ICS 65.020
CCS B16

DB

海 南 省 地 方 标 准

DB 46/T XXXX—XXXX

咖啡果小蠹分子鉴定技术规程

Technical regulation for molecular identification of Coffee berry borer

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022 年 8 月）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　缩略语 1
4　咖啡果小蠹基本信息 1
5　原理 1
6　仪器和试剂 1
6.1　仪器设备 1
6.2　试剂 1
7　分子鉴定操作步骤 1
7.1　样品的采集与处理 2
7.2　DNA 提取 2
7.3　DNA 纯度和浓度测定 2
7.4　特异性引物使用 2
7.5　PCR 扩增反应 2
8　结果判定 2
9　样品保存、复核与记录 2
9.1　样品保存 2
9.2　复核 2
9.3　记录 2
附录 A（资料性）　咖啡果小蠹其他基本信息 3
A.1　生物学特性 3
A.2　地理分布 3
A.3　寄主 4
A.4　为害情况 4
附录 B（资料性）　DNA 提取方法及 PCR 检测方法 5
B.1　基因组 DNA 提取方法 5
B.2　引物序列 5
B.3　扩增体系 5
B.4　扩增反应条件 5
B.5　PCR 扩增片段电泳结果 6
B.6　PCR 扩增片段测序结果 6

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由海南省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院香料饮料研究所。

本文件主要起草人：孟倩倩，王政，孙世伟，高圣风，苟亚峰，刘世超，薛超，田甜。

咖啡果小蠹分子鉴定技术规程

1 范围

本文件描述了咖啡果小蠹的基本信息、分子鉴定技术原理、所用仪器和试剂、操作步骤、结果判定、样品保存、复核与记录。

本文件适用于植物及其产品中携带咖啡果小蠹的检疫和鉴定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

mtDNA COI：线粒体DNA细胞色素C氧化酶亚基I

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonuleic acid）

4 咖啡果小蠹基本信息

咖啡果小蠹基本信息参见附录A。

5 原理

不同物种间mtDNA COI序列存在片段差异，可根据种间序列的差异性设计特异性引物，通过PCR扩增，获得对应特异性片段，用于区分不同物种。根据咖啡果小蠹mtDNA COI特征，采用所设计特异性引物对疑似样品进行PCR扩增，利用分子手段对咖啡果小蠹快速鉴定。

6 仪器和试剂

6.1 仪器设备

研钵、水浴锅、纯水仪、漩涡振荡器、台式离心机、多功能酶标仪、冰箱、PCR仪、微量移液器（0.1μL～2.5μL，1μL～10μL，20μL～200μL，100μL～1000μL，）、电动碾磨器、无菌滤纸、无菌枪头。

6.2 试剂

动物基因组DNA提取试剂盒、无水乙醇、无菌水、蛋白酶K: Proteinnase K，PCR反应预混液：2×Taq PCR MasterMix II、琼脂糖、TAE缓冲液。

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

7 分子鉴定操作步骤

7.1 样品的采集与处理

挑取疑似咖啡果小蠹虫体或部分残体组织放置在2mL离心管内，加入1.5mL无水乙醇浸泡。

7.2 DNA 提取

DNA提取方法按照附录B中B.1的要求执行。

7.3 DNA 纯度和浓度测定

用多功能酶标仪测定DNA的纯度与浓度，分别读取260nm和280nm处的吸收值（记为OD260和OD280）。DNA的纯度计算方法为OD260/OD280，范围应在1.7～1.9，DNA的浓度为50倍的OD260（ug/mL）。DNA的浓度与纯度应符合PCR反应的要求。

7.4 特异性引物使用

特异性引物序列参照附录B.2。

7.5 PCR 扩增反应

PCR反应按照附录B中的B.3～B.4的方法执行。

8 结果判定

以疑似样品的PCR扩增片段结果作为鉴定依据。结果按照附录B中的B.5～B.6方法进行判定。

9 样品保存、复核与记录

9.1 样品保存

虫体或组织样品保存，应用无水乙醇将虫体或组织浸泡后置于4℃冰箱妥善保存，对送样的样品应至少保存6个月，以备复检、谈判和仲裁。

9.2 复核

由制定的单位或人员负责，主要考察实验原始数据记录及PCR检测结果等资料的完整性和真实性，必要时进行复核实验。

9.3 记录

记录样品的来源、种类、采样时间、检测时间、地点、方法、结果等，并有实验人员的签字。保存PCR检测阳性结果照片。

附　录　A
（资料性）
咖啡果小蠹其他基本信息

A.1　生物学特性

咖啡果小蠹*Hypothenemus hampei*（Ferrari），英文名coffee berry borer，属鞘翅目Coleoptera，象甲科Curculionidae，小蠹亚科Scolytinae，咪小蠹属*Hypothenemus* Westwood。其生命周期需经历卵、幼虫（1龄和2龄）、预蛹、蛹和成虫5个阶段（见图A.1）。整个发育历期为25d～60d。雌成虫在果实端部开始钻蛀，向内啃食形成不规则的坑道到达胚乳并产卵，整个历期不再飞出果实，终生与后代相伴。幼虫孵出后取食果肉和种子胚乳，待其羽化为成虫后可以同胞之间近亲交配生殖，随后雌成虫飞出坑道寻找新的果实钻蛀产卵。雌成虫一天可产1粒～3粒卵，连续产20天以上，单雌产卵量超过120粒，雌雄性比为10:1。雌成虫发育历期为81d～282d，平均131d，雄虫历期短于雌虫，为40d～52d。

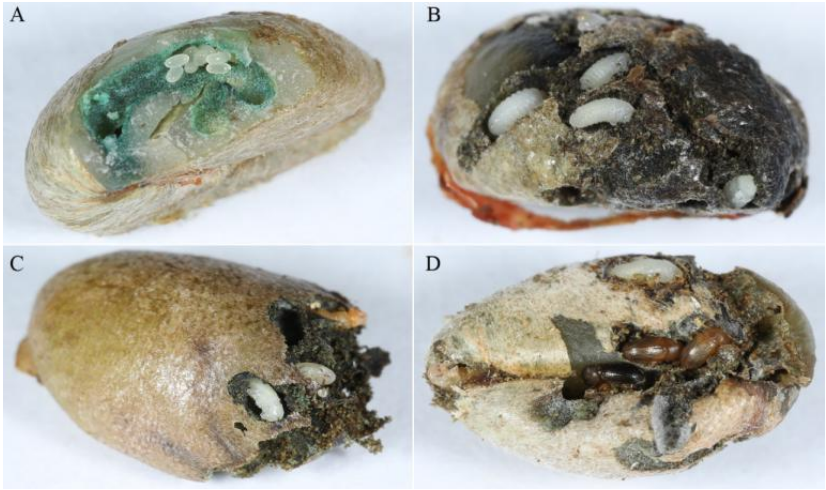

图 A.1 咖啡果小蠹各虫态图

A：卵；B：幼虫；C：蛹；D：成虫

A.2　传播途径

随咖啡果、豆、种子及其包装物进行远距离传播，近距离传播主要依靠雌成虫在寻找产卵场所过程中借助气流飞翔传播，雌成虫可连续飞行22 min～100 min，飞行距离200 m～500 m。

A.3　地理分布

咖啡果小蠹世界范围内分布见表A.1。

表 A.1 咖啡果小蠹在世界范围上的分布

所属地域	国别
亚洲	中华人民共和国、印度尼西亚、泰国、印度、越南、老挝、柬埔寨、马来西亚、缅甸、菲律宾、也门、东帝汶、斯里兰卡、沙特阿拉伯、马里亚纳群岛、
非洲	埃塞俄比亚、刚果民主共和国、刚果、安哥拉、津巴布韦、马达加斯加、哥斯达黎加、科特迪瓦、布隆迪、加蓬、加纳、赤道几内亚、尼日利亚、卢旺达、马拉维、赞比亚、喀麦隆、

所属地域	国别
	中非共和国、贝宁、几内亚、肯尼亚、苏丹、乌干达、乍得、坦桑尼亚、利比里亚、塞拉利昂、多哥、塞内加尔、埃塞俄比亚、扎伊尔、加纳利群岛、圣多美、普林西比、莫桑比克、费尔南多波动群岛、
大洋洲	瓦努阿图、巴布新几内亚、密克罗尼西亚、斐济、新喀利多尼亚、加罗林群岛、社会群岛、塔希提岛、伊里安岛
美洲	美国、巴西、玻利维亚、巴拉圭、秘鲁、墨西哥、多米尼亚共和国、巴拿马、圭亚那、古巴、厄瓜多尔、海地、哥伦比亚、萨尔瓦多、危地马拉、洪都拉斯共和国、牙买加、尼加拉瓜、特立尼达拉岛、多巴哥岛、委内瑞拉、多米尼加、波多黎各、苏里南、

A.4 寄主

咖啡果小蠹主要寄主为茜草科（Rubiaceae）、豆科（Fabaceae）、禾本科（Poaceae）和薯蓣科（Dioscoreaceae）等4科10种植物。其他寄主为大戟科（Euphorbiaceae）、西番莲科（Passifloraceae）和棕榈科（Arecaceae）的部分植物，但仅作为食料，不能完成整个生命周期。

A.5 为害情况

海南地区作为罗布斯塔咖啡主要产区，目前在海南万宁、琼中、琼海等地均发现咖啡果小蠹为害，为害率为40%以上。国外，马来西亚咖啡被害果率曾达90%，成熟果被害率达50%，造成田间减产26%；乌干达咖啡被害果率曾达80%；巴布新几内亚咖啡曾减产约50%；巴西咖啡曾减产60%～80%。咖啡果小蠹造成的取食痕可使青果停止发育和提前脱落，被钻蛀的果实易受其它病虫害二次伤害。

附　录　B
（资料性）
DNA 提取方法及 PCR 检测方法

B.1　基因组 DNA 提取方法

基因组提取方法参照相关试剂盒，具体步骤如下

1、将疑似样品用无水乙醇清洗5 s后，用无菌水清洗5次，置于灭菌滤纸上晾干，放入1.5 mL的离心管中。

2、加入180 μL Buffer ACL，充分研磨后加入20 μL Proteinnase K溶液，震荡混匀，56℃水浴1 h至细胞完全裂解。

3、加入200 μL Buffer CL、200 μL无水乙醇，充分颠倒混匀。

4、将吸附柱放入收集管中，将上述3中的悬浮物转入入吸附柱中，静置2 min，10,000 rpm离心1 min。

5、倒掉收集管中废液，将吸附柱放回收集管中，加入500 μL CW1 Solution，10,000 rpm离心30 s。

6、倒掉收集管中废液；将吸附柱放回收集管中，向吸附柱中加入500 μL CW2 Solution，10,000 rpm离心30 s。

7、倒掉收集管废液后，将吸附柱重新放回收集管中，12,000 rpm离心2 min。

8、将吸附柱盖子打开，室温放置数分钟，彻底晾干。

9、取出吸附柱，放入一个新的1.5 mL离心管中，加入50 μL CE Buffer静置3 min，12,000 rpm离心2 min，收集DNA溶液，-20℃保存。

B.2　引物序列

正向引物F：5’-AAGGTGTTGATATAGGATTGGGTCC-3’

反向引物R：5’-CCACTAATACTAGGCGCACCTG-3’

B.3　扩增体系

PCR扩增总反应体系见表B.1。阳性对照模板含基因组DNA，阴性对照模板不含基因组DNA，空白对照模板为无菌蒸馏水。

表 B.1 PCR 扩增反应体系

组成成分	使用量
疑似样品基因组DNA模板	1 μL
正向引物COI-F	0.5 μL
反向引物COI-R	0.5 μL
2×Taq PCR MasterMix II	12.5 μL
纯水	补足至 25μL

B.4　扩增反应条件

94℃预变性4 min；然后94℃变性30 s，57℃退火50 s，72℃延伸1 min，共40个循环；最后72℃延伸10 min。

B.5　PCR 扩增片段电泳结果

取5μL PCR产物，在含有Gel stain染色剂的1.2%琼脂糖凝胶上电泳分离20 min（140 V），利用凝胶成像系统检测结果，目的片段长度应为453 bp，见并拍照。

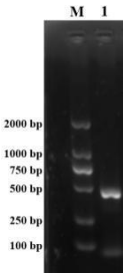

图 B.2 咖啡果小蠹 PCR 扩增片段电泳结果

B.6　PCR 扩增片段测序结果

咖啡果小蠹基因扩增靶标参考序列信息如下所示。将含目的片段的PCR扩增产物进行测序，与咖啡果小蠹基因扩增靶标参考序列进行比对。

AAGGTGTTGATATAGGATTGGGTCCCCCCCTCCGGCAGGGTCAAAAAATGATGAATTTATGTTACGATCTGTAAGTAGTATGGTGATAGCACCAGCTAGAACTGGTAATGATAGTAATAATAAGATTGCTGTAATTTTTACTGATCATGCAAATAGGGGTAATTGTTCTGGCTGTATTCCAGGAGGGTGTATATTGATAATTGTTGAAATGAAATTAATTGCTCCTAGAATAGATGATACTCCTGCTATATGAAGACTGAAGATGGCAAGATCTACGGAAGATCCTTCGTGAGCAATATTTCTTGCGAGGGGTGGATACACAGTTCACCCTGTTCCTGCTCCTTTGTCAATTACTCTTCTTATAATAAGAAATATTAGTGATGGGGGTAGAAGTCAGAATCTTATATTATTTATTCGGGGGAATGCTATATCAGGTGCGCCTAGTATTAGTGG