环境昆虫学报　2024，46（5）：1059 - 1067　http：//hjkcxb. alljournals. net
Journal of Environmental Entomology　doi：10.3969/j. issn. 1674 - 0858. 2024. 05. 05

韩蕊，滕祎，李献锋，王临静，魏霜，张雍哲，乔曦，刘海军，吴尧，马骏，万方浩，刘聪辉，钱万强. 基于酶介导双重指数扩增技术（EmDEA）的小火蚁快速检测方法的开发 [J]. 环境昆虫学报，2024，46（5）：1059 - 1067. HAN-Rui, TENG Yi, LI Xian-Feng, WANG Ling-Jing, WEI Shuang, ZHANG Yong-Zheng, QIAO Xi, LIU Hai-Jun, WU Yao, MA Jun, WAN Fang-Hao, LIU Cong-Hui, QIAN Wan-Qiang. Development of a rapid detection method for *Wasmannia auropunctata* based on enzyme-mediated duplex exponential amplification (EmDEA) [J]. *Journal of Environmental Entomology*，2024，46（5）：1059 - 1067.

基于酶介导双重指数扩增技术（EmDEA）的小火蚁快速检测方法的开发

韩　蕊[1,2]，滕　祎[2]，李献锋[3]，王临静[2]，魏　霜[3]，张雍哲[2]，乔　曦[2]，刘海军[3]，吴　尧[4]，马　骏[3]，万方浩[1,2]，刘聪辉[2*]，钱万强[2*]

（1. 青岛农业大学植物医学学院，山东省环境友好型农业有害生物防治工程技术研究中心，山东省生物入侵与生态安全高校特色实验室，中澳农业与环境健康联合研究院，山东青岛 266109；2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心，农业农村部农业基因数据分析重点实验室，中国农业科学院（深圳）农业基因组研究所，广东深圳 518120；3. 广州海关技术中心，广州 510623；4. 苏州晶睿科技有限公司，江苏苏州 215000）

摘要：小火蚁*Wasmannia auropunctata*是危害性最严重的入侵蚂蚁之一，对动植物、生态、经济甚至是人类都容易造成严重影响，是我国的重大检疫害虫之一。本研究为实现小火蚁的现场快速精准检测，通过自研程序筛选出小火蚁全基因组中的特异性片段，具有更高的特异性，基于酶介导双重指数扩增技术（EmDEA）筛选了适用的引物、RNA探针，全部反应所需时间小于20 min，并验证了其特异性和灵敏度。结果显示这种方法可在短时间内达到极高检测灵敏度与特异性，最低检出限约为4 ng。这种方法极大程度降低对设备的依赖，简单、快速、特异，为小火蚁的基层检测与现场诊断提供技术支持。

关键词：小火蚁；酶介导双重指数扩增技术（EmDEA）；特异性引物；RNA探针；快速鉴定；精准检测
中图分类号：Q968. 1；S433　**文献标识码：**A　**文章编号：**1674-0858（2024）05-1059-09

Development of a rapid detection method for *Wasmannia auropunctata* based on enzyme-mediated duplex exponential amplification (EmDEA)

HAN-Rui[1,2], TENG Yi[2], LI Xian-Feng[3], WANG Ling-Jing[2], WEI Shuang[3], ZHANG Yong-Zheng[2], QIAO Xi[2], LIU Hai-Jun[3], WU Yao[4], MA Jun[3], WAN Fang-Hao[1,2], LIU Cong-Hui[2*], QIAN Wan-Qiang[2*]
(1. College of Plant Health & Medicine, Qingdao Agricultural University, Shandong Engineering Research Center for Environment-Friendly Agricultural Pest Management, Shandong Province Laboratory for Biological invasions and Ecological Security, China-Australia Joint Institute of Agricultural and Environmental Health, Qingdao 266109, Shandong Province, China; 2. Agricultural Genomics institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, Guangdong Province, China; 3. Guangzhou Customs Technical Center, Guangzhou 510623, China; 4. Suzhou Jingrui Technology Co., LTD., Suzhou 215000, Jiangsu Province, China)

Abstract: *Wasmannia auropunctata* is one of the most harmful invasive ants, posing severe threats to flora, fauna, ecosystems, economies, and even humans. It is a significant quarantine pest in China. To achieve rapid and precise on-site detection of the *W. auropunctata*, this study screened specific segments from the whole genome of the *W. auropunctata* through self-developed program, ensuring higher specificity. The

基金项目：国家重点研发计划（2022YFC2601500）
作者简介：韩蕊，女，2000 年生，硕士研究生，研究方向为入侵生物学，E-mail：hanrui0506@126.com
*共同通讯作者 Author for correspondence：刘聪辉，男，博士，副研究员，研究方向为入侵生物学，E-mail：liuconghui@ caas.cn；钱万强，男，博士，研究员，研究方向为入侵生物学，E-mail：qianwanqiang@caas.cn
收稿日期 Received：2024-07-23；接受日期 Accepted：2024-08-27

study also selected suitable primers and RNA probes based on the enzyme-mediated duplex exponential amplification (EmDEA). The total reaction time required was less than 30 minutes, and both specificity and sensitivity were validated. Results demonstrate that this method could achieve extremely high detection sensitivity and specificity in a short time, with a minimum detection limit of approximately 4 ng. This method significantly reduces the dependence on equipment, making it simple, rapid, and specific, thereby providing technical support for grassroots detection and on-site diagnosis of the *W. auropunctata*.

Key words: *Wasmannia auropunctata*; EmDEA; specific primers; RNA probes; rapid identification; precise detection

小火蚁*Wasmannia auropunctata*学名金刻沃氏蚁，是世界自然保护联盟（IUCN）收录的五种危害性最严重的入侵蚂蚁之一，多出现在海岸、人工林区、河岸地带和灌木丛林区等易受干扰地带（杨欢等，2022）。小火蚁在除南极洲之外的各大洲均有分布，入侵的国家包括美国、澳大利亚、西班牙、以色列等。小火蚁具有较强的环境适应能力，其活动会破坏生物多样性，导致入侵地昆虫及节肢类动物种群数量下降，甚至直接取代当地蚂蚁种群，造成作物减产、生态破坏，以及巨大的经济损失（de Souza *et al.*，1998；Delabie *et al.*，2021）。同时，小火蚁体型细小，肉眼难以发现，叮咬人和其他动物会产生强烈的疼痛感，并伴有不同程度的过敏现象（Wetterer and Porter，2003）。据报道，很多工人在从事农事操作过程中被小火蚁哲咬，工人被蛰刺眼睛后容易引起角膜损失，另外在非洲加蓬小火蚁经常在动物进食过程中攀咬其鼻子和眼睛造成家猫和野猪、大象等野生动物失明（Rosselli and Wetterer，2017）。

小火蚁一直是我国植物检疫工作中十分重要的一种入侵害虫（赵翊等，2022），2022年5月，中国大陆首次报道了小火蚁野生种群（Chen *et al.*，2022）。有研究显示，我国华南地区的林地是小火蚁入侵风险最大的地区，另外沿海地区（台湾、海南、广州、福建、浙江、上海、江苏）、西南地区（云南部分地区）和中部地区（湖南中东部、广西北部、江西部分地区）也非常适合小火蚁的生长（Wang *et al.*，2023；徐强等，2023）。现阶段最主要的鉴定方法，主要是通过形态学鉴定和DNA条码技术进行鉴定。但小火蚁体型小，与一些近似昆虫外形相近且经常混合发生为害，在田间野外难以辨别（马骏等，2007），另外进行形态鉴定需要大量的知识储备，在野外田间难以实现。目前常用的分子鉴定标记主要是线粒体保守基因（Cox1、18S等）的特异性区段（Chan *et al.*，2022），在检测病原微生物等遗传群体复杂、进化速率快、成灾风险差异大的入侵物种时，其精准度仍然不能满足实际需求，利用基因组等多组学大数据筛选的新型标记亟待开发。

目前常用的应用于昆虫的分子鉴定方法主要有DNA条形码技术、SS-PCR技术、RAPD（Randomly amplified polymorphic DNA）（Welsh *et al.*，1990；Williams *et al.*，1990），RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）（Botstein *et al.*，1980），AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）（Vossbrinck *et al.*，1989），SSCP（Single Strand Conformation Polymorphisms），DNA序列分析等，但这些方法存在鉴定时间长、操作要求高、检测精准性差、靶点筛选困难等缺点，有些检测也比较费财。因此，势必要研究一种新型快速检测技术用于昆虫物种鉴定。

本研究提出一种用于鉴定小火蚁的方法，是近年新兴起的一种恒温扩增技术，基于特异性基因组DNA片段设计特异性引物、探针，采用酶介导双重指数扩增技术（EmDEA），有机整合了核酸指数扩增及信号指数放大，通过多酶协作（核酸内切酶、聚合酶）对靶标核酸及荧光探针进行双重放大，在42℃恒温下进行等温扩增及等温信号放大。仅需一步加样，加样完成后15 min即可完成反应，一管完成全部反应，具有操作简单、反应速度快、对设备要求低等优点，非常适合田间、野外、口岸等场景现场实时检测。同时，本研究构建了一种基于EmDEA的小火蚁快速检测方法，利用这项技术可以实现小火蚁的快速鉴定及其近似种的区分，提高小火蚁的检出率和准确率，实现现场快速准确检测。

1 材料与方法

1.1 样品采集及DNA提取

本研究所使用的小火蚁来自于广东省汕头市潮南区路边，所使用的红火蚁*Solenopsis invicta*诱捕

于中国农业科学院深圳综合试验基地，其余昆虫采自湖南师范大学相关教学基地以及中国热带农业科学院环境与植物保护研究所试验基地。

本研究所使用的DNA样本均通过热裂解法提取。用研磨杵在离心管中充分研磨后放入裂解管（苏州晶睿生物科技有限公司）中，混匀离心后放入金属浴中95℃加热10 min即可。

1.2　特异片段的筛选与生物信息学验证

在美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）数据库中检索小火蚁(GCA_000956235.1)及其近似物种基因组数据，包括红火蚁*Solenopsis invicta*（GCA_016802725.1）、黑灰心结蚁*Cardiocondyla obscurior*（GCA_019399895.2）、阿根廷蚁*Linepithema humile*（GCA_000217595.1）、小黄家蚁*Monomorium pharaonis*（GCA_003575265.1）、毕氏卵角蚁*Ooceraea biroi*（GCA_003672135.1）、细伪切叶蚁*Pseudomyrmex gracilis*（GCA_002006095.1）、埃及扁胸切叶蚁*Vollenhovia emeryi*（GCA_000949405.1）。建立小火蚁近似物种基因组的数据库，通过自研程序进行基因组比对，筛选出小火蚁的特异性片段。选取所筛选的序列，使用NCBI Nucleotide BLAST比对功能对筛选的序列进行特异性验证。用于比对的18种蚁科昆虫如下：红火蚁（taxid: 13686）、埃及扁胸切叶蚁（taxid: 411798）、细伪切叶蚁（taxid:219809）、毕氏卵角蚁（taxid:2015173）、小黄家蚁（taxid:307658）、阿根廷蚁（taxid: 83485）、佛罗里达弓背蚁*Camponotus floridana*（taxid: 104421）、西班牙箭蚁*Cataglyphis hispanica*（taxid: 1086592）、*Formica gracilis*（taxid: 219809）、毛眼林蚁*Formica exsecta*（taxid: 72781）、印度大头蚁*Pheidole indica*（taxid: 615072）、楔结长齿蚁*Myrmoteras cuneonodum*（taxid: 612986）、稍美刺结蚁*Lepisiota pulchella*（taxid: 2751294）、布氏尼氏蚁*Nylanderia bourbonica*（taxid: 262034）、黄猄蚁*Oecophylla smaragdina*（taxid: 84561）、亮尼氏蚁*Nylanderia vividula*（taxid: 443831）、长角立毛蚁*Paratrechina longicornis*（taxid: 262035）、火神心结蚁*Cardiocondyla kagutsuchi*（taxid: 329304）

1.3　片段特异性的试验验证

所筛选的特异性基因片段使用Primer 5.0软件进行PCR特异性引物设计，所设计的引物序列分别为：正向N1109-FW（CATCAAGTCGGAAACAACATAG）、反向N1109-RV（ATCCCGTCCCTTCATAGAGA），由生工生物（上海）股份有限公司进行合成，合成后选取小火蚁及其他几种蚁科昆虫DNA进行PCR反应（表1、表2），所使用的酶为南京诺唯赞生物科技股份有限公司的2×Taq Plus Master Mix Ⅱ，该酶是由Taq DNA Polymerase与一种含有3’→5’外切酶活性（校对活性）的蛋白以及Mg^{2+}、dNTPs、PCR稳定剂和增强剂组成的混合酶，然后于室温下进行1%琼脂糖凝胶电泳，电压为140 V，时间为20 min，在凝胶成像系统下观察结果。

表 1　PCR反应体系

Table 1　PCR reaction system

反应成分 Reaction ingredients	体积（μL）Volume
N1109-FW(10 μM)	1.5
N1109-RV(10 μM)	1.5
2×Taq Plus Master Mix II	12.0
无酶水 Enzyme-free water	7.5
DNA模板 DNA template	2.5

表 2　PCR反应程序

Table 2　PCR reaction procedure

温度（℃）Temperature	时间Time	循环数 Number of cycles
95	3 min	1
95	15 s	
56	20 s	30
72	30 s	
72	5 min	1

1.4　酶介导双重指数扩增（EmDEA）体系的建立

使用所筛选的小火蚁特异性序列片段设计EmDEA体系的引物、探针组合，其中DNA上、下游引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，RNA探针由苏州晶睿生物科技有限公司合成（RNA探针上标记有荧光报告基团FAM和猝灭基团BHQ1）。共设计合成了6组引物，具体序列信息见表3。并用上述引物、探针组，利用荧光恒温扩增检测，对小火蚁及其他几种蚁科昆虫DNA进行荧光PCR检测筛选引物及验证体系的特异性和灵敏性。使用的ultraRADAR荧光恒温扩增检测空白试剂盒（RR032）及uReader 1600掌上荧光检测仪均购自苏州晶睿生物科技有限公司。

表 3 EmDEA体系引物组

Table 3 EmDEA system primer set

引物组 Primer set	种类 Class	核苷酸序列 Nucleotide sequence
引物组 1 Primer set 1	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGATATCTAACAACTAGATTAGATTTGTAT
	下游引物 Downstream primers	TGTTGTTTCCGACTTGATGGCTTCATGA
	探针 Probe	GACUUCUCGUAUACGCAUCAUUCAUGUC
引物组 2 Primer set 2	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGTAACAACTAGATTAGATTTGTATTGACG
	下游引物 Downstream primers	CTCTATGTTGTTTCCGACTTGATGGCTT
	探针 Probe	GACCCGACUUCUCGUAUACGCAUCAUUC
引物组 3 Primer set 3	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGACTAGATTAGATTTGTATTGACGAAACC
	下游引物 Downstream primers	TACCACTCTATGTTGTTTCCGACTTGAT
	探针 Probe	CAUGCGACCCGACUUCUCGUAUACGCAU
引物组 4 Primer set 4	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGATTAGATTTGTATTGACGAAACCGTCGA
	下游引物 Downstream primers	TAAACTACCACTCTATGTTGTTTCCGAC
	探针 Probe	UUAUGCAUGCGACCCGACUUCUCGUAUA
引物组 5 Primer set 5	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGATTTGTATTGACGAAACCGTCGACTGGA
	下游引物 Downstream primers	GCAAGTAAACTACCACTCTATGTTGTTT
	探针 Probe	UGACUUUAUGCAUGCGACCCGACUUCUC
引物组 6 Primer set 6	上游引物 Upstream primers	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGTATTGACGAAACCGTCGACTGGATTACG
	下游引物 Downstream primers	TCGTTGCAAGTAAACTACCACTCTATGT
	探针 Probe	AAACUUGACUUUAUGCAUGCGACCCGAC

1.4.1 引物筛选

反应体系共20 μL，反应程序为：在冻干反应酶系混合物中加入3 μL引物混合液，溶解后加入7 μL的待测昆虫的DNA样本，室温静置2 min，最后加入10 μL探针切除试剂混匀离心，用uReader 1600掌上荧光检测仪检测，反应温度42℃，反应时长20 min。

使用ultraRADAR荧光恒温扩增检测空白试剂盒，以小火蚁DNA作为模板，对表3所示引物组分别进行恒温、快速荧光PCR检测实验，用试剂盒中的质粒及正对照引物探针作为阳性对照PC（Positive control），用ddH_2O及正对照引物探针作为阴性对照NC（Negative control）。能生成扩增曲线并产生TT值（Time threshold）的样品为阳性，筛选出能生成扩增曲线并产生TT值的引物组进行二次筛选。将初步筛选出来的引物组设立加入小火蚁DNA模板和只加入ddH_2O两种情况，进一步筛选引物及探针。

1.4.2 特异性检验

分别以小火蚁、红火蚁、后眼尼氏蚁*Nylanderia opisopthalmia*、红黑细长蚁*Tetraponera rufonigra*、细足捷蚁*Anoplolepis gracilipes*、黄猄蚁、印度大头蚁、布氏尼氏蚁、日本弓背蚁*Camponotus japonicus*、热带火蚁*Solenopsis geminata*作为DNA模板，利用筛选获得的引物组，用试剂盒中的质粒及正对照引物探针作为阳性对照PC，用ddH_2O及正对照引物探针作

为阴性对照NC，按照1.4.1的反应体系和条件进行特异性检验，每个处理设置3个重复。该方法仅需使用金属浴即可完成全部反应过程。

1.4.3　灵敏度检验

以小火蚁的DNA为模板，所使用的模板含量分别为：70、14、7、4、1、0.5 ng，利用筛选获得的引物组，用试剂盒中的质粒及正对照引物探针作为阳性对照PC，用ddH_2O及正对照引物探针作为阴性对照NC，按照1.4.1的反应体系和条件进行灵敏度检验，每个处理设置3个重复。

2　结果与分析

2.1　特异性片段及其生物信息学特异性

通过自研程序进行基因组比对，筛选出小火蚁的特异性片段为NW_012026827.1_1109：ATATCTAACAACTAGATTAGATTTGTATTGACGAAACCGTCGACTGGATTACGGACATGAATGATGCGTATACGAGAAGTCGGGTCGCATGCATAAAGTCAAGTTTTCATGAAGCCATCAAGTCGGAAACAACATAGAGTGGTAGTTTACTTGCAACGAGTCTGAATATAGGATTATAAAAAGAATTGCGGTTAATGACTGGGCGAGTCTCTATGAAGGGACGGGATTCGGGCTCAGAAAGTTTGTTATATGGCTTTTAATGTGTATGCTTCCATGCCCGGTGCTTGGTACGACTGCGGGGCGAGCCGCATGCGCGATATATGCGGGCGGTGAATTTAAAGCCGGACTTGCATGTGACTAGTCATAGACAGTTTATAAAGGACACCCGGAGTTGTACAGTATTTCTAATTCTATTGATATGAAATATAATACTGATATAAAATATAATATAAGATTTGTTTGCGTTCTAATTGCGTTCTAGTTTTGCGTTGTGTAGCGTT

通过BLAST中的blastn比对分析（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）小火蚁特异性片段与其余昆虫基因序列。使用blastn用筛选出的小火蚁特异序列与18种不同蚁科昆虫的基因组数据比对，18种不同蚁科昆虫如下：

红火蚁、埃及扁胸切叶蚁、细伪切叶蚁、毕氏卵角蚁、小黄家蚁、阿根廷蚁、佛罗里达弓背蚁、西班牙箭蚁、*Formica gracilis*、毛眼林蚁、印度大头蚁、楔结长齿蚁、稍美刺结蚁、布氏尼氏蚁、黄猄蚁、亮尼氏蚁、长角立毛蚁、火神心结蚁。

将所筛选的序列使用NCBI Nucleotide BLAST中的blastn功能与其他物种进行比对，比对时选择RefSeq Representative genomes（refseq_representative_genomes）数据库中的上述物种基因组数据（taxid见1.2）进行blast，结果显示所筛选片段无法比对到上述近似物种序列。说明所筛选的小火蚁特异性片段具有明显的特异性。

2.2　片段特异性的验证

PCR产物采用1%琼脂糖凝胶电泳（140 V，20 min），用凝胶成像系统观察分析。得到的结果如图1所示，只有使用小火蚁DNA模板的PCR产物扩增出了条带，说明该引物对于小火蚁具有特异性，同时也说明了上述筛选出的小火蚁序列具有特异性。

图 1　小火蚁特异性引物扩增不同物种电泳结果

Fig. 1　Electrophoresis results of different species amplified by specific primers of *Wasmannia auropunctata*

注：Marker，GoldBand DL2000 DNA Marker；1，小火蚁*Wasmannia auropunctata*；2，红火蚁*Solenopsis invicta*；3，后眼尼氏蚁*Nylanderia opisopthalmia*；4，红黑细长蚁*Tetraponera rufonigra*；5，细足捷蚁*Anoplolepis gracilipes*；6，黄琼蚁*Anoplolepis gracilipes*；7，布氏尼氏蚁*Nylanderia bourbonica*；8，日本弓背蚁*Camponotus japonicus*；9，热带火蚁*Solenopsis geminata*。

2.3　酶介导双重指数扩增（EmDEA）体系

2.3.1　引物筛选

初步筛选发现引物组2、3、4及阳性对照生成扩增曲线（图2）并产生TT值（表4），TT值分别为：11.6、8.8、12.7、4.0。对引物组2、3、4进行二次筛选，除去阳性对照和阴性对照设置了6组处理，处理1：使用引物组2及小火蚁DNA模板；处理2：使用引物组2但不加小火蚁DNA模板；处理3：使用引物组3及小火蚁DNA模板；处理4：使用引物组3但不加小火蚁DNA模板；处理5：使用引物组4及小火蚁DNA模板；处理6：使用引物组4但不加小火蚁DNA模板，只有处理5及阳性对照生成扩增曲线（图3）并产生TT值（表5），TT值分别为13和4.8，因此只有引物组4能对小火蚁DNA进行稳定扩增，可用于后续试验。

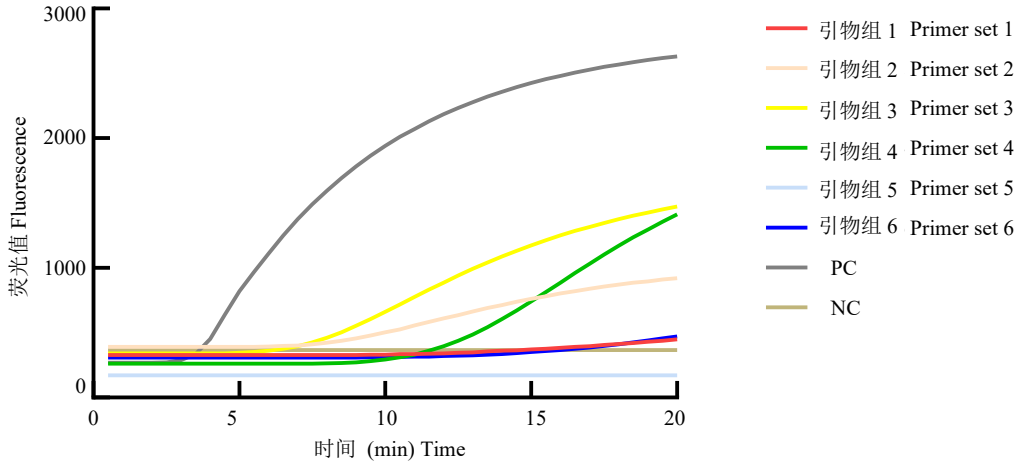

图 2 EmDEA体系引物探针初步筛选荧光曲线

Fig. 2 Fluorescence curves for preliminary screening of primer probes in the EmDEA system

注：PC，阳性对照；NC，阴性对照。Note：PC，Positive control；NC，Negative control.

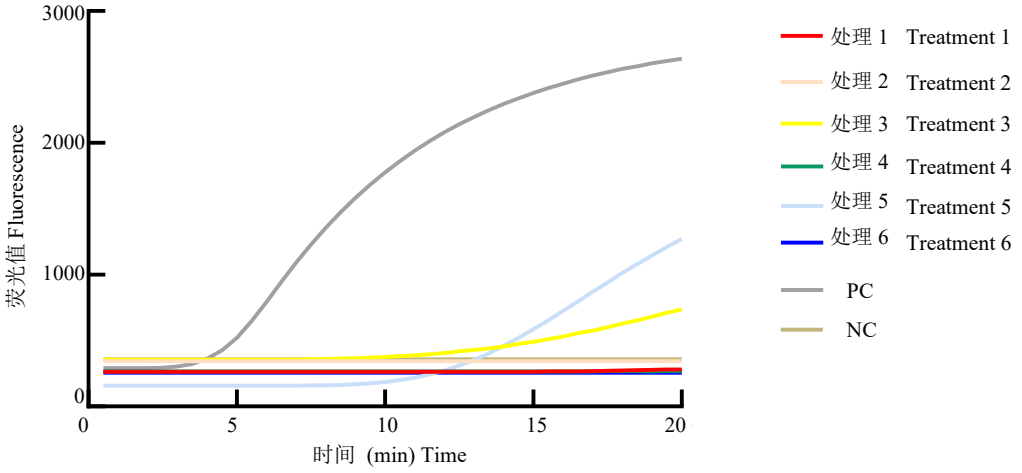

图3 EmDEA体系引物探针二次筛选荧光曲线

Fig. 3 Fluorescence curves for secondary screening of primer probes in the EmDEA system

注：PC，阳性对照；NC，阴性对照。Note：PC，Positive control；NC，Negative control.

表 4 EmDEA体系引物探针初步筛选TT值

Table 4 Preliminary screening of primer probes for EmDEA system TT value

引物组 Primer set	TT值 TT value
引物组 1 Primer set 1	N/C
引物组 2 Primer set 2	11.6
引物组 3 Primer set 3	8.8
引物组 4 Primer set 4	12.7
引物组 5 Primer set 5	N/C
引物组 6 Primer set 6	N/C
阳性对照 Positive control	4.0
阴性对照 Negative control	N/C

注：N/C，未产生TT值。Note：N/C，No TT value was generated.

表 5 EmDEA体系引物探针二次筛选TT值

Table 5 Secondary screening of primer probes for EmDEA system TT value

处理 Treatment	TT值 TT value
处理 1 Treatment 1	N/C
处理 2 Treatment 2	N/C
处理 3 Treatment 3	N/C
处理 4 Treatment 4	N/C
处理 5 Treatment 5	13
处理 6 Treatment 6	N/C
阳性对照 Positive control	4.8
阴性对照 Negative control	N/C

注：N/C，未产生TT值。Note：N/C，No TT value was generated.

2.3.2　特异性检验

选取小火蚁及其8种近似种昆虫DNA进行特异性实验。结果表明只有阳性质粒和小火蚁样品生成扩增曲线（图4）并产生TT值（表6），其中小火蚁DNA样品TT值为13.8，阳性质粒TT值为5.6，其余样品及阴性对照均未生成扩增曲线及TT值，说明其余样品均为阴性。以上结果表明该引物探针组合对小火蚁具有较高的特异性。

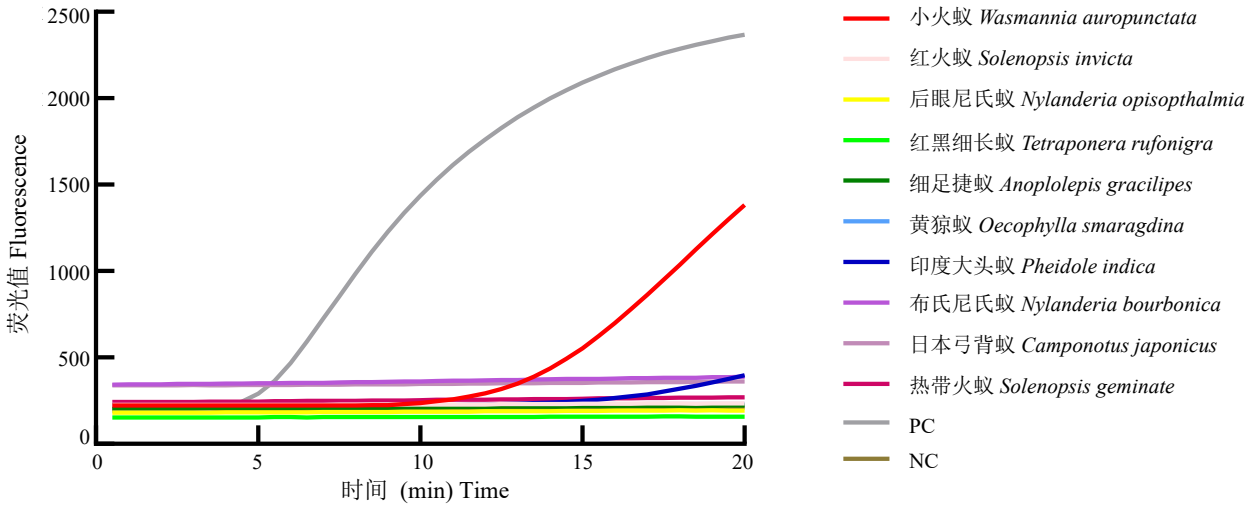

图 4　EmDEA体系引物探针特异性检测荧光曲线

Fig. 4　Fluorescence curves for primer probe specific detection in the EmDEA system

注：PC，阳性对照；NC，阴性对照。Note：PC，Positive control；NC，Negative control.

表 6　EmDEA体系引物探针特异性检测TT值

Table 6　TT value for primer probe specific detection in the EmDEA system

物种 Species	TT值 TT value
小火蚁 *Wasmannia auropunctata*	13.8
红火蚁 *Solenopsis invicta*	N/C
后眼尼氏蚁 *Nylanderia opisopthalmia*	N/C
红黑细长蚁 *Tetraponera rufonigra*	N/C
细足捷蚁 *Oecophylla smaragdina*	N/C
黄琼蚁 *Pheidole indica*	N/C
布氏尼氏蚁 *Nylanderia bourbonica*	N/C
日本弓背蚁 *Camponotus japonicus*	N/C
热带火蚁 *Solenopsis geminata*	N/C
阳性对照 Positive control	5.6
阴性对照 Negative control	N/C

注：N/C，未产生TT值。Note：N/C，No TT value was generated.

2.3.3　灵敏度检验

DNA模板含量在4 ng及以上时均会生成扩增曲线（图5）并产生TT值（表7），说明该体系最低可以检测到DNA模板含量为4 ng左右，灵敏度高。

表 7　EmDEA体系引物探针灵敏度检测TT值

Table 7　TT value for primer probe sensitivity detection in the EmDEA system

模板含量（ng）Template content	TT值 TT value
70	14.6
14	16.4
7	16.9
4	17.1
1	N/C
0.5	N/C
阳性对照 Positive control	5.6
阴性对照 Negative control	N/C

注：N/C，未产生TT值。Note：N/C，No TT value was generated.

3　结论与讨论

入侵物种是全球生物多样性面临的最大威胁之一（Vonshak *et al.*，2010），而入侵蚂蚁是最具破坏性和分布最广泛的入侵物种之一（Holway *et al.*，2002）。小火蚁作为5种危害最严重的蚂蚁之一，在1930年至2021年期间，27个国家为治理小火蚁共计

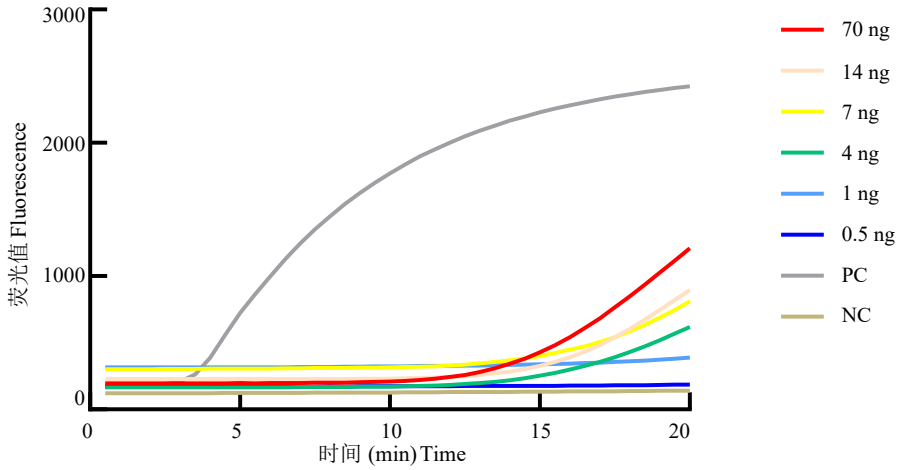

图 5 EmDEA体系引物探针灵敏度检测荧光曲线

Fig. 5 Fluorescence curves for primer probe sensitivity detection in the EmDEA system

注：PC，阳性对照；NC，阴性对照。Note：PC，Positive control；NC，Negative control.

花费了199.1亿美元（Angulo *et al.*，2022）。2018年中国江苏省连云港海关在从泰国进口的水果中截获了一批小火蚁（Zhao *et al.*，2018），2021年，小火蚁首次出现在中国台湾省（Lee *et al.*，2021），次年，中国广东省首次报道出现小火蚁（Chen *et al.*，2022）。小火蚁具有很强的适应性，可以在全球大部分地区生存（Coulin *et al.*，2019），应加强对小火蚁的监测、危害调查、损害评估和风险分析，研究小火蚁的快速鉴定技术对有效防范小火蚁的潜入和大面积扩散意义重大。

目前对小火蚁的检测主要是通过其DNA（线粒体COI基因）进行精准鉴定（江幸福等，2022），但该方法扩增出的片段容易出现无法与全长序列相配的情况，且该方法耗时较长，不适合现场检测。曾韵颖等（2023）通过分析DNA条形码在海马鉴定中的效果，发现COI基因条形码难以鉴定出准确结果。工月月（2017）利用COI基因对鱼类物种分类，结果表明COI基因在高阶元的进化分析中可靠性降低。任秋萍（2013）基于核基因组和线粒体基因探讨中国南方地区双纹小蠊*Blattella bisignata*的种群结构中发现通过核基因组进行分析的结果准确性高于线粒体基因，另外核基因组序列中还存在高度保守的区段，用此序列来设计引物分辨率更高，特异性更强。本研究也运用此方法基于基因组数据，突破传统线粒体基因限制，利用基因组数据库通过自研程序将小火蚁与其他18种蚁科昆虫基因组数据进行比对，筛选了小火蚁的特异性片段，此片段为小火蚁高保守区段的特异性序列，具有强特异性的潜力。

传统的分子检测方法对实验条件要求较高，检测步骤复杂，需要配备PCR及测序仪器等大型仪器才能完成检测，当前的鉴定技术手段和仪器设备并不能满足对小火蚁等外来物种进行快速精准鉴定（庞洁等，2024）。酶介导双重指数扩增技术（EmDEA）是一种双重信号放大核酸检测方法，适合各种样品的快速检测（胡振新等，2023）。目前，俞紫琳等（2024）已通过该方法建立了在可可花瘿病致病菌白壳的快速检测体系。通过EmDEA法进行的的检测实验条件简单，整个检测系统总重量小于3 kg，仅需1 m^2即可开展监测，可全部放入一个背包中，方便携带，无需使用大型仪器进行检测，设备高度集成。该检测方法灵敏度高，20 μL反应体系中DNA含量最低检测限为4 ng，42℃条件下20 min内即可完成全部检测，无需高温变性、退火等步骤，所需设备简单便携，非常适用于现场实时检测。该技术所需试剂盒已对所需实际组分进行预分装，全部反应过程仅需一步移液过程，解决了qPCR技术操作复杂、易污染等技术问题。相较于LAMP、RPA等检测技术，该检测方法所需全部组分只需冷藏保存，可常温运输，便携且不易污染，对仪器的需求更低。另外，检测完成后反应体系中的程序性启动核酸降解酶开始对核酸扩增产物进行降解，杜绝污染，有效解决了现有昆虫检测方法设备依赖、操作繁琐、时间长、限制性条件多等问题，具有较好的应用前景。除了小火蚁昆虫样本外，后续仍需对小火蚁的分泌物、取食的植物样本等的检测做进一步研究，以期评估该方法在小火蚁检测中的应用价值。

参考文献（References）

Angulo E, Hoffmann BD, Ballesteros-Mejia L, *et al*. Economic costs of invasive alien ants worldwide [J]. *Biological Invasions*, 2022, 24 (7): 2041-2060.

Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al*. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3): 314-31.

Chan KO, Hertwig ST, Neokleous DN, *et al*. Widely used, short 16S rRNA mitochondrial gene fragments yield poor and erratic results in phylogenetic estimation and species delimitation of amphibians [J]. *BMC Ecology and Evolution*, 2022, 22 (1): 37

Chen SQ, Zhao Y, Lu YY, *et al*. First record of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae), in Chinese mainland [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21 (6):1825-1829.

Coulin C, de la Vega GJ, Chifflet L, *et al*. Linking thermo-tolerances of the highly invasive ant, *Wasmannia auropunctata*, to its current and potential distribution [J]. *Biological Invasions*, 2019, 21 (12): 3491-3504.

de Souza ALB, Delabie JHC, Fowler HG. *Wasmannia* spp. (Hym., Formicidae) and insect damages to cocoa in Brazilian farms [J]. *Journal of Applied Entomology*, 1988, 122 (6): 339-341.

Gong YY. Application of COI Gene in Fish Species Identification and Classification [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University Master Thesis, 2017. [工月月. COI基因在鱼类物种鉴定与分类中的应用 [D]. 舟山: 浙江海洋大学硕士论文, 2017]

Holway DA, Lach L, Suarez AV, *et al*. The causes and consequences of ant invasions [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2002, 33: 181-233.

Hu ZX, Qin HN, Wu Y, *et al*. Development and application evaluation of a rapid on-site nucleic acid detection method for African swine fever virus based on enzymes mediated duplex exponential amplification [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 1-15. [胡振新, 覃鸿妮, 吴尧, 等. 基于双重信号放大技术的非洲猪瘟病毒快速现场核酸检测方法的开发与应用 [J].中国兽医科学, 2024, 1-15]

Jiang XF, Ren QL, Ge Y, *et al*. Research progress of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata* abroad and its suggested countermeasures [J]. *Plant Protection*, 2022, 48 (4): 73-78, 99. [江幸福, 任麒麟, 戈悦, 等. 外来入侵生物小火蚁国外研究进展及我国应对策略建议 [J]. 植物保护, 2022, 48 (4): 73-78, 99]

Lee CC, Hsu PW, Hsu FC, *et al*. First record of the invasive little fire ant (*Wasmannia auropunctata*) (Hymenoptera: Formicidae) in Taiwan: Invasion status, colony structure, and potential threats [J]. *Formosan Entomologist*, 2021, 41 (3): 172-181.

Ma J, Hu XN, Li GW, *et al*. Be wary of the invasion of *Wasmannia auropunctata* [J]. *Plant Quarantine*, 2007, 1: 23-24. [马骏, 胡学难, 李桂文, 等. 警惕小火蚁的入侵 [J]. 植物检疫, 2007, 1: 23-24]

Pang J, Liu Y, Chen J. Sitution and prevention and control system construction of invasive alien species-global perspective and China example [J]. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 2024, 1-14. [庞洁, 刘洋, 陈洁. 外来入侵物种现状与防控体制建设——全球视野和中国例证[J]. 中国农业资源与区划, 2024, 1-14]

Ren QP. Based on Anonymous Nuclear Genes and Mitochondrial Genes, the Population Structure of *Blattella bisignata* in Southern China was Preliminarily Studied [D]. Nanjing: Nanjing Normal University Master Thesis, 2013. [任秋平. 基于匿名核基因和线粒体基因初步探讨中国南方地区双纹小蠊的种群结构 [D]. 南京: 南京师范大学硕士论文, 2013]

Rosselli D, Wetterer JK. Stings of the ant *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) as cause of punctate corneal lesions in humans and other animals [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2017, 54 (6): 1783-1785.

Vonshak M, Dayan T, Ionescu-Hirsh A, *et al*. The little fire ant *Wasmannia auropunctata*: A new invasive species in the Middle East and its impact on the local arthropod fauna [J]. *Biological Invasions*, 2010, 12 (6): 1825-1837.

Vossbrinck CR, Friedman S. A 28s ribosomal RNA phylogeny of certain cyclorrhaphous Diptera based on a hypervariable region [J]. *Systematic Entomology*, 1989, 14 (4): 417-431.

Wang HR, Sui X, Wang XY, *et al*. Invasion alert for *Wasmannia auropunctata*: A potential distribution in southern China and associated invasion risk to urban, rural, agricultural, and forest lands [J]. *Journal of Pest Science*, 2023, 97 (2): 597-612.

Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213-7218.

Wetterer JK, Porter SD. The little fire ant, *Wasmannia auropunctata*: Distribution, impact, and control [J]. *Sociobiology*, 2003, 42 (1): 1-41.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531-6535.

Xu Q, Gu YJ, Li PP, *et al.* Potential geographical distribution of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) in China based on MaxEnt model [J]. *Plant Protection*, 2023, 49 (4): 101-107. [徐强, 顾渝娟, 李盼畔, 等. 基于最大熵模型预测小火蚁在我国的适生区 [J]. 植物保护, 2023, 49 (4): 101-107]

Yang H, Jiang XL, Guo X. Invasive alien species of small fire ants [J]. *China Customs*, 2002, 9: 55. [杨欢, 蒋晓玲, 郭玺. 外来入侵物种之小火蚁 [J]. 中国海关, 2002, 9: 55]

Yu ZL, Zhang HL, Gu JF, *et al*. Detection of *Albonectria rigidiuscula* based on enzyme mediated duplex exponential amplification [J]. *Mycosystema*, 2024, 11. [俞紫琳, 张慧丽, 顾建锋, 等. 基于酶介导双重指数扩增检测技术的白壳快速检测方法 [J]. 菌物学报, 2024, 11]

Zeng YY, Chen XZ, Zhu HX, *et al*. Application analysis of identification of seahorse species based on DNA barcoding technology [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2023, 16: 176-180, 184. [曾韵颖, 陈信忠, 朱黄鑫, 等. DNA条形码技术在海马物种鉴定中的应用分析 [J]. 现代农业科技, 2023, 16: 176-180, 184]

Zhao GM, Jiang YY, Sui SJ, *et al*. Pests intercepted at several ports across the country [EB/OL]. (2018-05-14). http://www.customs.gov.cn/customs/xwfb34/302425/1840619/index.html. [海关总署. 全国多个口岸截获有害生物（图） [EB/OL]. (2018-05-14) http://www.customs.gov.cn/customs/xwfb34/302425/1840619/index.html]

Zhao Y, Ran H, Lu YY, *et al*. Morphological characters, distribution, monitoring and control of *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formiddae) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (6): 1365-1372. [赵翊, 冉浩, 陆永跃, 等. 小火蚁的形态特征、分布危害及监测与防控 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (6): 1365-1372]