研究论文

ace2 基因敲除对棉铃虫乙酰胆碱酯酶活力及其杀虫剂敏感性的影响*

董荣荣** 管 放 萧 欣 杨亦桦***

（南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

摘 要 **【目的】**为明确 AChE2 是否是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 体内杀虫剂的主要作用靶标。**【方法】**利用 qRT-PCR 技术分析棉铃虫体内乙酰胆碱酯酶基因 *ace1* 和 *ace2* 的时空表达模式；采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除棉铃虫 *ace2*，并测定敲除品系 *ace1* 基因的表达量、乙酰胆碱酯酶活力及对 6 种杀虫剂（辛硫磷、毒死蜱、灭多威、茚虫威、功夫菊酯和氯虫苯甲酰胺）的敏感性变化。**【结果】** 棉铃虫 *ace1* 和 *ace2* 基因在幼虫不同龄期和不同组织中均有表达，且 *ace1* 的表达量普遍高于 *ace2*；利用基因编辑和分子标记辅助筛选，成功构建了 *ace2* 基因 1-5 号外显子~34 000 bp 大片段缺失的敲除纯合品系 Haace2-KO。相对于野生型对照品系 SCD，Haace2-KO 品系的 *ace1* 基因表达量没有显著变化（$P > 0.05$），乙酰胆碱酯酶活力是对照品系 SCD 的 0.88 倍，且二者无显著差异（$P > 0.05$）；敲除 *ace2* 基因，棉铃虫对辛硫磷、毒死蜱、灭多威、茚虫威、功夫菊酯和氯虫苯甲酰胺的敏感性没有显著差异（0.5-1.9 倍）。**【结论】** *ace2* 基因的敲除对棉铃虫乙酰胆碱酯酶活力和抗胆碱酯酶杀虫剂的敏感性均没有影响，说明 AChE2 不是参与棉铃虫体内神经传导的关键酶。

关键词 棉铃虫；*ace2*；CRISPR/Cas9；AChE；有机磷；氨基甲酸酯

Effect of *ace2* gene knockout on AChE activity and insecticide sensitivity in *Helicoverpa armigera*

DONG Rong-Rong** GUAN Fang XIAO Xin YANG Yi-Hua***

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract **[Aim]** To clarify the role of the HaAChE2 gene in the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*), and more specifically, to determine if it is the main acetylcholinesterase gene in this pest. **[Methods]** We first used qRT-PCR to investigate the expression pattern of the *ace1* and *ace2* genes. We then constructed an *ace2* gene knockout (KO) strain using the CRISPR/Cas9 system and compared the expression of the *ace1* gene, AChE activity and the toxicity of six insecticides including phoxim, chlorpyrifos and methomyl, between the knockout strain and the wild-type SCD strain. **[Results]** Both *ace* genes are expressed in different larval stages and tissues. Expression of *ace1* was generally higher than that of *ace2*. A homozygous knockout strain (Haace2-KO) with a ~34 000 bp deletion from exon 1 to exon 5 on the *ace2* gene was successfully obtained using CRISPR/Cas9-mediated gene editing and molecular marker-assisted selection. There was no significant difference in the expression of the *ace1* gene or AChE activity between the Haace2-KO strain and the wild-type SCD strain ($P > 0.05$). Bioassay results show that there was no significant difference in the toxicity ratios of phoxim, chlorpyrifos, methomyl, indoxacarb, beta-cyhalothrin and chlorantraniliprole (0.5 to 1.9 fold) between the Haace2-KO strain and the SCD strain. **[Conclusion]** The results indicate that knockout of the *ace2* gene has no effect on either AChE activity, or anti-cholinesterase insecticide sensitivity, in *H. armigera*. These findings provide direct evidence that AChE2 is not

*资助项目 Supported project：棉花害虫抗药性基因和敏感基因资源调查（2018FY101103）

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

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yhyang@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2024-5-19；接受日期 Accepted：2024-09-28

involved in enzymatic reactions in the nervous system of *H. armigera.*

Key words *Helicoverpa armigera*; *ace2*; CRISPR/Cas9; AChE; organophosphate; carbamate

乙酰胆碱酯酶（Acetylcholinesterase, AChE）是一类重要的丝氨酸水解酶，其主要作用是在神经系统内胆碱能突触间将神经递质乙酰胆碱水解为乙酸和胆碱，从而维持正常的神经冲动（Toutant, 1989）。同脊椎动物一样，昆虫中也发现了 AChE 功能的多样性，表现出一些非神经系统突触酶的特性，如参与化学防御、影响虫体的生长发育和运动能力等（Ye *et al*., 2017; Kim and Lee, 2018）。

除双翅目环裂亚目的蝇类如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蝇 *Musca domestica* 等只有 1 个 *ace2* 基因外，绝大多数昆虫有 *ace1* 和 *ace2* 2 个不同的乙酰胆碱酯酶基因，分别编码形成 AChE1 和 AChE2。进化分析表明这 2 个 *ace* 基因的分化早于昆虫纲，与扁形动物门具有最后的共同祖先（Cha and Lee, 2015）。昆虫中 *ace* 基因数量的差异，使得研究 2 种乙酰胆碱酯酶的功能分化成为了热点。通常认为 *ace1* 在大部分昆虫中是主要的乙酰胆碱酯酶基因，其编码的蛋白参与神经系统的酶促反应，主要证据是大部分农业害虫中 *ace1* 的表达量远高于 *ace2*。但 Kim 和 Lee（2013）比较了 18 个目 100 种昆虫 2 种乙酰胆碱酯酶的催化活性，AChE1 在其中 2/3 的昆虫中表现出比 AChE2 更高的活性，而在其它 33 种昆虫中则是 AChE2 表现为主要参与酶促反应的乙酰胆碱酯酶，其中既有只有 *ace2* 基因的蝇类和膜翅目社会性昆虫蜜蜂和熊蜂等，还有其它 11 个目的昆虫。值得注意的是，有研究表明家蚕 *Bombyx mori* 中也是 *ace2* 基因的表达量高（Chen *et al*., 2009）。比较 2 个 *ace* 基因的氨基酸序列可以发现，2 个基因间相似性平均小于 40%，但酶促反应关键部位的氨基酸序列相似性大于 80%，因此可以理解 2 种乙酰胆碱酯酶都可以有相应的酶解能力（Cha and Lee, 2015）。

乙酰胆碱酯酶是有机磷类（Organophosphates, OPs）和氨基甲酸酯类（Carbamates, CBs）杀虫剂的主要作用靶标，这类药剂与 AChE 的不可逆结合会影响正常的酶解反应导致神经冲动的传递受阻，但 *ace* 基因突变则会导致对药剂抗性的产生。一般认为与这类杀虫剂靶标抗性相关的主要是 *ace1* 基因突变（Baek *et al*., 2005; Cassanelli *et al*., 2006; Lee *et al*., 2007），但马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 有明确的证据指出 *ace2* 的 S238G 突变与对有机磷的抗性相关（Zhu *et al*., 1996）。Guo 等（2017）总结了 440 篇发表论文，在常见农业和卫生害虫的 5 个目 30 多种昆虫与抗性相关的乙酰胆碱酯酶基因突变中，*ace1* 的 10 个突变位点存在 14 种氨基酸突变，*ace2* 的 18 个突变位点中存在 22 种氨基酸突变，2 个基因上有几个共同的突变位点，但其中 5 个共同的突变位点都在酶的活性峡谷中，说明乙酰胆碱酯酶的关键氨基酸突变导致抗性的产生。既然 2 个 *ace* 基因在不同昆虫中表达量与突变位点都各有特点，在特定昆虫中研究这 2 个基因的功能分化，特别是明确具体参与了神经系统酶促反应的 AChE，才能有助于确定有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 有 2 个 *ace* 基因，有报道 *ace2* 的氨基酸突变与其对久效磷的抗性有关（Ren *et al*., 2002）。在人工饲料中添加 siRNA 饲喂棉铃虫初孵幼虫，观察发现随着 siRNA 浓度的增加，棉铃虫乙酰胆碱酯酶基因的表达减少、酶活力下降、幼虫体小、蛹畸形甚至成虫产卵量很少，推测棉铃虫的 2 个 *ace* 基因被干扰，未能区分出棉铃虫 *ace1* 和 *ace2* 的功能差异（Kumar *et al*., 2009）。目前，利用 CRISPR/Cas9 技术对棉铃虫各类基因进行功能验证已经非常成熟，如敲除其中肠钙粘蛋白基因会对 Cry1Ac 产生 550 倍抗性（Wang *et al*., 2016）；对棉铃虫细胞色素 P450 基因 CYP6AE 基因簇进行敲除，提高了棉铃虫对顺式氰戊菊酯和茚虫威的耐受性（Wang *et al*., 2018）；棉铃虫 *nAChRα6* 基因引入缺失突变，会导致对多杀菌素的抗性，证明了 *α6* 亚基是多杀菌素的作用靶标（Wang *et al*., 2020）。本研究用 CRISPR/Cas9 技术对棉铃虫乙酰胆碱酯酶基因 *ace2* 进行体内敲除，建立基因敲除纯合品系，检测基因敲除后对乙酰胆碱酯酶

活力的影响及棉铃虫对不同杀虫剂敏感性的变化，为 AChE2 是否参与棉铃虫神经系统的酶促反应提供直接的证据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

棉铃虫室内品系 SCD，该品系于 20 世纪 70 年代采自非洲科特迪瓦，由拜耳公司在 2001 年提供。在室内从未接触任何化学杀虫剂，用人工饲料（以麦胚粉和大豆粉为主要成分）饲养超过 30 年。幼虫饲养温度（26±1）℃，光周期为 14 L∶10 D。成虫置于相同的温度和光周期的环境中，产卵时相对湿度控制在 75%左右，并供以 10%的蜂蜜水。

1.2　主要试剂和仪器

1.2.1　主要试剂　HiScript® Ⅲ RT SuperMix for qPCR 定量反转录试剂盒，诺唯赞生物科技股份有限公司；TB Green Premix Ex Taq Ⅱ，Takara Bio 中国；TRIzol Reagent 试剂盒、GeneArt™ precision gRNA synthesis kit 试剂盒、Cas9 蛋白（GeneArt ™），赛默飞世尔科技（中国）有限公司；QIAquick PCR 纯化试剂盒，凯杰（上海）有限公司；AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit 250-prep，爱思进生物技术（杭州）有限公司；牛血清白蛋白（BSA）和考马斯亮蓝 R250，北京索莱宝科技有限公司；2-硝基苯甲酸（DTNB），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；碘化乙酰硫代胆碱（ATChI），上海麦克林生化科技有限公司；40%辛硫磷乳油，湖北仙隆化工股份有限公司；40%毒死蜱乳油，兴农药业（中国）有限公司；96.6%功夫菊酯原药，拜耳公司；97%灭多威原药、95%茚虫威原药及 95%氯虫苯甲酰胺原药，湖北猫尔沃生物医药有限公司。

1.2.2　主要仪器　Mastercycler PCR 扩增仪和 FemtoJet 显微注射仪，Eppendorf 公司；P-97 型拉针仪，美国 Sutter 公司；Bio-Rad CFX Connect 荧光定量 PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；VersaMax 型酶标仪，美国 Molecular Devices 公司。

1.3　*ace1* 和 *ace2* 基因的表达量分析

为比较棉铃虫幼虫不同发育阶段及不同组织中 2 个 *ace* 基因的表达水平，选取 SCD 品系 1-5 龄幼虫和 5 龄幼虫的不同组织（头部、中肠、表皮和脂肪体）；为测定棉铃虫 *ace2* 基因敲除是否对 *ace1* 基因表达产生影响，取 SCD 品系和敲除纯合品系 Haace2-KO 的 5 龄幼虫头部组织。每 5 头虫体相应组织为一个样品，每个样品 4 个生物学重复。用 TRIzol Reagent 试剂盒提取 RNA，用 HiScript® Ⅲ RT SuperMix for qPCR 试剂盒合成第一链 cDNA，于 - 20 ℃保存备用。

根据棉铃虫 SCD 品系 *ace1* 基因（GenBank：JF894118.1）和 *ace2* 基因（GenBank：JF894119.1）的 CDS 序列分别设计 2 个基因的定量检测引物 ace1-qPCR-F/R 和 ace2-qPCR-F/R（表 1）。本研究所有引物均由北京擎科生物科技有限公司合成。以第一链 cDNA 为模板，以 *EF-1α* 为内参基因（Yang *et al*., 2006）进行基因表达量的荧光定量 PCR 反应。通过预实验来确定靶标基因以及内参基因的引物特异性和扩增效率。反应体系为：*TB Green* Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL、cDNA 模板 9.2 μL、10 μmol·L^{-1} 的正反向引物各 0.4 μL，同时以无核酸酶水代替 cDNA 模板作为阴性对照。荧光定量 PCR 反应程序为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环；最后添加溶解曲线。基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算（Schlichting，2000）。

1.4　sgRNA 的设计与合成

根据 CRISPR 的 sgRNA 靶标序列设计原则：5′-GGN_{18}NGG-3′（下划线表示 PAM 序列），在棉铃虫 *ace2* 基因的第 1 外显子和第 5 外显子区域找到特异性的靶标序列（第 1 外显子：5′-GGCTACGCTAAGACAGTTATGGG-3′；第 5 外显子：5′-GACGGGACTAGCGGGCCAGCCGG-3′）。按照 GeneArt™ Precision gRNA 合成试剂盒说明书要求合成引物 ace2-sgRNA1-F/R 和 ace2-sgRNA2-F/R，再根据试剂盒要求合成和纯化 sgRNA。首先基于 PCR 反应合成 sgRNA 的 DNA 模板，反应体系为：Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix（2×）12.5 μL、Tracr Fragment + T7 Primer Mix 1 μL、0.3 μmol·L^{-1} target F/R Oligonucleotide Mix 1 μL、Nuclease-free H_2O 10.5 μL。PCR 反应程序为：98 ℃预变性 10 s；98 ℃变性 5 s，60 ℃

退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃延伸 10 min 后，于 4 ℃保存。PCR 反应结束后用 QIAquick PCR 纯化试剂盒对产物进行纯化作为 sgRNA 合成的 DNA 模板。然后于体外转录合成 sgRNA，体外转录的体系为：NTP mix 8 μL、DNA 模板 6 μL、5 × TranscriptAid™ Reaction Buffer 4 μL 及 TranscriptAid™ Enzyme Mix 2 μL。将反应体系置于 37 ℃孵育 3 h，然后向转录体系中加入 1 μL DNaseI 再在 37 ℃孵育 15 min。最后对转录获得的 sgRNA 进行纯化，保存于 - 80 ℃备用。

1.5 CRISPR/Cas9 介导的棉铃虫 *ace2* 基因敲除品系的建立

按照 Wang 等（2016）的方法进行棉铃虫卵的收集和注射。收集棉铃虫 SCD 品系 2 h 之内产的卵，使用 1%的次氯酸钠溶液清洗，再用纯水将卵粒清洗 2 遍。之后经过漏斗过滤，将卵集中在滤纸上。在显微镜下将卵粒排成直线，并用双面胶将卵粒固定，用于注射。每粒卵内大约注射 1 nL 的 sgRNA（300 mg·L^{-1}）和 Cas9 蛋白（100 mg·L^{-1}）混合液。将注射后的卵放在正常的幼虫饲养环境中，2 d 后在双面胶和卵表面上撒上面粉，防止幼虫孵化后被胶沾粘，待幼虫孵化后转至人工饲料饲养至化蛹。

参照 Wang 等（2020）的方法进行杂交和基因型检测。取成功羽化后棉铃虫成虫后足，利用 Axygen DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA，采用标记辅助选择法，利用两对特异性引物 ace2-check-f1/r1（延伸 30 s）和 ace2-check-f2/r2（延伸 1 min）（表 1）对包含 sgRNA 靶标位点的片段进行 PCR 扩增，通过电泳条带类型鉴定棉铃虫 *ace2* 基因是否被成功敲除以及突变类型。PCR 反应体系为：2×Taq Master Mix 12.5 μL、ddH_2O 9.5 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL。反应条件：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，35 个循环；72 ℃延伸 7 min，10 ℃保存。将 PCR 产物电泳检测，出现约 200 bp 目的条带则可能为编辑个体；随后将产物送至北京擎科生物科技有限公司直接测序，若靶标位点附近出现明显的嵌合体套峰，则确定为 G_0 代编辑个体。将 G_0 代编辑个体的雌蛾与对照品系 SCD 的雄蛾单对杂交，反之亦然。待单对后代（G_1）长至成虫后，取其后足进行 PCR 检测确定是否含敲除突变型基因；将 G_1 代中的编辑个体进行杂交，检测杂交后代（G_2），保留纯合编辑个体构建基因敲除突变纯合品系 Haace2-KO。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

目的 Purpose	引物名称 Primer	引物序列（5′-3′） Sequences (5′-3′)	片段长度（bp） Product size (bp)
荧光定量 PCR qRT-PCR	EF-1α-F	GACAAACGTACCATCGAGAAG	279
	EF-1α-R	GATACCAGCCTCGAACTCAC	
	ace1-qPCR-F	TGATACTCCCGATGTTCCAGG	128
	ace1-qPCR-R	CAGCCGACTCACCGAATAAAG	
	ace2-qPCR-F	GAGTCCGTCATCATCAAGATAAGC	180
	ace2-qPCR-R	CGAACGCCCCAACCCTA	
sgRNA 合成 sgRNA synthesis	ace2-sgRNA1-F	TAATACGACTCACTATAGCTACGCTAAGACAGTTAT	—
	ace2-sgRNA1-R	TTCTAGCTCTAAAACATAACTGTCTTAGCGTAG	
	ace2-sgRNA2-F	TAATACGACTCACTATAGCGGGACTAGCGGGCCAGC	—
	ace2-sgRNA2-R	TTCTAGCTCTAAAACGCTGGCCCGCTAGTCCCG	
靶标位点检测 Mutation detection	ace2-check-f1	CCAACCATCACGA CACCAC	186
	ace2-check-r1	TCATTCCAGAAAGCGCAAGC	
	ace2-check-f2	GGTTCCCCAGCACTTACGAG	661
	ace2-check-r2	CAAAAACACGCCGTCAACCG	

—表示该引物非用于序列片段的扩增。

— means that primers are not for sequence fragment amplification.

1.6　棉铃虫乙酰胆碱酯酶活性测定

棉铃虫乙酰胆碱酯酶活性测定参考 Han 等（1998）方法，稍作修改。分别取 5 头 Haace2-KO 品系和 SCD 品系的 5 龄初幼虫头部组织，向组织中加入 1 200 μL 0.1 mol·L^{-1} pH 7.0 的磷酸缓冲液（含 0.1% Triton-100），冰浴匀浆；5 000 g，4 ℃离心 5 min，取上清液；12 000 g，4 ℃离心 20 min，取上清液为酶液。共设置 4 个生物学重复。在酶标板每孔中依次加入 50 μL 酶液、50 μL 0.1 mol·L^{-1} pH 7.0 的磷酸缓冲液、100 μL 4 mmol·L^{-1} DTNB 和 100 μL 0.01 mmol·L^{-1} ATChI，重复 3 次。然后用 VersaMax 型酶标仪记录光密度值的变化。检测条件：波长 405 nm，温度 25 ℃，动力学法检测 20 min。

采用 Bradford（1976）法测定酶液的蛋白质含量，以牛血清白蛋白（BSA）制作标准曲线。在酶标仪中，25 ℃ 595 nm 条件下进行读数。

1.7　杀虫剂对棉铃虫毒力的生物测定

杀虫剂生物测定采用饲料药膜法。首先用含 10% Triton X-100 的丙酮将功夫菊酯原药、灭多威原药、茚虫威原药和氯虫苯甲酰胺原药分别配制成浓度为 10 000、10 000、10 000 和 1 000 mg·L^{-1} 制剂，再用含有 0.1% Triton X-100 的蒸馏水将配制制剂稀释 5-6 个系列浓度；辛硫磷乳油和毒死蜱乳油则直接用含有 0.1% Triton X-100 的蒸馏水稀释 5-6 个系列浓度，用 0.1% Triton X-100 水作对照。将 100 μL 杀虫剂溶液加到预先做好的 24 孔板的饲料表面上，在室温下将饲料表面晾干，接入 2 龄初幼虫 1 头，每个浓度测试 48 头幼虫，48 h（氯虫苯甲酰胺是 72 h）后检查幼虫的死亡率。用毛笔触动虫体，如果幼虫无法正常移动，则判定其死亡。

1.8　数据分析

使用 SPSS 19.0 软件对基因表达量进行单因素方差分析（One-way ANOVA），在假定方差齐性参数条件下利用 LSD 法进行多重比较差异分析。AChE 活性测定数据的处理和分析用 Microsoft Office Excel 2019 和 SPSS19.0 软件完成，使用单因素方差分析 Tukey's HSD 检验（$P < 0.05$），以 *ace* 基因敲除品系的 AChE 活力/SCD 品系的 AChE 活力作为酶活力比值。生物测定的结果分析采用 PoloPlus 软件（Robertson *et al.*, 2002），分别计算剂量-效应回归方程（LDP 线）的斜率、标准误、LC_{50} 值以及 95%置信限。毒力指数（Toxicity ratio）为敲除品系的 LC_{50} 值与对照品系 SCD 的 LC_{50} 值的比值。

2　结果与分析

2.1　棉铃虫 *ace1* 基因和 *ace2* 基因在幼虫不同发育时期和组织中的表达水平

qRT-PCR 结果分析显示，2 个 *ace* 基因在棉铃虫幼虫不同发育阶段均表达（图 1）。2 个基因在 1-4 龄幼虫的表达量存在显著差异（$P < 0.05$），其中 *ace1* 的表达量分别是 *ace2* 的 2.3、2.0、1.5 和 1.6 倍，而 5 龄幼虫的表达量无显著差异（$P > 0.05$）（图 1：A）；在 5 龄幼虫的不同组织中，*ace1* 和 *ace2* 在头部的表达量最高，且显著高于其它组织（$P < 0.05$），在中肠和脂肪体中 *ace2* 的表达量显著高于 *ace1*（$P < 0.05$），但在头部和表皮中两个基因的表达量没有显著性差异（$P > 0.05$）（图 1：B）。

2.2　CRISPR/Cas9 介导的棉铃虫 *ace2* 基因编辑

SCD 品系的卵注射 800 粒后，卵的孵化率为 22.9%（183/800），其中有 105 头幼虫化蛹（表 2）。待蛹羽化之后，对 96 头成虫（♀：49 头；♂：51 头）的编辑位点进行检测（图 2：A），根据电泳检测结果确定有 39 头为携带 *ace2* 基因大片段缺失的编辑个体（G_0）（图 2：B）。

2.3　棉铃虫 *ace2* 基因敲除纯合品系 Haace2-KO 的建立

将携带 *ace2* 基因大片段缺失突变的 G_0 代雌性成虫与敏感品系 SCD 的雄性成虫单对杂交，反之亦然。39 个单对中有 17 对产生了有效卵（G_1）。卵孵化后，对每个单对后代随机取样 5 头为一组，提取基因组 DNA，经检测发现只有一个单对后代有编辑个体。对该单对后代留种 200 头（G_1），待 G_1 代长至成虫后，对 96 头成虫进行检测，G_1 代杂

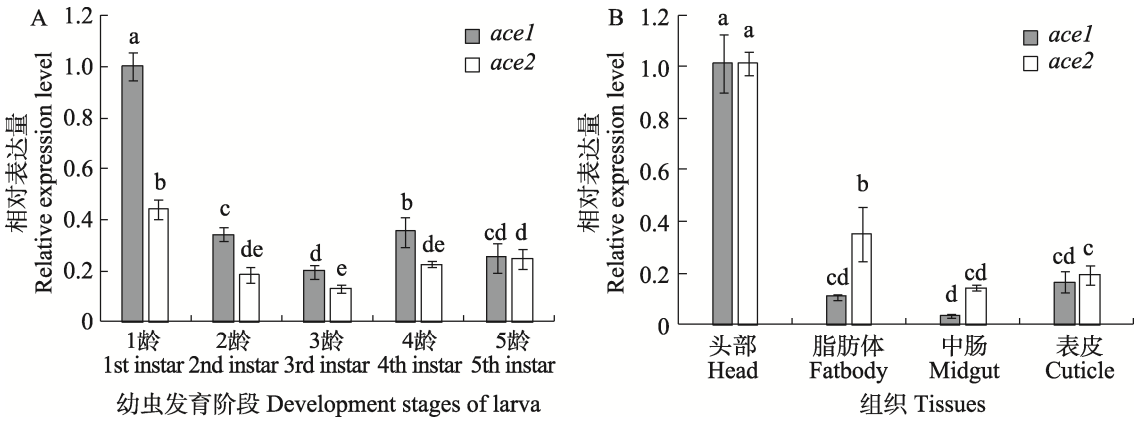

图 1　*ace1* 和 *ace2* 基因在棉铃虫幼虫不同龄期和 5 龄幼虫不同组织的相对表达量

Fig. 1　The relative expression levels of *ace1* and *ace2* in different instar larvae and different tissues of 5th instar larvae in *Helicoverpa armigera*

A. *ace1* 和 *ace2* 在 1-5 龄期幼虫中的相对表达量；B. *ace1* 和 *ace2* 在 5 龄幼虫不同组织中的相对表达量。数据为平均值±标准误，柱上标有不同小写字母代表不同组织及不同基因之间的差异显著（$P < 0.05$，LSD 检验）。

A. Relative expression levels of *ace1* and *ace2* in 1st-5th instar larvae; B. Relative expression levels of *ace1* and *ace2* in different tissues of 5th instar larvae. Data are presented as mean ± SE. Histograms with different letters indicate significant difference between different tissues and genes at the 0.05 level by LSD test.

表 2　棉铃虫 Haace2-KO 敲除品系建立过程中的孵化率和基因型频率

Table 2　Hatch rate and genotype frequency in the establishment of Haace2-KO knockout strain of *Helicoverpa armigera*

注射卵量（粒） Injected eggs (grain)	孵化率 G_0（%） Hatching rate (%)	杂合子比率 G_1（%） Heterozygote ratio (%)	纯合子比率 G_2（%） Homozygote ratio (%)
800	22.9（183/800）	27.1（26/96）	24（36/150）

合子频率为 27.08%（26/96）（表 2）。将 G_1 代编辑个体进行杂交，对杂交后代进行检测，G_2 代纯合子频率为 24%（36/150）。G_2 代编辑类型共有 2 种，KO-1 断裂 34 029 bp，KO-2 断裂 34 012 bp，通过对 21 头纯合子进行测序，编辑类型 KO-1 与 KO-2 的比例为 3∶4（图 2：C），保留纯合子后代建立棉铃虫 *ace2* 基因敲除纯合品系 Haace2-KO。

2.4　棉铃虫 Haace2-KO 中 *ace1* 基因的表达量测定

qRT-PCR 结果分析显示，棉铃虫 *ace2* 基因敲除品系 Haace2-KO 中 *ace1* 基因的表达量与 SCD 品系相比无显著差异（$P > 0.05$）（图 3），说明 *ace2* 基因的敲除对 *ace1* 基因的表达无影响。

2.5　棉铃虫 *ace2* 基因敲除对 AChE 活性的影响

利用动力学法测定了 SCD 品系和 Haace2-KO 品系的 AChE 活性（表 3），Haace2-KO 品系的 AChE 酶活力是对照品系 SCD 的 0.88 倍，说明 *ace2* 基因敲除后棉铃虫幼虫 AChE 活性下降了 12%，但 2 个品系间酶活力在统计学上无显著差异（$P > 0.05$）。

2.6　棉铃虫 *ace2* 基因敲除对 6 种杀虫剂毒力的影响

相比于 SCD 品系，棉铃虫 *ace2* 基因敲除纯合品系 Haace2-KO 品系对辛硫磷、毒死蜱、灭多威、茚虫威、功夫菊酯和氯虫苯甲酰胺 6 种杀虫剂的毒力指数分别为 1.3、1.5、1.0、0.5、1.9 和 1.0，2 个品系间 6 种杀虫剂 LC_{50} 的 95%置信区间基本重叠（表 4），说明棉铃虫 *ace2* 基因敲除不影响 6 种杀虫剂的毒力，AChE2 不是这些杀虫剂的作用靶标。

3　讨论

绝大多数昆虫体内有 2 个乙酰胆碱酯酶基因，了解这 2 种乙酰胆碱酯酶的基本特性和功能

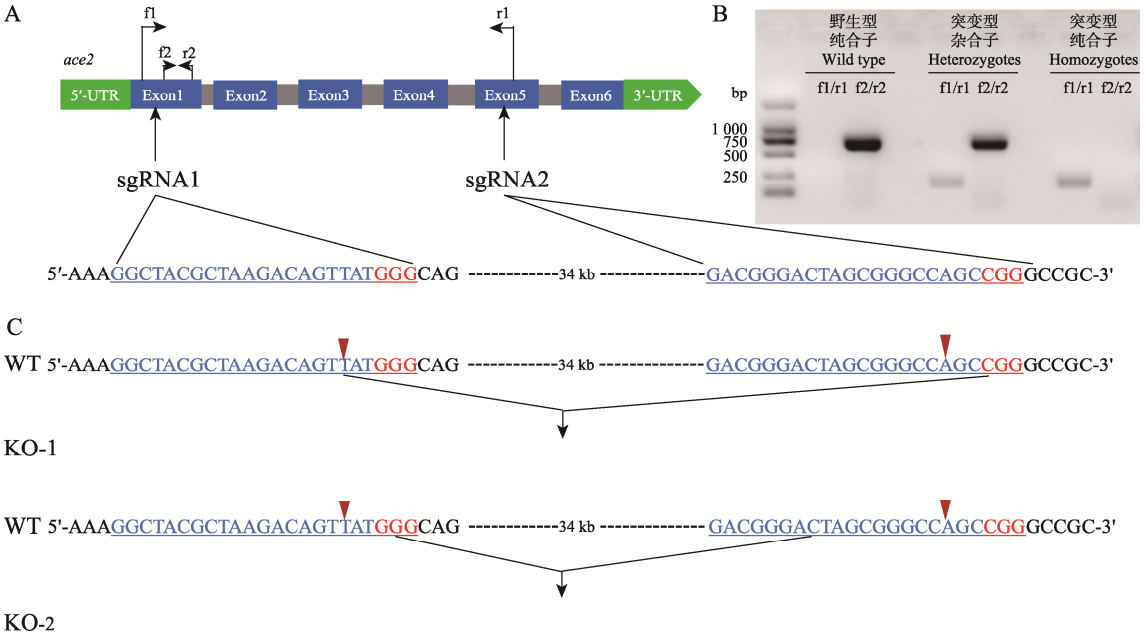

图 2　CRISPR/Cas9 介导的 *ace2* 基因敲除

Fig. 2　CRISPR/Cas9 mediated *ace2* gene knockout

A. 棉铃虫 *ace2* 基因上的 2 个 sgRNA 设计位点及 sgRNA 的靶标序列，2 对引物用于等位基因特异性 PCR 检测；B. 根据 2 对等位基因特异性引物扩增的 PCR 产物的条带模式对棉铃虫个体进行 *ace2* 基因分型；C. Haace2-KO 中 *ace2* 基因 2 种编辑类型的直接测序峰图。WT：野生型；KO-1，KO-2：2 种编辑类型。PAM 序列用红色突出显示，红色三角形指示断裂位点。

A. Position of two sgRNAs for gene knockout and the target sequence of two sgRNAs on *ace2* gene, two pairs of primer for allele-specific PCR detection in *H. armigera*; B. Genotyping of individual *H. armigera* for truncated *ace2* according to banding patterns of the PCR products amplified with two pairs of allele-specific primer; C. Sequencing chromatograms of *ace2* genotyping of two homozygotes from the Haace2-KO. WT: Wild-type; KO-1, KO-2: Two editing types. PAM sequences are highlighted with red, the red triangle indicates the cleavage sites.

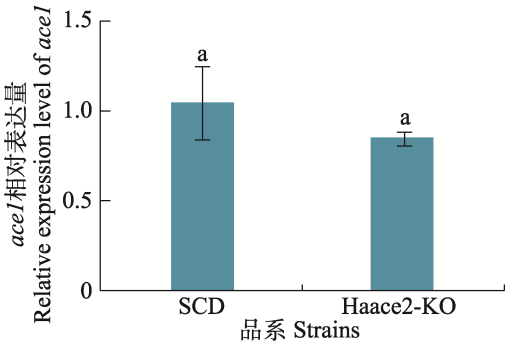

图 3　棉铃虫 *ace1* 基因在 SCD 品系和 *ace2* 基因敲除品系的相对表达量

Fig. 3　The relative expression level of *ace1* of *Helicoverpa armigera* in SCD and *ace2* gene knockout strains

数据为平均值±标准误，柱上标有相同小写字母表示不存在显著差异（$P > 0.05$，LSD 检验）。

Data are mean ± SE, histograms with the same lowercase letters indicate no significant difference at the 0.05 level by LSD test.

表 3　Haace2-KO 和 SCD 品系的 AChE 活力

Table 3　The AChE activity of Haace2-KO and SCD strains

品系 Strain	AChE 活力（mOD·min^{-1}·mg^{-1}） AChE activity (mOD· min^{-1}·mg^{-1})
Haace2-KO	16.5±1.5 a
SCD	18.8±2.5 a

数据为平均值 ± 标准误，数据后标有相同小写字母表示差异不显著（$P > 0.05$，Tukey's HSD）。

Data are mean ± SE, and followed by the same lowercase letters indicate no significant difference at the 0.05 level by Tukey's HSD test.

分化，明确参与昆虫神经冲动传递的乙酰胆碱酯酶，找准相应的杀虫剂作用靶标，对于害虫的化学防治和抗性治理具有重要意义（Kim and Lee, 2018）。有关鳞翅目害虫甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、斜纹夜蛾 *S. litura*、小菜蛾 *Plutella*

表 4 6 种杀虫剂对 Haace2-KO 和 SCD 品系的毒力

Table 4 Toxicity of six insecticides against Haace2-KO and SCD strains

杀虫剂 Insecticides	品系 Strains	测定虫数（*n*） Number of insects tested (*n*)	致死中浓度（95%置信限）（mg·L^{-1}） LC_{50} (95% confidence intervals) (mg·L^{-1})	斜率 ± 标准误 Slope ± SE	毒力指数 Toxicity ratio
辛硫磷 Phoxim	Haace2-KO	288	6.400（6.052-6.820）	7.178±0.837	1.3
	SCD	240	4.826（2.730-14.607）	2.138±0.262	
毒死蜱 Chlorpyrifos	Haace2-KO	288	3.465（3.038-4.080）	5.279±0.554	1.5
	SCD	288	2.337（2.185-2.491）	6.682±0.721	
灭多威 Methomyl	Haace2-KO	240	37.906（35.046-40.530）	6.823±0.898	1.0
	SCD	240	36.371（29.828-42.176）	5.320±0.677	
茚虫威 Indoxacarb	Haace2-KO	240	0.873（0.583-1.284）	3.501±0.357	0.5
	SCD	240	1.664（1.047-2.464）	3.598±0.376	
功夫菊酯 Beta-cyhalothrin	Haace2-KO	240	8.193（5.155-10.727）	5.209±0.688	1.9
	SCD	240	4.401（3.056-5.850)	2.796±0.356	
氯虫苯甲酰胺 Chlorantraniliprole	Haace2-KO	240	0.504（0.419-0.608）	2.373±0.262	1.0
	SCD	240	0.507（0.405-0.636）	1.854±0.230	

毒力指数=Haace2-KO 品系的 LC_{50}/SCD 品系的 LC_{50}。

Toxicity ratio=LC_{50} of Haace2-KO/LC_{50} of SCD.

xylostella 和烟青虫 *H. assulta*（Baek *et al*., 2005; Lee *et al*., 2006; Salim *et al*., 2017; Zhao *et al*., 2019）以及本文对棉铃虫的研究结果显示，2 种 *ace* 基因在这 5 种鳞翅目害虫幼虫的所有龄期均表达，且 2 个基因在头部组织中的表达量显著高于其它组织；但甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、小菜蛾和烟青虫 *ace1* 基因在头部组织中的表达量显著高于 *ace2* 基因的表达量，而本文结果表明棉铃虫 *ace1* 在各龄期的表达量高于 *ace2*，但在头部组织中的表达量没有显著差异，进一步分析棉铃虫 2 种乙酰胆碱酯酶功能分化需要更多的证据。

RNAi 技术已应用于多种昆虫 *ace* 基因功能分化的研究。德国小蠊 *Blattella germanica* 的 *Bgace1* 的表达量明显高于 *Bgace2*，编码了主要的乙酰胆碱酯酶，但组织表达谱和荧光原位杂交实验结果显示 BgAChE2 在中枢神经系统中有表达；利用 dsRNA 干扰德国小蠊成虫体内 2 个 *ace* 基因，在干扰效率相同情况下乙酰胆碱酯酶活力分别下降 47.5%和 16.0%，BgAChE1 对总的酶活力贡献约占 65%-75%，干扰 2 个基因的表达后对繁殖没有影响，只有干扰 *ace1* 会影响其对毒死蜱的敏感性，肯定了德国小蠊中 BgAChE1 主要参与了神经信号传递（Kim *et al*., 2006, 2010; Revuelta *et al*., 2009）。对小菜蛾、二化螟 *Chilo suppressalis*、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾和家蚕的 *ace* 基因进行干扰，会导致幼虫死亡率增加、生长发育受抑制、畸形甚至运动能力受影响（Hui *et al*., 2011; He *et al*., 2012；Salim *et al*., 2017；Ye *et al*., 2017; Zhao *et al*., 2019）；相比于 *ace2*，对 *ace1* 基因的敲减会产生更高的死亡率，干扰家蚕 *ace2* 对其生长发育和运动能力的影响更大，这与家蚕中 AChE2 是主要乙酰胆碱酯酶的结论相吻合。利用 RNAi 技术敲减棉铃虫 *ace* 基因，也导致干扰后幼虫的适合度显著降低，生长发育受到严重抑制甚至死亡（Kumar *et al*., 2009）。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在棉铃虫体内对 *ace* 基因进行直接敲除，这不仅可以克服鳞翅目昆虫 RNAi 干扰效率低的问题，而且通过建立只有特定 *ace* 基因完整表达的材料，明确相关基因的功能（Terenius *et al*., 2011; Douris *et al*.,

2020）。Haace2-KO 是在敲除了 *ace2* 基因第 1 外显子到第 5 外显子中大约 34 kb 片段后建立的基因敲除突变纯合品系，该品系中 *ace1* 的表达并未受到明显影响，敲除纯合品系的 AChE 活性下降了 12%，但与对照品系 SCD 相比差异不显著，说明棉铃虫 *ace2* 基因的敲除对 AChE 活性影响不大，棉铃虫 AChE 活性中 HaAChE1 的贡献达到近 90%，这个结果与沉默德国小蠊 *B. germanica* 的 *ace2* 基因使其 AChE 活性下降了 16%的结果相似。本研究结果再次证明了 2 个 *ace* 基因间的非协同表达，这也说明 2 个基因间存在着功能分化（Revuelta *et al*., 2009）。作者也尝试了敲除棉铃虫 *ace1* 基因，但未能成功，具体原因还有待进一步的探究。

昆虫体内与抗药性相关的基因突变是该基因作为杀虫剂靶标的重要依据（Casida and Durkin, 2013）。在鳞翅目昆虫中，大多数与有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性相关的点突变存在于 AChE1 中。二化螟抗性品系 AChE1 中存在与毒死蜱抗性相关的单一氨基酸替换 A314S，该突变改变了催化三联体中相邻丝氨酸的构象，影响 AChE1 与底物和抑制剂之间的相互作用（Jiang *et al*., 2009）；小菜蛾抗性种群中与有机磷类杀虫剂抗性相关的 G227A 和 A298S 突变均位于 AChE1 上（Baek *et al*., 2005；Lee *et al*., 2007）；草地贪夜蛾 *S. frugiperda* 抗性机理研究中，发现 AChE1 存在 3 个氨基酸替换 A201S、G227A 和 F290V 与有机磷类杀虫剂抗性有关（Carvalho *et al*., 2013），这些突变位点都在乙酰胆碱酯酶的相关重要位置。目前尚未有研究报道棉铃虫 *ace1* 基因突变与有机磷类或氨基甲酸酯类杀虫剂抗性相关，但 Ren 等（2002）的研究发现，棉铃虫久效磷抗性品系 LC-R 试虫的 *ace2* 基因有 9 个氨基酸与敏感品系有差异，其中只有 Ala 585 Thr 突变可能与对久效磷的不敏感有关，但这一突变位于羧基端远离 AChE 的重要位点如酶的活性中心及外周阴离子部位等，这一突变是否与棉铃虫对有机磷的抗性有关还需要进一步证实。在本研究中将棉铃虫 *ace2* 基因直接敲除，没有影响 AChE1 的活性，更没有影响其对 OPs 和 CBs 及其它杀虫剂的敏感性，为 AChE2 不是抗胆碱酯酶杀虫剂的作用靶标提供了直接证据，同时也间接证实了 AChE1 是棉铃虫神经突触传导的关键酶。

目前，我国已成功利用 Bt 棉花对棉铃虫进行防控，但棉田还有盲蝽等其它害虫的危害，且近年来棉铃虫在北方的玉米等其它作物上的危害日渐加重，化学杀虫剂作为对棉铃虫的重要防治手段一直在发挥作用（陆宴辉等, 2018, 2020; Zhang *et al*., 2019; Lu *et al*., 2021）。虽然生产上一直严格控制有机磷杀虫剂等的使用，但抗药性监测结果表明我国田间棉铃虫种群对有机磷类杀虫剂一直存在低至中等水平抗性。Yang 等（2013）为明确 Bt 棉花在种植 15 年后对棉铃虫的抗性水平，在 2011 年测定了 16 个田间种群对辛硫磷的抗性，生物测定结果表明田间种群对辛硫磷处于低水平抗性。最新的监测数据表明 2020 年我国长江流域和黄河流域棉铃虫种群对辛硫磷处于中等水平抗性（抗性倍数 29-68）（张帅，2021）。棉铃虫田间种群中 *ace1* 基因与抗性有关的突变研究也需要加强。CRISPR/Cas9 技术可以在靶标基因中引入相应点突变，活体验证对杀虫剂敏感性的影响，从而得到突变引起抗性产生的直接证据。Zuo 等（2017）利用这一技术在甜菜夜蛾鱼尼丁受体中成功引入 G4946E 突变，突变品系对氯虫苯甲酰胺和氟虫双酰胺分别产生了 223 倍和大于 1 000 倍的抗性，证明了鱼尼丁受体 G4946E 突变与双酰胺类杀虫剂抗性之间的关系。为明确棉铃虫体内 2 种乙酰胆碱酯酶的功能差异，建议进一步开展棉铃虫田间种群 *ace1* 基因突变的检测及利用 CRISPR/Cas9 技术对相关突变进行验证，以完善棉铃虫对有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂抗性机制的研究。

参考文献 (References)

Baek JH, Kim JI, Lee D, Chung BK, Miyata T, Lee SH, 2005. Identification and characterization of *ace1*-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81(3): 164–175.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248–254.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C, 2013. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *PLoS ONE*, 8(4): e62268.

Casida JE, Durkin KA, 2013. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58: 99–117.

Cassanelli S, Reyes M, Rault M, Carlo Manicardi G, Sauphanor B, 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8): 642–653.

Cha DJ, Lee SH, 2015. Evolutionary origin and status of two insect acetylcholinesterases and their structural conservation and differentiation. *Evolution and Development*, 17(1): 109–119.

Chen HJ, Liao Z, Hui XM, Li GQ, Li F, Han ZJ, 2009. *Ace2*, rather than *ace1*, is the major acetylcholinesterase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science*, 16(4): 297–303.

Douris V, Denecke S, Van Leeuwen T, Bass C, Nauen R, Vontas J, 2020. Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance: *Drosophila* and beyond. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167: 104595.

Guo DH, Luo JP, Zhou YN, Xiao HM, He K, Yin CL, Xu JH, Li F, 2017. ACE: An efficient and sensitive tool to detect insecticide resistance-associated mutations in insect acetylcholinesterase from RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 18(1): 330.

Han ZJ, Moores GD, Denholm I, Devonshire AL, 1998. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(3): 164–171.

He G, Sun Y, Li F, 2012. RNA interference of *ace1* and *ace2* in *Plutella xylostella* reveals their different functions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79(2): 75–86.

Hui XM, Yang LW, He GL, Yang QP, Han ZJ, Li F, 2011. RNA interference of *ace1* and *ace2* in *Chilo suppressalis* reveals their different contributions to motor ability and larval growth. *Insect Molecular Biology*, 20(4): 507–518.

Jiang XJ, Qu MJ, Denholm I, Fang JC, Jiang WH, Han ZJ, 2009. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(2): 269–272.

Kim JI, Jung CS, Koh YH, Lee SH, 2006. Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. *Insect Molecular Biology*, 15(4): 513–522.

Kim YH, Choi JY, Je YH, Koh YH, Lee SH, 2010. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 765–776.

Kim YH, Lee SH, 2013. Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1): 47–53.

Kim YH, Lee SH, 2018. Invertebrate acetylcholinesterases: Insights into their evolution and non-classical functions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21(1): 186–195.

Kumar M, Gupta GP, Rajam MV, 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 273–278.

Lee D, Choi JY, Kim WT, Je YH, Song JT, Chung BK, Boo KS, Koh YH, 2007. Mutations of acetylcholinesterase1 contribute to prothiofos-resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(3): 591–597.

Lee D, Kim S, Shin SW, Kim WT, Boo KS, 2006. Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(2): 125–133.

Lu YH, Jiang YY, Liu J, Zeng J, Yang XM, Wu KM, 2018. Structural adjustment of planting industry increases the catastrophe risk of cotton bollworm. *Journal of Applied Entomology*, 55(1): 19–24. [陆宴辉, 姜玉英, 刘杰, 曾娟, 杨现明, 吴孔明, 2018. 种植业结构调整增加棉铃虫的灾变风险. 应用昆虫学报, 55(1): 19–24.]

Lu YH, Liang GM, Zhang YJ, Yang XM, 2020. Achievements and prospects of cotton pest control since the 21st century. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 57(3): 477–490. [陆宴辉, 梁革梅, 张永军, 杨现明, 2020. 二十一世纪以来棉花害虫治理成就与展望. 应用昆虫学报, 57(3): 477–490.]

Lu YH, Wyckhuys KA, Yang L, Liu B, Zeng J, Jiang YY, Desneux N, Zhang W, Wu KM, 2021. Bt cotton area contraction drives regional pest resurgence, crop loss, and pesticide use. *Plant Biotechnology Journal*, 20(2): 390–398.

Ren XX, Han ZJ, Wang Y, 2002. Mechanisms of monocrotophos resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(3): 103–110.

Revuelta L, Piulachs MD, Bellés X, Castañera P, Ortego F, Díaz-Ruíz JR, Hernández-Crespo P, Tenllado F, 2009. RNAi of *ace1* and *ace2* in

Blattella germanica reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(12): 913–919.

Robertson JL, Preisler HK, Russell RM, 2002. PoloPlus: Probit and logit analysis user's guide. LeOra Software, Berkeley, CA.

Salim AM, Shakeel M, Ji JY, Kang TH, Zhang YS, Ali E, Xiao Z, Lu YH, Wan H, Li JH, 2017. Cloning, expression, and functional analysis of two acetylcholinesterase genes in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*: *Biochemistry and Molecular Biology*, 206: 16–25.

Schlichting I, 2000. The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution. *Science*, 287(5458): 1615–1622.

Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric J, Barthel A, Bebas P, Bitra K, Bravo A, Chevalier F, Collinge DP, Crava CM, de Maagd RA, Duvic B, Erlandson M, Faye I, Felföldi G, Fujiwara H, Futahashi R, Gandhe AS, Gatehouse HS, Gatehouse LN, Giebultowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJP, Groot AT, Hauser F, Heckel DG, Hegedus DD, Hrycaj S, Huang L, Hull JJ, Iatrou K, Iga M, Kanost MR, Kotwica J, Li C, Li J, Liu J, Lundmark M, Matsumoto S, Meyering-Vos M, Millichap PJ, Monteiro A, Mrinal N, Niimi T, Nowara D, Ohnishi A, Oostra V, Ozaki K, Papakonstantinou M, Popadic A, Rajam MV, Saenko S, Simpson RM, Soberón M, Strand MR, Tomita S, Toprak U, Wang P, Wee CW, Whyard S, Zhang W, Nagaraju J, ffrench-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smagghe G, 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2): 231–245.

Toutant JP, 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology*, 32(5): 423–446.

Wang HD, Shi Y, Wang L, Liu S, Wu SW, Yang YH, Feyereisen R, Wu YD, 2018. CYP6AE gene cluster knockout in *Helicoverpa armigera* reveals role in detoxification of phytochemicals and insecticides. *Nature Communications*, 9: 4820.

Wang J, Ma HH, Zuo YY, Yang YH, Wu YD, 2020. CRISPR-mediated gene knockout reveals nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit *α6* as a target of spinosyns in *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science*, 76(9): 2925–2931.

Wang J, Zhang HN, Wang HD, Zhao S, Zuo YY, Yang YH, Wu YD, 2016. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76: 11–17.

Yang YH, Chen S, Wu SW, Yue LN, Wu YD, 2006. Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 99(5): 1784–1789.

Yang YH, Li YP, Wu YD, 2013. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. *Journal of Economic Entomology*, 106(1): 375–381.

Ye XH, Yang LW, Stanley D, Li F, Fang Q, 2017. Two *Bombyx mori* acetylcholinesterase genes influence motor control and development in different ways. *Scientific Reports*, 7(1): 4985.

Zhang DD, Xiao YT, Chen WB, Lu YH, Wu KM, 2019. Field monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Cry1Ac insecticidal protein resistance in China (2005-2017). *Pest Management Science*, 75(3): 753–759.

Zhang S, 2021. 2020 National agricultural pest resistance monitoring results and scientific insecticide use recommendations. *China Plant Protection*, 41(2): 71–78. [张帅, 2021. 2020 年全国农业有害生物抗药性监测结果及科学用药建议. 中国植保导刊, 41(2): 71–78.]

Zhao J, Hao DJ, Xiao LB, Tan YA, Jiang YP, Bai LX, Wang K, 2019. Molecular and functional properties of two *Spodoptera exigua* acetylcholinesterase genes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 101(3): e21554.

Zhu KY, Si HL, Clark JM, 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55(2): 100–108.

Zuo YY, Wang H, Xu YJ, Huang JL, Wu SW, Wu YD, Yang YH, 2017. CRISPR/Cas9 mediated G4946E substitution in the ryanodine receptor of *Spodoptera exigua* confers high levels of resistance to diamide insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 89: 79–85.