



显微注射构建烟粉虱的 RNAi 技术体系*

李如美** 王少丽 张友军***

(中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要 RNAi 已经成为揭示基因功能的一个常用的有力工具。在昆虫 RNAi 技术体系中, 通过显微注射方法向昆虫体内注入 dsRNA, 实现系统性干扰, 是最为广泛采用的方法。但对于体型较小的昆虫, 注射法操作存在较大的难度, 特别是非常微小的昆虫烟粉虱 *Bemisia tabaci*。为了进行烟粉虱大规模基因功能验证, 需要开发一套成熟的 RNAi 技术体系。本研究以烟粉虱的 *CYP6CMI* 基因为目标基因, 通过显微注射法注射不同浓度的 dsRNA 到烟粉虱 4 龄若虫, 荧光定量 PCR 检测其沉默效果。结果表明: 在对单头烟粉虱注射 50 nL 时, 注射不同浓度的 dsRNA, 对 *CYP6CMI* 基因的沉默效果不同, 最大沉默效率可达到 80% 以上。因此, 本实验成功构建了烟粉虱的 RNAi 技术体系, 也可用于其它粉虱类害虫的 RNAi 技术。
关键词 RNA 干扰, 显微注射, 烟粉虱, dsRNA, 实时荧光定量 PCR

Establishment of a microinjection based RNA interference technique for *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)

LI Ru-Mei** WANG Shao-Li ZHANG You-Jun***

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract RNAi is a powerful tool for revealing gene function. Microinjection is the most widely-used method to obtain systematic interference by injecting dsRNA into insects. However, it's very difficult to inject small insects, especially the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. In order to verify the large-scale gene function of *B. tabaci*, it's necessary to develop an RNAi technique. We established a method to silence the *B. tabaci* *CYP6CMI* gene, the effect of which was detected by injecting the 4th instar larvae of whiteflies with different dsRNA concentrations. The results show that injection with different concentrations of dsRNA had various silencing effects on the *CYP6CMI* gene, with a maximum silencing efficiency of more than 80%. This successful RNAi technology successfully can be used on other whiteflies.

Key words RNA interference, microinjection, *Bemisia tabaci*, double strand rna, quantitative Real-time PCR

近几年来, RNAi 作为一个有力的揭示基因功能的工具, 在昆虫上的研究取得了瞩目的进展。RNAi 的发现, 使许多研究者设想利用 RNAi 实现对防治害虫的新途径 (Fabrick *et al.*, 2004)。有些研究者利用转基因技术, 在植物体表达 dsRNA, 当昆虫取食植物时, dsRNA 就随着取

食物进入到昆虫体内, 导致昆虫受到损害甚至致死, 从而达到害虫防治的效果。这个防治害虫的设想已在鳞翅目 (Mao *et al.*, 2007) 和鞘翅目 (Baum *et al.*, 2007) 研究中得到证实。同时, RNAi 应用于基因功能验证与害虫防治是继转 Bt 棉后的又一个新的策略, 为害虫防治提供了新思

* 资助项目 Supported projects: 国家 863 计划(2012AA101502); 国家自然科学基金(31171857)和北京室重点实验室 2012 年阶梯计划项目 (Z121106002812038); 蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室

**第一作者 First author, E-mail: rumeili0815@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyoujun@caas.cn

收稿日期 Received: 2013-09-14, 接受日期 Accepted: 2013-10-13

路。RNAi 应用于防治害虫, 比如刺吸式的同翅目昆虫蚜虫、叶蝉和粉虱同样具有巨大的潜力 (Price and Gatehouse, 2008)。

RNAi 效应介导的常用方法有饲喂、浸泡、电穿孔、注射、干细胞移植、病毒感染、通过转基因技术制备等。昆虫中, 常用注射法和饲喂法进行 RNAi 效应的研究。目前, 饲喂法已成功应用于棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Mao *et al.*, 2007)、长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* (Araujo *et al.*, 2006)、玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte (Baum *et al.*, 2007) 以及小菜蛾 *Plutella xylostella* (Caplen *et al.*, 2002) 的 RNAi 的研究。在烟粉虱中也成功通过饲喂 dsRNA, 使大量的昆虫连续摄入 dsRNA, 有效抑制靶基因的表达 (Upadhyay *et al.*, 2011; Lü and Wan, 2011)。但 dsRNA 饲喂后, 昆虫对于 dsRNA 吸收, dsRNA 是否能到达其靶基因所表达的细胞或组织以实现沉默效果, 还有待于进一步研究。

注射法是先体外合成 dsRNA 或 siRNA, 然后通过注射法导入昆虫体内, 这是目前在昆虫上应用比较广泛的导入方法 (Ober and Jockusch, 2006)。dsRNA 通过注射到昆虫的各个部位, dsRNA 进入体内后扩散引起 RNAi, 甚至可能将 RNAi 效应传递到子代。对于虫体较大的昆虫来讲, dsRNA 被注射到体内后, 伤口愈合速度快, 较容易成活, 目前注射法已在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (Levin *et al.*, 2005; Soberon *et al.*, 2006)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (Yang *et al.*, 2008)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Sivakumar *et al.*, 2007)、家蚕 *Bombyx mori* (Tabunoki *et al.*, 2004; Ohnishi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007) 等虫体内成功建立了成熟的 RNAi 的体系。但对于虫体较小的昆虫用注射法死亡率很高, 操作困难, 导致了注射法在虫体小的昆虫的功能基因的研究缓慢。

目前, 国内外关于显微注射烟粉虱的成熟经验太少 (Ghanim *et al.*, 2007), 本实验采用非常

微小的昆虫烟粉虱的 4 龄若虫为注射对象, 以 *CYP6CM1* 基因为目标基因, 通过注射体积和注射浓度的摸索, 成功建立一套成熟的 RNAi 技术, 可为烟粉虱基因功能的研究和验证提供基础和方法。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

本实验所用烟粉虱为长期饲养在温室的甘蓝 B 型烟粉虱。温室内温度 23~28℃, 相对湿度为 50%~70%。寄主植物为甘蓝 *Brassica oleracea*, 甘蓝叶大而光滑, 便于取虫。取红眼期伪蛹 (24 h 内羽化), 剪成 1 cm² 小块叶片整齐平铺在 1.5% 琼脂粉培养基的培养皿内, 把培养皿置于显微镜下进行注射, 在注射后 24 h 内烟粉虱羽化, 并统计羽化成活率, 为后续实验做准备。

1.2 总 RNA 提取、cDNA 合成、*CYP6CM1* 基因的克隆及 T7 启动子引物设计

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 取 100 头烟粉虱成虫, 放入匀浆器中, 按照 Invitrogen 公司的 TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒使用说明书进行, 用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度。cDNA 合成按照 PrimeScript®RT reagent Kit (大连宝生物公司) 试剂盒合成步骤说明进行。

1.2.2 利用烟粉虱已报道的 *CYP6CM1* 基因进行 BLAST 搜索, 筛选烟粉虱 *CYP6CM1* 基因序列, 进行克隆验证 利用 PRIMER5.0 设计特异性全长引物 (表 1)。同时, 为了能更好的检测基因转录水平上基因表达量, 也设计了 RT-qPCR 引物, 其引物序列见表 1。

1.2.3 dsRNA 引物设计 根据 B 型烟粉虱 *CYP6CM1* 基因, 利用 PRIMER5.0 软件设计特异性引物, 然后在引物的 5' 端加上 T7 启动子序列, 其引物序列见表 1。

1.2.4 T7 引物 PCR 扩增 以 cDNA 为模板, 采用 25 μL 的 PCR 反应体系, 包含: 2.5 μL 10×

表 1 烟粉虱 *CYP6CMI* 基因全长序列, qRT-PCR 及 dsRNA 克隆时的引物序列
Table 1 Primer sequences used for the full-length sequence, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and the double-stranded RNA template (dsRNA)

基因名称 Gene name	上游引物序列 Forward primer (5' to 3')	下游引物序列 Reverse primer (5' to 3')
Full- <i>CYP6CMI</i>	ATGGAAGTGTGGAAATAGTTAAGTC	AAAGGTAAAATAATCACAGGAGAT
Q- <i>CYP6CMI</i>	CACTCTTTTGGATTTACTGC	GTGAAGCTGCCTCTTTAATG
ds <i>CYP6CMI</i> ^a	TGTGCGACCCGAAGTTGA	AGCCCGCCGAGAAGAATG
dsGFP ^a	CAGTGCTTCAGCCGCTAC	GTTACCTTGATGCCGTTT
β -actin	TCTTCCAGCCATCCTTCTTG	CGGTGATTTCTTCTGCATT

“a”: 在 5'端加上 T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC)。

“a”: dsRNA template primers additionally had T7 RNA polymerase recognition sites (TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC) appended to their 5' ends.

buffer, 2 μ L dNTP, 1 μ L 上下游引物, 1 μ L cDNA 模板, 0.3 μ L LA Taq 酶, 超纯水补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 8 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收后纯化后, 连接到 Peasy-T1 载体上, 经蓝白斑筛选, 挑取单菌落进行 PCR 鉴定, 送北京擎科生物技术有限公司测序。

1.3 dsRNA 的合成

以验证测序后的菌株质粒提取液作为模板, 进行 PCR 扩增, 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化, 纯化后用 MEGAscript[®] RNAi Kit (美国), (Ambion, USA) 合成试剂盒合成 dsRNA。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 质量、用紫外分光光度计检测其浓度, 然后把合成的 dsRNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 显微注射

采用 NK2 全自动细胞注射系统, 仪器设置注射体积大约为 50 nL 时的注射参数 (500 pa, 0.8 s), 采用浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2、2.5 μ g/ μ L 的 dsRNA 进行显微注射。试虫采用 24 h 内羽化的烟粉虱红眼期伪蛹。从饲养烟粉虱的甘蓝植株上剪下含有单头伪蛹的 1 cm^2 小块甘蓝叶片, 整齐平铺在 1.5% 琼脂粉培养基的培养皿内, 把培养皿置于显微镜下进行注射, 注射后的伪蛹放入本实验室定制的玻璃罐 (大约 20

cm \times 20 cm \times 20 cm) 中, 然后在人工气候箱中饲养 (温度 (24 \pm 1) $^{\circ}$ C, 16L:8D, 相对湿度为 50%~70%)。羽化后烟粉虱移入铺有甘蓝叶片的指形管内饲养。分别取 24、36、48、72、96 和 120 h 羽化的烟粉虱, 在液氮中速冻后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。每个处理烟粉虱为 50~100 头, 重复 3 次。注射不含 dsRNA 的 buffer 和烟粉虱中不存在 GFP 基因的 dsRNA, 作为阴性对照。检测 dsRNA 的毒性, 检测注射沉默效果及羽化率。

1.5 Real-time PCR 检测沉默效率

分别取注射后 24、36、48、72、96 和 120 h 内的烟粉虱, 每个处理取成虫 50~100 头。提取烟粉虱的总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 β -actin 为内参基因, 采用 RT-qPCR 方法, 在 ABI 7500 Real-time system 上检测烟粉虱中 *CYP6CMI* 基因的表达水平。其中 RT-qPCR 所用引物见表 1。反应体系设为 25 μ L, 包括: 1 μ L cDNA 模板, 11.25 μ L 的 SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix (天根生化生物技术有限公司), 0.5 μ L 上下游引物, 超纯水补足 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 之后为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 进行 40 个循环。所有试验都采用 3 个生物学重复, 4 个机械性重复。

1.6 数据分析

不同时间点 dsRNA 的处理之间的多重比较采用 AVOVA 方法 (SPSS 18.0)。差异显著性

检验水平标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱 *CYP6CMI* 基因及 dsRNA 基因的克隆

PCR 扩增及测序结果表明, *CYP6CMI* 基因全长 1 591 bp, 其中完整的开放阅读框为 1 563 bp, 编码 520 个氨基酸。将序列在 NCBI 上与已报道的烟粉虱 *CYP6CMI* 基因序列进行 BLAST 核酸比对, 相似性为 100%。

从已克隆的 *CYP6CMI* 基因开放阅读框中选择干扰片段, 设计了一段 218 bp 的 dsRNA, 与 GenBank 已经登录的 B 型烟粉虱序列的相似性最高, 与其他昆虫的 P450 序列有很多碱基不同, 保证了无其他与靶基因同源的基因存在, 避免了引起对其他相似基因的沉默作用。

2.2 注射不同浓度 ds*CYP6CMI* 后的烟粉虱在不同注射时间下的表达量的变化

用不同浓度 ds*CYP6CMI* 注射烟粉虱 4 龄若虫, 以注射无 dsRNA 的 buffer 为对照, 用 RT-qPCR 方法检测 *CYP6CMI* 基因在不同注射时间的 mRNA 水平表达量的变化(图 1)。由图 1

可以看出, 当注射 24 h 后, *CYP6CMI* 基因的表达量开始下降, 48 h 后表达量达到最低, 72 h 后开始渐渐恢复, 当 120 h 后, 表达量基本完成恢复到原来的水平。另外, 随着浓度的增加, 表达量下降的速度加快。当注射 dsRNA 浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 48 h 表达量达到最低。

2.3 注射 Buffer、dsGFP 和 ds*CYP6CMI* 后, 烟粉虱在 24 h 内羽化率的变化

为了更好的验证注射不同浓度的 dsRNA 可能对烟粉虱造成的毒性, 本实验选择了注射 buffer、dsGFP 和 ds*CYP6CMI* 的烟粉虱 4 龄若虫, 观察烟粉虱的羽化率。

用 dsRNA 浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 dsGFP 和 ds*CYP6CMI* 注射烟粉虱 4 龄若虫, 以注射无 dsRNA 的 buffer 为对照, 观测统计 24 h 内烟粉虱的羽化率(图 2:A)。由图 2A 可以看出, 注射 buffer、dsGFP 和 ds*CYP6CMI* 后, 烟粉虱的羽化率基本一致, 没有显著差异。

2.4 注射不同浓度 ds*CYP6CMI* 后的烟粉虱在 24 h 内的羽化率变化

用不同浓度 ds*CYP6CMI* 注射烟粉虱 4 龄若虫, 以注射无 dsRNA 的 buffer 为对照, 观测统

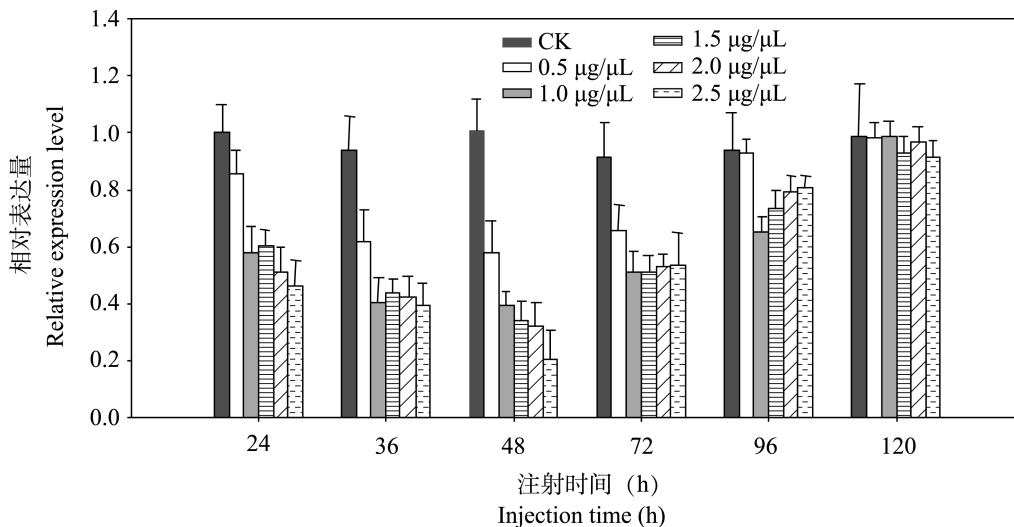


图 1 烟粉虱 *CYP6CMI* 基因在注射不同浓度 dsRNA 和不同注射时间下的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of *CYP6CMI* genes at different time after dsRNA injection with different concentrations

结果是相对于内参基因的表达量。所有的误差线代表的是 3 个生物学重复的标准误差。

Results are normalized to reference genes. All error bars represent standard error of the mean, as determined from three independent replicates.

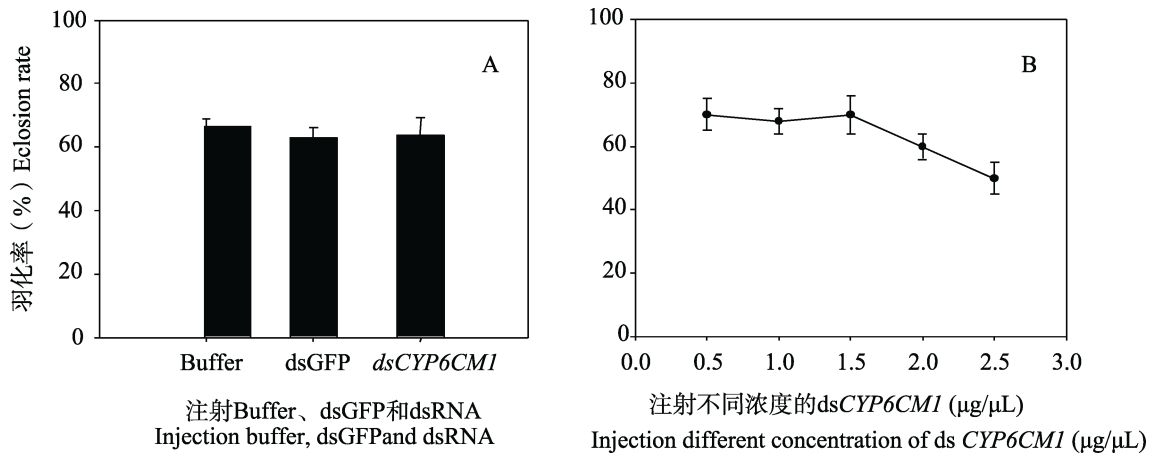


图2 注射 buffer、dsGFP 和 dsRNA 后, 烟粉虱伪蛹的羽化率 (A), 注射不同浓度的 dsRNA 后, 烟粉虱伪蛹的羽化率 (B)

Fig. 2 Eclosion rate of whitefly nymphs after injection with buffer, dsGFP and dsRNA (A), eclosion rate of whitefly nymphs after injection with different dsRNA concentrations (B)

计 24 h 内烟粉虱的羽化率(图 2 :B)。由图 2B 可以看出,当注射浓度为 0.5、1.0 和 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,烟粉虱的羽化率无显著差异,当注射 dsRNA 浓度达到 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,羽化率开始显著下降。

2.5 注射 Buffer、dsGFP 和 dsCYP6CMI 后, 烟粉虱在不同时间内表达量的变化

为了验证 RNAi 后, *CYP6CMI* 基因的表达量变化是由于注射 dsRNA 引起的,本实验选择了同时注射 buffer 和与烟粉虱无关的 GFP 基因做为对照,用 RT-qPCR 方法检测 *CYP6CMI* 基因在不同注射时间的 mRNA 水平表达量的变化。由图 3 可以看出,注射 buffer 与注射 dsGFP 的烟粉虱的 *CYP6CMI* 表达量无显著变化,注射 dsCYP6CMI 的烟粉虱的表达量在 24 h 内开始下降,48 h 时表达量的沉默率最高,达到 80%以上,说明此时沉默效果良好。72 h 后开始该基因的表达量逐渐恢复,120 h 时表达量恢复到原来水平。

3 结论与讨论

近年来, RNAi 技术已被研究者广泛应用于昆虫的基因功能研究。在较小的昆虫烟粉虱中也有成功的例子, Ghanim 等 (2007) 通过显微注射法,把 dsRNA 注射到烟粉虱成虫的前胸背板上,成功抑制了 Chickadee 基因的表达,从而导

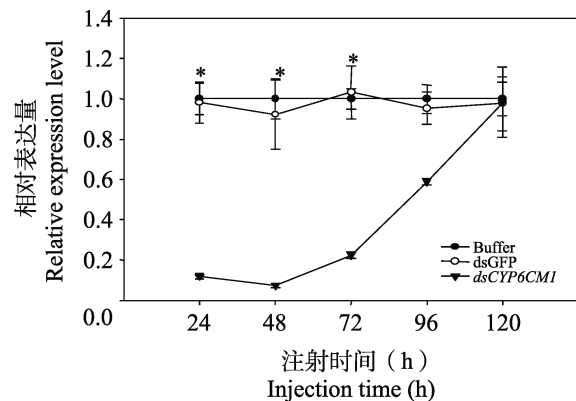


图3 *CYP6CMI* 基因在不同注射时间下的相对表达量
Fig. 3 Relative expression of *CYP6CMI* at different periods after dsRNA injection

结果是相对于内参基因的表达量。“*”代表达到差异性显著水平 (Duncan's 多重分析法, $P < 0.05$)。所有的误差线代表的是 3 个生物学重复的标准误差。

Results are normalized to reference genes. * indicates significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). All error bars represent standard error of the mean, as determined from three independent replicates.

致烟粉虱的卵巢发育畸形,这是 RNAi 技术在 B 型烟粉虱上的首次应用。本实验采用德国 NK2 全自动显微注射系统,把 dsRNA 通过显微注射法注射到烟粉虱的伪蛹中,达到了较为理想的沉默效果。在试验中采用红眼伪蛹,在短时间内羽化,对成虫的影响较小,是较为理想的注射方法。

通过注射不同浓度的 dsRNA 后基因表达量

的变化比较,可以看出不同注射量对沉默的效率 and 沉默的时间都有影响,当注射浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,烟粉虱伪蛹羽化后沉默效果就不显著,注射浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,效果比较理想,沉默效率最高。但是由于当浓度达到 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,烟粉虱的羽化率受到很大影响,羽化率达到最低。综合考虑其浓度对羽化率的影响,因此在本试验中比较注射 buffer、dsGFP 和 dsRNA 表达量的过程中我们选用了 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 做为注射浓度。

本实验中,为了更好的验证 RNAi 的沉默效果是由于注射 dsRNA 引起的,所以也选择了与烟粉虱无关的 dsGFP 作为其中对照,检测基因的沉默效率。结果表明,注射 dsRNA 确实起到了很好的沉默效果,为烟粉虱功能基因的验证提供了很好的 RNAi 技术体系,也可为其它粉虱类害虫进行基因功能验证时提供参考。

参考文献 (References)

- Araujo RN, Santosa A, Pintoa FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH, 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(9): 683–693.
- 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. *Nature Biotechnol.*, 25(11): 1322–1326.
- Caplen NJ, Zheng Z, Falgout B, Morgan RA, 2002. Inhibition of viral gene expression and replication in Mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. *Mol. Ther.*, 6(2): 243–251.
- Fabrick JA, Kanost MR, Baker JE, 2004. RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxyg enase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *J. Insect Sci.*, 4(15): 1–9.
- Ghanim M, Kontsedalov S, Czosnek H, 2007. Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(7): 732–738.
- Huang J, Zhang Y, Li M, Wang S, Liu W, Couble P, Zhao G, Huang Y, 2007. RNA interferen- ce-mediated silencing of bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *FEBS Lett.*, 581(4): 697–701.
- Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR, 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(5): 369–380.
- Lü ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *J. Exp. Biol.*, 214(5): 764–769.
- 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 plantmediated RNAi impairs larval tolerance to gossypol. *Nature Biotechnol.*, 25(11): 1307–1313.
- Ober KA, Jockusch EL, 2006. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Develop. Biol.*, 294(2): 391–405.
- Ohnishi A, Hull JJ, Matsumoto S, 2006. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *PNAS.*, 103(12): 4398–4403.
- Price DRG, Gatehouse JA, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol.*, 26(7): 393–400.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Biol. Chem.*, 277(49): 46849–46851.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of Aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.*, 282(10): 7312–7319.
- Soberón M, López LP, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318(5856): 1640–1642.
- Tabunoki H, Higurashi S, Ninagi O, Fujii H, Banno Y, Nozaki M, Kitajima M, Miura N, Atsumi S, Tsuchida K, Maekawa H, Sato RA, 2004. A carotenoidbinding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *FEBS Lett.*, 567(3): 175–178.
- Upadhyay SK, Chandrashekar K, Thakur N, Verma PC, Borgio JF, Singh PK, Tuli R, 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.*, 36(1): 153–161.
- Yang ZX, Wen LZ, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Chang XL, Zhu GR, Zhang YJ, 2008. Effects of injecting cadherin gene dsRNA on growth and development in diamond- back moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Plutellidae). *J. Appl. Entomol.*, 132(9) : 1341–1346.