

# 团 体 标 准

T/LTIA 19—2022

## 莴苣种质资源数字化技术规范

Technical specification for digitization of lettuce germplasm

2022 - 10 - 21 发布

2022 - 10 - 31 实施



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	1
5 莴苣植株的栽培 .....	2
6 莴苣样本的采集和处理 .....	2
7 莴苣核酸样本的制备与质量控制 .....	3
8 莴苣基因组信息的采集 .....	3
9 莴苣基因组数据库的构建 .....	3
附录 A (资料性) 莴苣总 RNA 提取方法 .....	5
参考文献 .....	7

## 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。

本文件由深圳市生命科技产学研资联盟提出并归口。

本文件起草单位：深圳华大生命科学研究院、上海市农业生物基因中心、北京市农业技术推广站、深圳市生命科技产学研资联盟、武汉庆发禾盛农业发展有限公司。

本文件主要起草人：刘亚琼、魏桐、魏仕则、曹彩虹、刘欢、王鹏、杨晓萍、李陶莎、查思思、杨婷、武庆超、周旭升、陈宏运、彭颖冰、危金普、李启沅、顾颖、王博、陈力群、火国涛、曹玲玲、葛国军、田雅楠、陈耀东。

# 莴苣种质资源数字化技术规范

## 1 范围

本文件规定了莴苣植株的栽培、莴苣样本的采集和处理、莴苣核酸样本的制备、莴苣基因组信息的采集以及莴苣基因组数据库的构建和管理要求。

本文件适用于莴苣种质资源数字化。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 3543.3 农作物种子检验规程 净度分析
- GB/T 3543.4 农作物种子检验规程 发芽试验
- GB/T 3543.6 农作物种子检验规程 水分测定
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 22080 信息技术 安全技术 信息安全管理系统 要求
- GB/T 22239 信息安全技术 网络安全等级保护基本要求
- GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
- GB/T 35890 高通量测序数据序列格式规范
- GB/T 40664 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求
- DB4403/T 124 植物种子资源管理规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 莴苣 lettuce

植物学分类上属菊科（Compositae），莴苣属（*Lactuca* L.）中的一个种（*Lactuca sativa* L.），是能形成叶球或嫩茎的一年生或二年生草本植物。

注：莴苣根据产品器官分为叶用莴苣和茎用莴苣两类，其中叶用莴苣别名生菜，茎用莴苣别名莴笋。

### 3.2

#### 种质 germplasm

决定生物性状遗传，并将其遗传信息从亲代传递给后代的遗传物质。

### 3.3

#### 种质资源 germplasm resource

具有种质并能繁殖的生物体的统称。

### 3.4

#### 数字化 digitization

获得种质信息的过程。

注：种质信息包括种质资源（实体）所涉及的所有信息，包括但不限于样品信息、试验记录、基因组数据、分子标记等，其中基因组数据包括如原始测序数据、基因组组装、碱基序列变异等。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

## 5 莴苣植株的栽培

### 5.1 莴苣种子的准备

根据研究目的, 提前收集好需要数字化的莴苣种子。

### 5.2 播种前处理

播种前应按照GB/T 3543.4对种子进行发芽率检测。发芽率 $\geq 85\%$ 的种子用清水浸泡48 h, 发芽率 $< 85\%$ 的种子用37.6 mg/L的赤霉素水溶液在低温(4℃)环境下浸泡48 h<sup>[5]</sup>。

### 5.3 播种

应提前做好基质、穴盘、标签。将浸泡好的种子播种在穴盘里, 轻轻覆一层薄土, 然后喷水至土壤湿透。将播完种的穴盘置于阴凉处, 注意保湿。并做好标识和记录。

### 5.4 幼苗移栽

5.4.1 待幼苗长至4~5片真叶时, 应将幼苗移栽至大田。

5.4.2 移栽前应准备好苗床, 土壤应经过深翻, 施底肥, 湿度适宜。

5.4.3 将幼苗移栽至大田, 株距40 cm, 行距40 cm, 浇透水, 适度遮阳。

5.4.4 做好标识和记录。

### 5.5 莴苣田间管理

5.5.1 生长期应做好浇水、施肥、除草、病虫害控制等管理工作, 保证植株正常生长。

5.5.2 对于需要繁种的较高的植株, 应绑扎支架, 避免倒伏。

## 6 莴苣样本的采集和处理

### 6.1 采集原则

应根据科研目的, 确定需要采集的样本类型。

### 6.2 莴苣叶片样本的采集和处理

6.2.1 幼苗移栽后, 约一个月内, 择期采集叶片组织样本。

6.2.2 莴苣采样前应准备好剪刀, 纸巾, 自封袋, 75%乙醇, 记号笔等。

6.2.3 采样应尽量在早晨进行。

6.2.4 采集部位: 从根部往上第3~4片完全伸展、无明显病害的叶子。

6.2.5 采集方法: 剪刀用酒精消毒后, 轻轻将目标叶片整片剪下, 用湿纸巾包好, 做好标识, 放进自封袋, 及时运送至实验室处理。

6.2.6 实验室处理: 选择适宜的方法将叶片样本研磨成细粉(如液氮研磨), 装入取样管中, 做好标识, 放入-80℃冰箱备用。

### 6.3 莴苣根系样本的采集和处理

6.3.1 采样前应准备好小铲子, 剪刀, 纸巾, 自封袋, 75%乙醇, 记号笔, 研钵, 研磨棒等。

6.3.2 采集方法: 用小铲子将整个植株挖出, 将根部在流水下冲洗干净, 剪刀用沾有酒精的纸巾消毒后, 剪下适量根系装入自封袋中, 及时运送至实验室处理。

6.3.3 实验室处理: 选择适宜的方法将根系样本研磨成细粉(如液氮研磨), 装入取样管中, 做好标识, 放入-80℃冰箱备用。

## 6.4 莴苣种子的采集和处理

6.4.1 在始花期，应对花序进行套袋处理。

6.4.2 在种子成熟后，移至温度 15℃~25℃，相对湿度 20%~40%的环境下进行自然干燥。采集和干燥过程应避免样本混杂。

6.4.3 应按照 DB4403/T 124 进行种子清理和保存。

6.4.4 种子质量检验应包括净度分析、发芽试验和水分测定，应分别按照 GB/T 3543.3、GB/T 3543.4、GB/T 3543.6 的规定进行检测。

## 7 莴苣核酸样本的制备与质量控制

### 7.1 莴苣基因组 DNA 样本的制备

7.1.1 从-80℃冰箱取出莴苣叶片或根系粉末样本，分装适量样本至提取管中。

7.1.2 可采用但不限于以下方法提取莴苣基因组 DNA：

——使用商业试剂盒，按照试剂盒说明书的方法；

——参考 GB/T 30988—2014<sup>[1]</sup>的方法。

7.1.3 基因组 DNA 样本做好标识和记录。

### 7.2 莴苣总 RNA 样本的制备

7.2.1 从-80℃冰箱取出莴苣叶片或根系粉末样本，分装适量样本至提取管中。

7.2.2 可采用但不限于以下方法提取莴苣总 RNA：

——使用商业试剂盒，按照试剂盒说明书的方法；

——参考附录 A 方法。

7.2.3 总 RNA 样本做好标识和记录。

### 7.3 莴苣核酸样本的质量控制

7.3.1 核酸样本的质量检测方法和质量控制要求应符合 GB/T 40664 的要求。

7.3.2 不合格的核酸样本应重新进行制备。

## 8 莴苣基因组信息的采集

### 8.1 莴苣基因组 DNA 样本测序

8.1.1 应按照 GB/T 30989 进行莴苣基因组 DNA 样本建库与测序。

8.1.2 每个样本测序深度宜 $\geq 20\times$ ，测序量宜 $\geq 50$  Gb。

### 8.2 莴苣总 RNA 样本测序

8.2.1 应按照 GB/T 30989 进行莴苣总 RNA 样本建库与测序。

8.2.2 每个样本测序量宜 $\geq 10$  Gb。

## 9 莴苣基因组数据库的构建

### 9.1 元数据信息

#### 9.1.1 样本信息

样本信息应包括但不限于莴苣品种名称、栽培类型、产地、种子搜集年份等。

#### 9.1.2 试验信息

试验信息应包括但不限于莴苣收种时间、样本采集时间等。

## 9.2 测序数据存储

应按照GB/T 35890规定的的数据序列格式存储测序数据。

## 9.3 数据质控、序列变异数据分析与存储

### 9.3.1 数据质控

应先对测序数据进行质控判断。数据分析人员应根据测序平台、后续分析目的等选择或制定合适的数据质控标准和质控流程。数据质控标准和质控流程应经过验证。

### 9.3.2 序列变异数据分析

质控合格的数据，可采用但不限于Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra (1st Edition)<sup>[6]</sup>的方法进行序列变异分析。

### 9.3.3 序列变异数据存储

序列变异数据宜以VCF文件格式存于数据库。VCF文件格式参见T/LTIA 14—2021<sup>[2]</sup>的附录A。

## 9.4 数据库的管理

9.4.1 应按照 GB/T 22239 网络安全等级保护三级的要求对数据库进行安全防护<sup>[3][4]</sup>。

9.4.2 数据库的数据资产管理、访问控制、运行管理、通讯安全、开发运维等应符合 GB/T 22080 的要求。

附 录 A  
(资料性)  
莴苣总 RNA 提取方法

## A.1 试剂与溶液

### A.1.1 水和试剂

配制试剂用水均为用DEPC（焦碳酸二乙酯）处理过并经高温高压灭菌的一级水，一级水符合GB/T 6682的要求。除非另有说明，仅使用分析纯试剂。

### A.1.2 裂解液

表A.1给出了裂解液的配方。

表 A.1 裂解液配方（100 mL，加水定容）

试剂组分	添加量	终浓度
CTAB	2 g	2% (W/V)
氯化钠	8.19 g	1.4 mmol/L
1 mol Tris-HCl (pH8.0)	10 mL	100 mmol/L
0.5 mol EDTA (pH8.0)	4 mL	20 mmol/L
PVP-30	2 g	2% (W/V)
$\beta$ -巯基乙醇(现配现用)	0.1 mL	0.1% (V/V)

### A.1.3 异丙醇

### A.1.4 抽提液I

三氯甲烷/异戊醇（V/V=24:1）；避光保存。

### A.1.5 抽提液II

水饱和酚/三氯甲烷/异戊醇（V/V=25:24:1）；避光保存。

### A.1.6 75% 乙醇溶液

### A.1.7 RNase-free water

## A.2 主要仪器与设备

### A.2.1 恒温水浴锅

工作范围包括65℃。

### A.2.2 离心机

可在4℃条件下离心，最大离心转速 $\geq 12000$  g。

### A.2.3 移液器

根据原始取样量选取合适规格的可调量程的移液器。

### A.2.4 天平

精度为0.1 mg。

### A.2.5 冰箱

4℃冰箱和-20℃冰箱。

## A.3 提取步骤

莴苣总RNA提取按照以下步骤进行:

- a) 裂解液放入恒温水浴锅预热至 65 °C, 异丙醇溶液放入冰箱预冷至 4 °C;
- b) 取适量预热的裂解液, 迅速加入到装有莴苣粉末样本的提取管中;
- c) 上下颠倒混匀样本, 放入恒温水浴锅中 65 °C 水浴 15 min, 期间每隔 3 min 混匀一次;
- d) 从水浴锅取出样本管, 自然冷却至室温;
- e) 4 °C 条件下, 12000 g 离心 5 min;
- f) 离心完成后, 吸取上清液至新的离心管中;
- g) 加入与上清液等体积的抽提液 I;
- h) 轻柔颠倒混合 3 min, 4 °C 条件下, 12000 g 离心 10 min;
- i) 离心完成后, 吸取上清液至新的离心管中;
- j) 加入与上清液等体积的抽提液 II;
- k) 重复步骤 h、i;
- l) 加入与上清液等体积的抽提液 I;
- m) 重复步骤 h、i;
- n) 加入与上清液等体积的预冷的异丙醇溶液;
- o) 轻柔颠倒混匀, 放入-20 °C 冰箱静置 3 h;
- p) 4 °C 条件下, 12000 g 离心 20 min;
- q) 离心完成后, 弃上清, 根据沉淀大小加入适量 75% 乙醇溶液, 盖紧盖子将沉淀弹起;
- r) 4 °C 条件下, 12000 g 离心 5min;
- s) 离心完成后, 弃上清, 打开离心管管盖, 室温晾干至乙醇完全挥发;
- t) 根据沉淀大小加适量的 RNase-free water 溶解 RNA。

### 参 考 文 献

- [1] GB/T 30988—2014 多酚类植物基因组DNA提取纯化及测试方法
- [2] T/LTIA 14—2021 低深度全基因组重测序的基因型推断和遗传变异解读的通用要求
- [3] 中华人民共和国计算机信息系统安全保护条例. [Z]1994年2月18日中华人民共和国国务院令 第147号发布 根据2011年1月8日《国务院关于废止和修改部分行政法规的决定》修订.
- [4] 国家保密局. 计算机信息系统保密管理暂行规定[Z]1998年02月26日.
- [5] 刘聪, 张瑞芳, 周大迈, 张爱军, 王红. 三种不同试剂对生菜种子萌发的影响[J]北方园艺. 2018, (02): 61-64.
- [6] Van der Auwera GA, O'Connor BD. Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra (1st Edition) [M]. O'Reilly Media, 2020.
-