.0	43.3±15.0	0.019*
P ^b	0.114 ^{ns}	0.760 ^{ns}	1.000 ^{ns}	0.219 ^{ns}	

^aValues represent mean±SD. Different letters at values in rows show significant differences (one-way ANOVA) in SPSS Version 21.0.

^b* Indicates P<0.05, ns Indicates not significant

도록 양쪽에 att sequence를 가지는 cDNA 단편만을 증폭하기 위해서 adapter sequence를 사용하여 제작된 Biotin-attB2-(N)₆와 attB1-adapter-U primer (Table 1)를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다.

양쪽에 attB adapter를 가지는 4.8ug의 cDNA insert (PCR product)와 4.5ug의 pDONRTM 207 vector (Invitrogen, USA)를 가지고 BP recombination을 실시하였다. BP reaction 후 One shot[®] Top10 electro competent cells *E. coli* (Invitrogen, USA)을 사용하여 voltage 1.8 kV, resistance 200 Ω, capacity 25 uF의 조건으로 electro-transformation을 실시하였다. Transformation된 sample에 S.O.C 배지를 1 ml 추가한 뒤 1시간 incubate 후 cDNA library를 10⁻⁴까지 연속 희석하여 gentamicin (1 ug/ml)을 포함한 LB plate배지 100 μL씩 도말하여 37°C에서 overnight하였다. Overnight 후, sample은 300 ul씩 40% glycerol과 1:1 비율로 섞어서 stock cell로 만들어 -80°C에 보관하였다.

3. TRV RNA₂ vector와 LR recombination

Att site가 추가된 TRV (Tobacco rattle virus) RNA₂ vector (destination vector)와 cDNA library를 가지고 LR recombination을 실시하였다. cDNA library 2 ul와 TRV RNA₂ vector (1 ug/ul) 2 ul, D.W 10 ul, LR clonase[®] II enzyme Mix (Invitrogen) 6 ul를 섞어 LR reaction mixture를 만들었다. 이렇게 만들어진 LR reaction mixture는 25°C에서 20시간 동안 incubation을 실시하였다. 20시간 후, 2 ul의 proteinase K를 추가 하고 37°C에서 15분, 70°C에서 10분 incubation을 실시하여 enzyme을 비활성화 시켰다. LR recombination을 실시한 sample을 농축하기 위해 One shot[®] Top10 electro competent cells *E. coli* (Invitrogen)에 electro-transformation을 실시한 뒤, cell을 키워서 GeneJET[™] Plasmid Maxiprep kit (Thermo, USA)를 사용하여 protocol에 따라 DNA를 농축한 후 -20°C에 보관하였다.

4. DH5α *E. coli* competent cell heat shock transformation

LR recombination이 된 cell을 selection하기 위해서

DH5α *E. coli* competent cell에 transformation을 실시하였다. 살짝 녹은 DH5α *E. coli* competent cell에 LR recombination후 농축한 sample 1.5 ul(약 2.7 ug)를 추가한 뒤, 42°C에서 45초간 heat shock을 가하였다. 곧바로 2분 동안 ice에 incubation하고, LB broth 1 ml을 추가한 뒤, 37°C에서 1시간 동안 shaking incubation을 실시하였다. 1시간 후, sample을 200 ul Kanamycin (1 ug/ml)을 포함한 LB plate 배지에 도말하여 37°C에서 overnight 하였다. Overnight 후, 배지에 뜬 colony를 LB broth 3 ml을 넣고 spreading하여 모두 회수 후 plasmid isolation을 수행한 뒤 *Agrobacterium tumefaciens*에 transformation 전까지 -20°C에 보관하였다.

5. *Agrobacterium tumefaciens*에 transformation

준비된 *Agrobacterium tumefaciens* (GV2260) competent cell에 transformation을 실시하였다. DH5α *E. coli* competent cell에서 selection된 LR recombination이 잘 일어난 sample 3ul와 *Agrobacterium tumefaciens* (GV2260) competent cell을 섞은 후, 액체질소에 동결하였다. 그 다음 37°C water bath에서 녹였다. 이 과정을 한 번 더 반복한 후, ice에 30분 동안 incubation 하였다. 30분 뒤, 1 ml LB broth 추가 후 30°C에서 shaking incubation을 3시간 실시하였다. 3시간 후 Kanamycin (1 ug/ml)와 Rifampicin (1 ug/ml)을 포함한 LB plate 배지에 200ul 도말 한 후 2~3일 정도 30°C에서 incubation을 실시하였다. 2~3일 후 배지에 뜬 colony를 확인하고 임의로 50개의 colony를 culture하여 LR check F와 LR check R primer를 사용하여 colony PCR을 통해 redundancy 및 NCBI EST blast search를 통해 유전자 정보를 확인하였고, 각각 라벨링 하여 stock cell로 -80°C에 보관하였다.

6. 토마토에 Agro-infiltration

토마토에 접종하기 하루 전에 90개의 sample colony (TRV RNA₂: whitefly cDNA)와 TRV RNA1 colony, TRV RNA2 vector (att를 포함) colony를 kanamycin (1 ug/ml)과 rifampicin (1 ug/ml)을 포함한 LB plate 배지에 streaking하여 30°C에 incubation하였다. 4엽의 잎이 올라온 토마토 (*Lycopersicon esculentum*)기주에 접종 2시간 전에 받침

을 받친 후 물을 주었다. 0.5 M MES 1 ml, 1M MgCl₂ 0.5 ml을 섞고 total volume이 50 ml이 될 때까지 D.W로 채워 infiltration buffer를 만든 후 infiltration buffer를 3 ml씩 나누어 담고 colony를 풀어서 OD₆₀₀ 0.6의 농도로 맞추었다. 그 다음 각 TRV RNA2 sample들과 TRV RNA2 vector를 각각 TRV RNA1과 1:1로 섞어준 후 1 ml당 1.5 ul의 acetosyringone을 넣었다. 잘 섞은 후 1 ml 주사기의 주사 바늘을 제거한 뒤 딱잎 뒷면에 접종시켰다.

7. 생물검정

가. TRV 접종에 따른 담배가루이 성충 밀도 비교

건전기주와 TRV 접종기주를 랜덤하게 배치한 후 담배가루이를 방사한 뒤 7일 간격으로 4주 동안 토마토 기주에 붙어있는 담배가루이 수를 계수하였다.

나. 담배가루이 유전자가 cloning 된 TRV 접종에 따른 성충 밀도 및 알·약충 밀도 조사

온실에 방충망을 설치하여 실시하였다. agro-infiltration 실시 후 7일 뒤 90개의 담배가루이 유전자 sample을 접종시킨 토마토와 5개의 TRV RNA2 vector를 접종시킨 토마토(positive control)와 5개의 건전한 토마토(negative control)를 온실 베드에 임의로 배치한 다음 담배가루이를 500마리 정도 방사하였다. 7일에 한번씩 4주 동안 토마토 기주에 정착한 담배가루이 수를 계수하여 negative control과 positive control 기주에 정착한 담배가루이 수와 비교하여 생물활성(control value)를 계산하였으며, 4주 후 토마토 잎에 붙어있는 담배가루이 알과 약충을 계수 하여 sample에서의 알·약충수와 negative control과 positive control에서의 알·약충수를 각각의 비교하여 방제가를 계산하였다(N CV, P CV sample). 각 담배가루이 cDNA sample은 임의로 wh01~wh90으로 명명하였다.

III. 결과 및 고찰

이전에 진행된 dsRNA를 생성하는 형질전환 식물에서 곤충의 RNA interference를 확인하는 연구들을 보면, 선충의 경우 체색이 투명해지거나 암컷의 형태가 타원형의 방추모양으로 변형되는 등의 표현형 변화, 또는 뿌리혹의 수와 난낭수의 변화 및 알의 부화율의 변화를 확인하는 생리·

생태적 변화로 RNA interference를 확인 하는 것(Yadav et al., 2006; Shingles et al., 2007)과 qRT-PCR을 이용하여 대상 곤충에서의 유전자 발현량 변화를 확인 하는 분자생물학적인 변화로 RNAi 효과를 확인하였다(Fairbairn et al., 2007; Mao et al., 2007; Pitino et al., 2011). 본 연구에서는 담배가루이의 성충 밀도와 알·약충수의 밀도 변화 등의 개체군 밀도의 변화로 RNAi 효과를 확인하였다.

Tobacco rattle virus 접종에 따른 토마토 잎에서 담배가루이 성충의 밀도를 조사한 결과, 무처리 대비 담배가루이 방사 후 21일 까지는 기주에 따른 담배가루이 성충 밀도가 거의 차이가 없었으며, 28일 후에 가서야 약간의 차이를 보였다. 7일차와 14일 차까지는 각 negative control과 TRV 접종 기주 간의 담배가루이 성충 밀도의 큰 차이를 보이지 않았으나, 21일차 이후로는 각각의 negative control과 TRV 접종기주 내에서의 담배가루이 성충 밀도 편차가 큰 것을 확인 할 수 있었다(Table 1). 따라서 28일차 후 Negative control과 TRV 접종 기주 간의 담배가루이 성충 밀도 차이는 TRV 접종에 따른 영향은 아닌 것으로 사료된다.

담배가루이 유전자가 클로닝된 TRV 접종에 따른 담배가루이 성충 밀도를 조사한 결과를 토대로 4주 후 negative control 대비 방제가(N CV)와 positive control 대비 방제가(P CV)를 비교한 결과, 각 담배가루이 sample마다 생물활성에 있어 차이가 큰 것이 확인되었다. N CV와 P CV가 80% 이상이 되는 sample은 wh11, wh36, wh46, wh50, wh71로 총 5개의 sample이 확인되었다. 그 중에서도 wh11과 wh71은 각각 평균 방제가가 95.21%, 94.31%로 P CV와 N CV가 모두 90%가 넘는 방제가를 보여주었다(Fig. 1).

담배가루이 유전자가 클로닝된 TRV 접종에 따른 담배가루이 알·약충 밀도를 조사 결과를 토대로 4주 후 negative control 대비 방제가(N CV)와 positive control 대비 방제가(P CV)를 비교한 결과, 성충 밀도 조사에서와 마찬가지로 각 sample마다 생물활성 차이가 큰 것을 확인 할 수 있었다. N CV와 P CV가 80% 이상이 되는 sample은 wh01, wh09, wh10, wh15, wh16, wh23, wh24, wh48, wh64, wh66로 총 11개의 sample이 확인 되었다. 그 중에서도 특히 wh01과 wh15는 각각 평균 생물활성이 94.17%, 90.53%로 P CV와 N CV가 모두 90%가 넘는 생물활성을 보여주었다(Fig. 2).

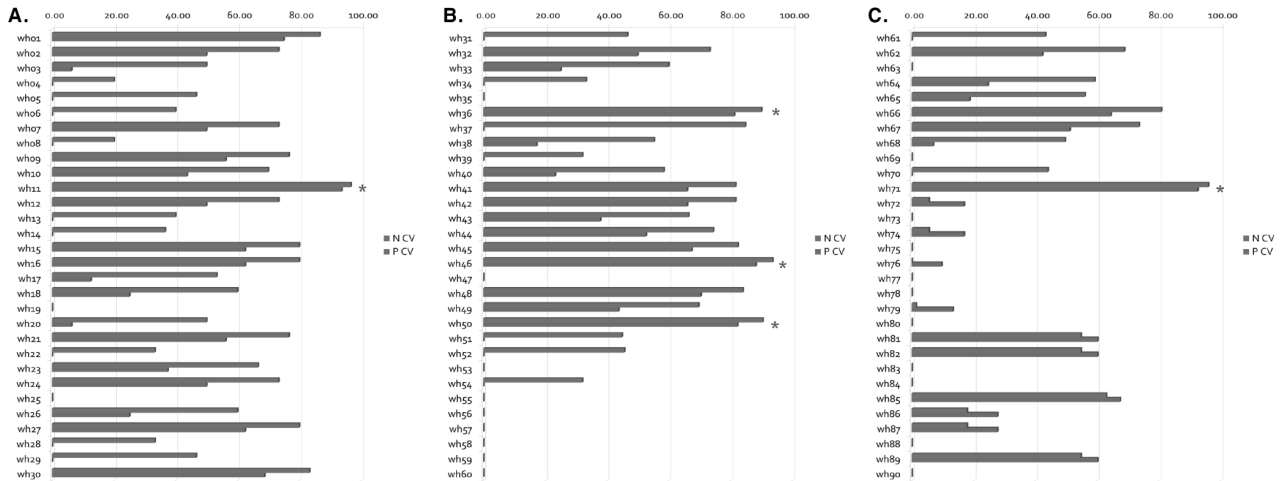


Fig. 1. Occurrence of adult of *Bemisia tabaci* according to agro-infiltration of TRV inserted whitefly cDNA (N CV; negative control value, P CV; positive control value). * Indicates N CV and P CV \leq 80%.

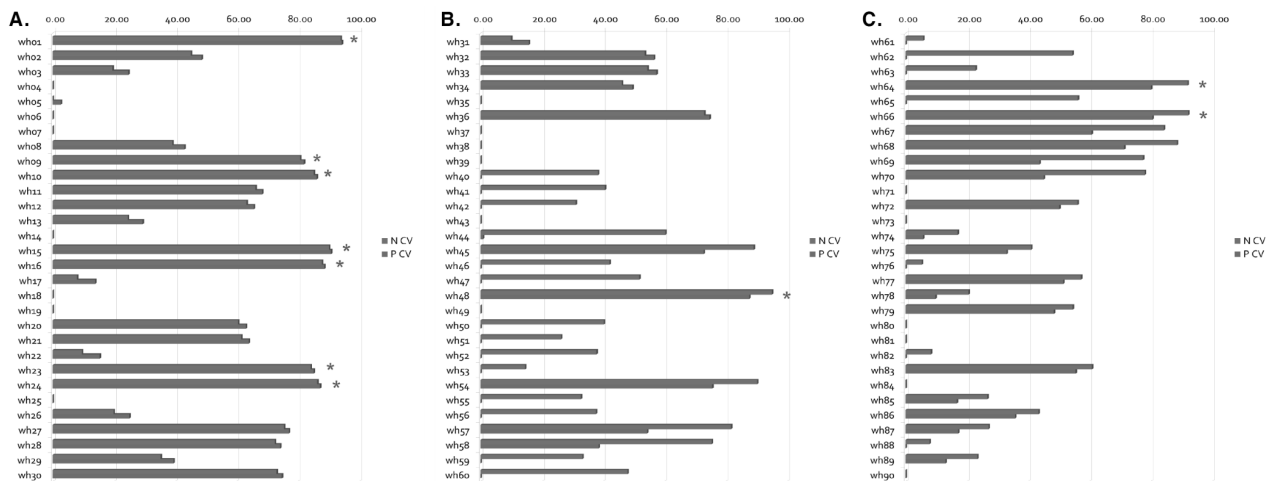


Fig. 2. Occurrence of nymph and egg of *Bemisia tabaci* according to agro-infiltration of TRV inserted whitefly cDNA (N CV; negative control value, P CV; positive control value). * Indicates N CV and P CV \leq 80%.

Fig. 1과 Fig. 2를 비교해본 결과 성충 밀도 조사에서 생물활성이 높았던 sample과 알·약충 밀도 조사에서 생물활성이 높았던 sample의 중복성은 확인 되지 않았다. Wh11과 wh36의 경우 성충 밀도 조사에서는 높은 생물활성을 보였지만 알·약충 밀도 조사에서는 60%~70%의 생물활성을 보였으며, wh46, wh50, wh71의 경우 성충 밀도 조사에서는 80%가 넘는 생물활성을 보였으나, 알·약충 밀도 조사에서는 0%~50%로 낮은 생물활성을 보였다.

또한 성충 밀도 조사에서는 낮은 생물활성을 보였지만 오히려 알·약충 밀도 조사에서는 높은 생물활성을 보이는 몇몇의 sample도 확인이 되었다. 이는 방사한 담배가루이 성충이 기주에 많이 정착하였지만 알·약충 밀도는 적었다는 것을 의미한다. 이러한 sample은 삽입된 유전자가 산란

과 관련된 유전자로 RNAi 효과를 통해 산란이 억제된 것으로 사료된다. 더 정확한 확인을 위해 추후의 실험으로 생리·생태적으로 담배가루이 방제에 좋은 효과를 보였던 유전자 sample을 개별 실험을 통해 담배가루이에서 qRT-PCR을 이용하여 실제 담배가루이에서 식물에 접종된 담배가루이 유전자의 발현량 조사를 통한 분자생물학적인 변화를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

IV. 결론

담배가루이는 500종 이상의 넓은 기주 범위를 가지고 있으며, 토마토황화잎말림바이러스(TYLCV)를 비롯한 100종이상의 바이러스를 매개한다고 알려져 있어 큰 문제

가 되고 있다. 이러한 담배가루이는 농약을 살포하여 방제하는 것이 일반적이나, 저항성 발현이 빨라서 방제에 어려움을 겪고 있다. 최근에는 해충의 새로운 방제 방법으로 RNAi 기술을 이용한 해충방제가 많이 연구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 RNAi 기술을 이용한 담배가루이 방제를 위해 담배가루이 cDNA library중 무작위로 90개의 유전자를 가지고 TRV (Tobacco rattle virus) VIGS vector를 이용해 방제에 효과적인 유전자 selection을 시도하였다. (1) TRV 접종에 따른 담배가루이 성충 밀도는 큰 차이가 없었다. (2) 담배가루이 유전자를 삽입한 TRV 접종에 따른 담배가루이 성충 밀도는 sample마다 큰 차이를 보였으며, P CV와 N CV가 모두 80%가 넘는 sample은 wh11, wh36, wh46, wh50, wh71 총 5개 sample을 확인 할 수 있었다. (3) 담배가루이 유전자를 삽입한 TRV 접종에 따른 담배가루이 알·약충 밀도 역시 sample마다 큰 차이를 보였으며, P CV와 N CV가 모두 80%가 넘는 sample은 wh01, wh09, wh10, wh15, wh16, wh23, wh24, wh48, wh64, wh66로 총 11개의 sample을 확인 할 수 있었다. (4) wh46, wh50, wh71의 경우 담배가루이 성충 밀도는 높았으나, 알·약충 밀도는 낮은 것을 확인하였다. 이러한 생리·생태적으로 담배가루이 방제에 좋은 효과를 보였던 유전자 sample을 개별 실험을 통해 담배가루이에서 qRT-PCR을 이용하여 실제 담배가루이에서 식물에 접종된 담배가루이 유전자의 발현량 조사를 통한 분자생물학적인 변화를 확인할 필요가 있을 것을 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014-2015년도 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 지원에 의해 수행된 과제입니다(과제 번호: 112018-3).

참고 문헌

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotech.* 25:1322-1326.

Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125:311-325.

Bhatia V, Bhattacharya R, Uniyal PL, Singh R, Niranjana RS. 2012. Host generated siRNAs attenuate expression of serine protease gene in *Myzus persicae*. *PLoS one*, 7:e46343.

Brigneti G, Martín-Hernández AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JD. 2004. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.* 39:264-272.

Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP. 2006. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142:21-27.

Byrne DN. 1999. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Agricul. For. Meteorol.* 97:309-316.

Choi YM, Kim GH. 2004. Insecticidal activity of spearmint oil against *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* adults. *Korean J. Appl. Entomol.* 43(4):323-328. [in Korean]

Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*—insights from studies with tomato yellow leaf curl virus. *Ann. Appl. Biol.* 140:215-231.

Devine GJ, Denholm I. 1998. An unconventional use of piperonyl butoxide for managing the cotton whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 88:601-610.

Fairbairn DJ, Cavallaro AS, Bernard M, Mahalinga-Iyer J, Graham MW, Botella JR. 2007. Host-delivered RNAi: An effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta.* 226:1525-1533.

Horowitz AR, Kontsedalov S, Khasdan V, Ishaaya I. 2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58:216-225.

Huvenne H, Smagghe G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J. Insect Physiol.* 56:227-235.

Jones DR. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:195-219.

Karatolos N, Gorman K, Williamson MS, Denholm I. 2012. Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Manag. Sci.* 68:834-838.

Kim HY, Lee YH, Kim JH, Kim YH. 2008. Comparison on the capability of four predatory mites to prey on the eggs of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 47(4):429-433. [in Korean]

Lee H, Song W, Kwak HR, Kim JD, Park JG, Auh CK, Kim DH, Lee KY, Lee SC, Choi HS. 2010. Phylogenetic analysis and inflow route of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and *Bemisia tabaci* in Kor. *Mol. Cell.* 30:467-476.

Lee YS, Lee SY, Park EC, Kim JH, Kim GH. 2002. Comparative toxicities of pyriproxyfen and thiamethoxam against the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Asia-Paci. Entomol.* 5:117-122.

Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31:777-786.

- Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu AJ, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22: 5690-5699.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotech.* 25:1307-1313.
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR. 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* 6:1-7.
- Perring TM, Cooper AD, Rodriguez RJ, Farrar CA, Bellows TS. 1993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Sci.* 259:74-77.
- Pitino M, Coleman AD, Maffei ME, Ridout CJ, Hogenhout SA. 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PloS one.* 6:e25709.
- Rangasamy M, Siegfried BD. 2012. Validation of RNA interference in western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest Manag. Sci.* 68:587-591.
- Sapountzis P, Duport G, Balman S, Gaget K, Jaubert-Possamai S, Febvay G, Charles H, Rahbe Y, Colella S, Calevro F. 2014. New insight into the RNA interference response against *cathepsin-L* gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Bioche. Mol. Biol.* 51:20-32.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE. 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59:1212-1221.
- Secker AE, Bedford ID, Markham PG, Williams MEC. 1998. Squash, a reliable field indicator for the presence of the B biotype of tobacco whitefly, *Bemisia tabaci*. In: Brighton crop protection conference-pests and Diseases. Brit. Crop Prot. Council. Farnham, UK. pp. 837-842.
- Shingles J, Lilley CJ, Atkinson HJ, Urwin PE. 2007. *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterization of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Exper. Parasitol.* 115:114-120.
- Velásquez AC, Chakravarthy S, Martin GB. 2009. Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J. Vis. Exp.* 28:1-4.
- Whyard S, Singh AD, Wong S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:824-832.
- Wynant N, Santos D, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J. 2014. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Mol. Biol.* 23:320-329.
- Yadav BC, Veluthambi K, Subramaniam K. 2006. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148:219-222
- Yoon YJ, Yu YM, Lee MH, Han EJ, Hong SJ, Ahn NH, Kim YK, Jee HJ, Park JH. 2010. Characterization of *Lecanicillium lecanii* Btab01 isolated with bioactivities to tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*). *Korean J. Appl. Entomol.* 49:417-422. [in Korean]