

出國報告(出國類別:出席國際會議)

參加「第 30 屆國際種子檢查協會大會」報告

International Seed Testing Association

30<sup>th</sup> Congress 2013

服務機關：國立臺灣大學農藝學系

姓名職稱：胡凱康副教授

派赴國家：土耳其安塔利亞 (Turkey, Antalya)

出國時間：民國 102 年 6 月 10 日至 102 年 6 月 20 日

報告日期：民國 102 年 7 月 24 日



## 摘要

第 30 屆國際種子檢查協會 (International seed Testing Association; ISTA) 大會暨 2013 年年會於土耳其安塔利亞 (Antalya) 召開，議程分為種子研討會，技術委員會報告，討論論壇，與常會等四個部分。今年的大會來自 48 個國家 468 位會員參加，常會期間有 65 位代表可依據憲章規則行使表決權，實際出席投票代表有 41 位。社團代表如 OECD，EU，FAO，ISF 及 APSA 等團體皆有派代表參加。重大人事案包括選出 Craig McGill (紐西蘭籍) 為副主席，並聘請 Benjamin Kaufman 自 7 月 1 日起擔任秘書長一職。憲章修訂案包括「憲章修訂未改變現有條文，但所增修的條文會導致需要改變現有條文之增修案，需依重大議案標準，超過 2/3 以上的同意方得以通過」與「將會員除籍增列至需要 2/3 以上同意的重大議案類別」等議題均獲超過三分之二多數同意通過。本人並獲邀在第二場論壇中發表專題演講“Overview of DNA technologies – current uses and applications”。

## 目次

壹、目的 .....	1
貳、前言 .....	1
參、出國日期 .....	2
肆、出席會議人員 .....	2
伍、會議及活動行程 .....	2
陸、會議經過與紀要 .....	4
柒、心得與建議 .....	8
附錄一 .....	10
附錄二 .....	12
附錄三 .....	16

## 壹、目的

國際種子檢查協會 (International seed Testing Association; ISTA) 為一國際性種子檢查組織，其宗旨為確保國際間種子貿易之品質及提昇種子檢查技術水準。身為制訂國際種子檢查規則的權威組織，其相關種子檢查技術的發展係由其 17 個技術委員會負責，而技術委員會的組成除其主席多由各國種子檢查機構負責人擔任之外，還包括公私立大學及研究機構，與種子公司之研究人員。本人此次係以品種技術委員會委員的身份參加會議，主要的目的包括：提交本人所負責專案「以 DNA 分子技術進行水稻品種檢查」這一年來的研究成果，參與討論品種技術委員會未來三年的工作方向，並應邀在討論論壇中發表

“Overview of DNA technologies – current uses and applications” 專題演講。

## 貳、前言

國際種子檢查協會每年召開一次年會 (Annual Meeting)，大會 (Congress) 每三年與年會同時舉行。本次 ISTA 第 30 屆大會暨 2013 年年會於土耳其安塔利亞 (Antalya) 召開，議程分為四個部分：第一部份為 6 月 12 日至 6 月 14 日種子研討會 (Seed Symposium)，探討的主要議題包括基因型的維持、種傳病害、原生地的復育、種子發芽及休眠、種子品質與植物育種、分子標誌的應用、種子品質的評價與種子生理及逆境反應等；第二部分為 6 月 15 日及 6 月 16 日舉行的技術委員會 (Technical Committees) 報告，涵蓋 17 個技術委員會與科學期刊 Seed Science and Technologies 編輯委員會，報告過去一年的工作進度、

總結三年的工作成果、宣告未來三年預定計畫、並公布未來三年各技術委員會的主席、副主席與委員名單；第三部分為6月17日之討論論壇；第四部分為6月18日舉行的常會 (Ordinary General Meeting)，選舉下屆執委代表、副主席及主席，並針對秘書處、會員代表及各技術委員會所提出擬修改之種子檢查規則條文等議案等進行討論投票表決。

### 參、出國日期

中華民國 102 年 6 月 10 日至 6 月 20 日，為期 11 天。

### 肆、出席會議人員

<u>姓名</u>	<u>職稱</u>	<u>服務單位</u>
胡凱康	副教授	台灣大學農藝系

### 伍、會議及活動行程

- 6 月 10 日      ◆ 自中正國際機場出發抵達香港國際機場轉機，飛往土耳其伊斯坦堡國際機場。
- 6 月 11 日      ◆ 由伊斯坦堡國際機場出發，飛往安塔利亞。  
◆ 辦理報到手續，出席晚間 18:30~21:00 歡迎酒會。
- 6 月 12 日      ◆ 出席開幕式及研討會 Session 1  
開幕由土耳其副國務卿暨食品、農業及畜牧部長及 ISTA 主席 Dr. Joël Lèchappè 致歡迎詞，並發表土耳其的種子產業。  
◆ Session 1 由巴西 Dr. Krzyzanowski 主持種子生產上品質評鑑技術之探討，及海報展示。
- 6 月 13 日      ◆ 出席研討會 Session 2  
上午：由英國克佑皇家植物園 (Royal Botanic

Gardens, Kew) 千年種子銀行的 Dr. Robin Probert 主持，探討種子貯藏在遺傳保育及商業貿易之應用。

下午：由法國巴黎第六大學 (Université Pierre et Marie Curie ; UPMC) Dr. Françoise Corbineau 主持，探討如何利用生理、生化及分子標誌於種子品質鑑定應用。

6 月 14 日

◆ 出席研討會 Session 3、4、5

上午：由美國 Dr. Beni Kaufman 主持 Session 3 及 4，探討新開發的種子品質評鑑方式。

下午：由英國亞伯丁大學 (University of Aberdeen) 的 Dr. Alison Powell 主持 Session 5，探討如何提高及評鑑種子生理品質。

◆ 19:00-23:00 正式晚宴。

6 月 15 日

◆ 出席技術委員會工作報告

上午：由取樣 (Bulking and Sampling)、花卉種子 (Flower Seed)、林木及灌木種子 (Forest Tree and Shrub Seed) 與發芽 (Germination) 委員會進行工作報告及技術研討。

下午：水分 (Moisture)、品種 (Variety)、GMO 種子 (GMO)、統計 (Statistics)、命名 (Nomenclature) 以及種子科技期刊編輯報告 (SST Editorial Board) 等委員會進行工作報告及技術研討。

◆ 18:30-20:00 參加品種檢查技術委員會會議

6 月 16 日

◆ 出席技術委員會工作報告

上午：純度 (Purity)、健康種子 (Seed Health)、貯藏 (Storage)、TZ 檢測 (Tetrazolium) 等委員會進行工作報告及技術研討。

下午：活力 (Vigor)、技術研發 (Advanced

Technologies)、法規 (Rule) 委員會進行工作報告及技術研討。

- 6 月 17 日
- ◆ 出席技術委員會工作報告及討論  
上午：能力測試 (Proficiency Test) 、實驗室認證及品保程序
  - ◆ 討論論壇一：目前的 ISTA 種子檢查規範是否足以面對未來種子技術的改變
  - ◆ 討論論壇二：DNA 種子檢查技術的國際標準化
  - ◆ 發表「Overview of DNA technologies - current uses and applications」專題演講
- 6 月 18 日
- ◆ 出席會員常會 (Ordinary General Meeting)  
由主席 Dr. Joël Lèchappè 致詞及 ISTA 執行委員會工作報告、秘書長報告、ISTA 2013-2016 執行策略、執委會成員選舉、組織章程修訂及國際種子檢查規範(2013 年版)修訂、下屆常會之開會地點及日期等。
- 6 月 19 日
- ◆ 自安塔利亞出發，抵達伊斯坦堡國際機場。
- 6 月 20 日
- ◆ 自伊斯坦堡轉機，飛往香港國際機場。
  - ◆ 自香港國際機場轉機，返回中正國際機場。

## 陸、 會議經過與紀要

### 一、 有關 ISTA 會務

#### 1. 會務概況

截至 2013 年為止，參與 ISTA 之會員實驗室共 216 個 (具 ISTA 發證資格者有 124 個；含台灣的種子檢查室) 及 52 名個人會員及 42 個準會員，分布於全球 79 個國家。今年的大會來自 48 個國家 468 位會員參加，常會期間有 65 位代表可依據憲章規則行使表決權，實際出席投票代表有 41 位。社團代表如 OECD，



EU，FAO，國際種子商聯盟 (International Seed Federation; ISF) 及亞太種子商協會 (Asian Pacific Seed Association; APSA) 等團體皆有派代表參加。

## 2. 執行委員會與秘書處人事更替概況

三年前在德國科隆舉行之第 29 屆大會選出 Joël Lèchappè (法籍) 任副主席，當時的副主席 John Hampton (紐西蘭籍) 依慣例升任主席。由於 H 氏於當 (2010) 年 10 月以私人原因辭去主席一職，因此自 2010 年 11 月起 L 副主席便開始執行主席職務。本屆大會之後，Joël Lèchappè (法籍) 依章程繼續擔任主席一職，並選出 Craig McGill (紐西蘭籍) 為副主席。依據 ISTA 章程，M 氏將於下一屆大會 (2016 年) 起接任主席職務。

本屆大會中選出 8 位執行委員，分別為： Rita Zecchinelli (義大利)、Grethe Tarp (丹麥)、Mable Simwanza (尚比亞)、Masatoshi Sato (日本)、Alexander Malko (俄羅斯)、Berta Killermann (德國)、Steve Jones (加拿大)、與 Cecilia Jones (烏拉圭) 等；唯一參選而未選上的是荷蘭的國家代表。

原秘書長 Mr. Michael Muschick 於 2012 年 12 月請辭，執行委員會暫聘曾任 ISTA 秘書長的 Mr. Heinz Schmid 代理秘書長一職，並聘任 Dr. Benjamin Kaufman 自 2013 年 7 月 1 日起擔任秘書長。K 氏為以色列裔美籍，曾任職於美國 Pioneer 種子公司生物技術部門，並自 2008 年起開始參加 ISTA 品種技術委員會，並於 David Chang 之後繼任玉米分子品種檢查專案負責人。

## 3. 有關憲章的修訂

本次年會提出的憲章修正案共有五案，修正案遵守三分之二多

數決的原則進行表決，全數獲得通過。

- (1) 憲章修訂未改變現有條文，但所增修的條文會導致需要改變現有條文之增修案，需依重大議案標準，超過 2/3 以上的同意方得以通過。
- (2) 將「會員除籍」增列至需要 2/3 以上同意的重大議案類別。
- (3) 任何由會員提出之議題須經秘書處以書面形式公告時限由大會開始前的 2 個月更改為 3 個月。
- (4) 文字修訂。
- (5) 依據 2012 年年會時的決議將「憲章」(Constitution) 一詞改為「規程」(Articles)，文字修訂現有規程中之疏漏。

## 二、中國大陸參加 ISTA 情況的觀察

自 2011 年年會 (蘇黎世) 開始，毛培勝 (中國農業大學國家牧草及草皮草種子質量檢驗中心) 連續 2 年以具有投票權的國家代表 (Voting delegate) 身份代表中國大陸出席；本屆大會毛雖仍有參加，但並非投票代表，也並未有其他投票代表出現。

## 三、個人參與活動內容紀要

### 1. 學術研討會評審

大會第一部份種子研討會期間 (6 月 12 日至 14 日) 接受研討會主辦人 Dr. Alison Powell 邀約，參與口頭報告的評審工作，除 6 月 13 日的 Session 2 因與其他討論行程衝突而未參加之外，其餘四個 Sessions 皆全程參與，並於每一 Session 結束時將評分表送交主辦人。

## 2. 品種技術委員會

與品種技術委員會主席 Berta Killermann (德國) 與 GMO 技術委員會主席兼品種技術委員會 DNA 小組召集人 Cheryl Dollard (加拿大) 於 6 月 13 日針對年度工作報告進行會前會，並討論 6 月 17 日相關論壇的議題內容。品種技術委員會於 6 月 15 日下午提出年度工作報告，並於當日傍晚六時後，舉行一個半小時的技術委員會會議，會中針對 DNA 技術工作小組這一年的進展提出報告，並討論下一年度的工作計畫。因玉米分子品種檢查專案負責人 Dr. Benjamin Kaufman 即將接任 ISTA 秘書長，會中協議原專案交由法國 GEVES 的專家接掌。

## 3. 討論論壇專案報告

為了促進會員對於特定議題的瞭解，並透過討論凝聚共識，本次大會在 6 月 17 日共舉辦 2 場論壇 (Discussion Forum)，第一場 “Do the current principles and requirements for the ISTA Rules meet with the future needs for developments in seed technology?” 是為了解決近年來對於 ISTA 是否還應該針對各項檢驗方法提出規範，還是只需要針對檢驗結果認證各實驗室能力這一個爭議；會中邀請 Steve Jones (執行委員兼規則委員會主席)，Craig McGill (前執行委員及新當選 ISTA 副主席)，與 Alison Powell (前執行委員) 發表專題演講。

第二場論壇 “Discussion on the use and international standardization of DNA technologies in the area of seeds.” 的目的為提高會員對於現行 DNA 技術的瞭解，以促進會員間的對話與共識之凝聚。本人獲邀在第二場論壇中發表專題演講 (附錄一)，另兩位講員分別為即將接任秘書長的 Dr. Benjamin

Kaufman 與 UPOV 代表 Fuminori Aihara (第二場論壇議題及講員見附錄二)。會後包括 Rita Zecchinelli (義大利)、Berta Killermann (德國) 與 Steve Jones (加拿大) 等執行委員，與數位在座專家皆高度肯定本人專題演講“Overview of DNA technologies – current uses and applications”的內容 (附錄三)，咸認為有助於會員對於 DNA 技術的認知，並有助於釐清未來可能之爭議。

## 柒、心得與建議

自本屆大會開始，ISTA 各技術委員會 (TCOM) 組織的機制有一些影響較大的改變。ISTA 秘書處在 2012 年 11 月修訂的標準作業文件 (Standard Operation Procedure) “How to become an ISTA Technical Committee Member” 指出，TCOM 委員的核定是執行委員會的權責，且每三年 (舉行大會的那一年) 核定一次。各技術委員會在大會前呈交候選名單，由執行委員會在大會舉辦前核定；如果還有空缺，在大會期間新加入的委員名單，將於大會結束後，當年九月的執行委員會例會時核定。

更早(2011 年 1 月) 修訂的文件 “Responsibilities of ISTA Technical Committees” 之中明確指出技術委員的責任，包括參與檢查方法的驗證研究，並參與至少一個專案或工作群。沒有滿足上述基本要件的委員將被歸類為 Non-active member，並可能導致於三年任期結束時被要求退出委員會。

參與技術委員會是提高我國國際能見度，並彰顯我國科技發展的最佳途徑。即使可能因為沒有空缺而暫時無法列名於技術委員會，仍然能夠藉由參加專案表現出參與的熱忱，因而提高成為下一屆技術委員的機會。然而在目前農委會對於各大學研究

經費持續縮減的情況下，缺乏穩定研究經費支持的研究人員將因擔心無法履行三年期的承諾而對於國際參與卻步。

建議身為我國種子檢查主管機構的種苗改良繁殖場，以專案方式向農委會國際處申請配合 ISTA 技術委員會需要的整合型計畫，藉由提高我國研究人員對於 ISTA 技術委員會的參與程度提高我國的國際能見度。

## 附錄一、ISTA 2013 大會專題演講



圖 1. 第二場討論論壇，台上自左至右為共同主持人 Cheryl Dollard 與 Berta Killermann，我國胡凱康教授，ISTA 秘書長 Benjamin Kaufman 與 UPOV 代表 Fuminori Aihara。

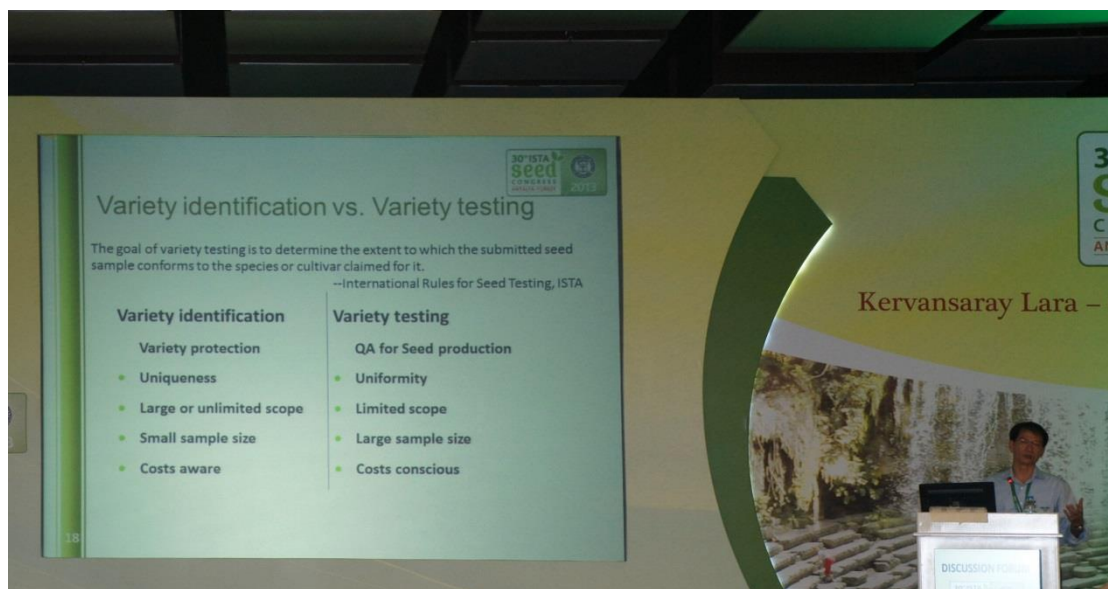


圖 2. 我國胡凱康教授以“Overview of DNA technologies – current uses and applications”為題，於第二場論壇發表專題演講。





圖 3. 專題演講時，講員姓名、機構名稱與國家皆與演講簡報全程並列與大講堂銀幕之上，我國胡凱康教授之機構為 National Taiwan University, 我國國名 Separate Customs Territory of Taiwan, Penghu, Kinmen & Matsu (台澎金馬獨立關稅區) 符合 WTO 模式。



## Discussion Forum 2

### Discussion on the use and international standardization of DNA technologies in the area of seeds

Chair: Cheryl Dollard & Berta Killermann



Prof. Dr. Kae-Kang Hwu  
National Taiwan University, Separate Customs  
Territory of Taiwan, Penghu, Kinmen & Matsu

### Overview of DNA technologies – current uses and applications

Date - Presenter Name



## Overview of DNA technologies – current uses and applications

### Questions to the audience

- Who is using DNA technologies?
- Which techniques/applications are used (PCR, RTPCR, genotyping (fingerprinting) multiplexing, whole genome sequencing, sequencing, ...)
- ...

Date - Presenter Name



Dr. Beni Kaufman  
Pioneer, United States

## Required elements of international standardization

Date - Presenter Name

## Required elements of international standardizations

### Questions to the audience

- Reference material – internationally representative
- Sample size, statistical aspects
- Accreditation standard - Performance Based Approach
- Proficiency Tests
- ...

Date - Presenter Name



Fuminori Aihara  
UPOV

## Use of biochemical and molecular markers in the DUS examination and harmonization between relevant international organizations

Date - Presenter Name

## Use of biochemical and molecular markers in the DUS examination and harmonization between relevant international organizations

### Questions to the audience

- Which markers are available?
- Which marker types are most useful? advantages – disadvantages
- What are the working sample size – statistical aspects

Date - Presenter Name

### ... Questions to the audience

- Suitable methods and PCR multiplexing issues for variety identification
- The need to standardize reporting of results (depending on methods, protocols, visualization methods, etc.)
- Markers for seed health - aspects of seed health (for example seed borne diseases) are getting more and more important for the increasing organic farming market
- Species /diseases to be considered for testing immediately
- Problematic aspects: marker – rapid development of equipment used
- ...

Date - Presenter Name

# 附錄三：

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

## Overview of DNA technologies – current uses and applications

Dr. Kae-kang Hwu  
Separate Customs Territory of Taiwan, Penghu, Kinmen & Matsu

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

### Current applications:

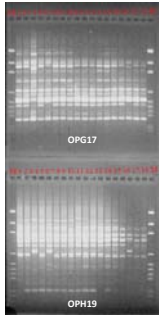
- Variety verification
- Purity testing
- Variety identification
- Seed health testing
- GMO testing
- Species identification

2

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

### Variety verification

- Suspected off-types tested against a few possible varieties.
- Complex pattern (profile)
  - RAPD, ISSR, ...
- Pros:
  - Easy to conduct
  - Without prior knowledge of DNA sequence
- Cons:
  - Low repeatability among labs
  - May not provide enough discriminatory power among varieties (false negative)



OPG17  
OPH19

1: LR, 2: TR12, 3: TR7, 4: C245, 5: C485, 6: C605, 7: C620, 8: C634, 9: C638, 10: C642, 11: C646, 12: C650, 13: C654, 14: C658, 15: C662, 16: C666, 17: C670, 18: C674, 19: C678, 20: C682, 21: C686, 22: C690, 23: C694, 24: C698, 25: C702, 26: C706, 27: C710, 28: C714, 29: C718, 30: C722, 31: C726, 32: C730, 33: C734, 34: C738, 35: C742, 36: C746, 37: C750, 38: C754, 39: C758, 40: C762, 41: C766, 42: C770, 43: C774, 44: C778, 45: C782, 46: C786, 47: C790, 48: C794, 49: C798, 50: C802, 51: C806, 52: C810, 53: C814, 54: C818, 55: C822, 56: C826, 57: C830, 58: C834, 59: C838, 60: C842, 61: C846, 62: C850, 63: C854, 64: C858, 65: C862, 66: C866, 67: C870, 68: C874, 69: C878, 70: C882, 71: C886, 72: C890, 73: C894, 74: C898, 75: C902, 76: C906, 77: C910, 78: C914, 79: C918, 80: C922, 81: C926, 82: C930, 83: C934, 84: C938, 85: C942, 86: C946, 87: C950, 88: C954, 89: C958, 90: C962, 91: C966, 92: C970, 93: C974, 94: C978, 95: C982, 96: C986, 97: C990, 98: C994, 99: C998, 100: C1000

3

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

### Purity testing

- Hybrid purity (Success rate for hybridization)
  - Usually one marker will do
  - RAPD, ISSR, SSR, SNP, InDel, ...
- Testing for genetic purity (Variety testing)

The goal of variety testing is to determine the extent to which the submitted seed sample conforms to the species or cultivar claimed for it.

–International Rules for Seed Testing, ISTA

- Multiple samples tested against one or a few known reference varieties
- Complex profile in order to generate enough discriminatory power
- High repeatability
- Commonly used markers: **SSR** and **SNP**
- Multiple markers are needed

4

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

### Purity testing - SSR

#### SSR markers on agarose gel and polyacrylamide/sequencing gel



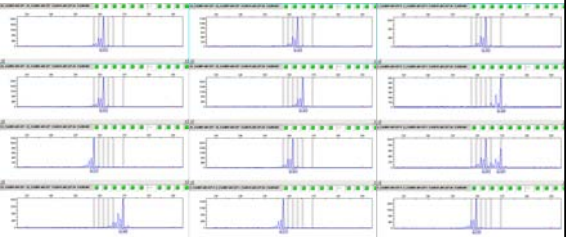
5

30<sup>th</sup> ISTA  
**seed**  
CONGRESS  
ANTALYA-TURKEY  
2013

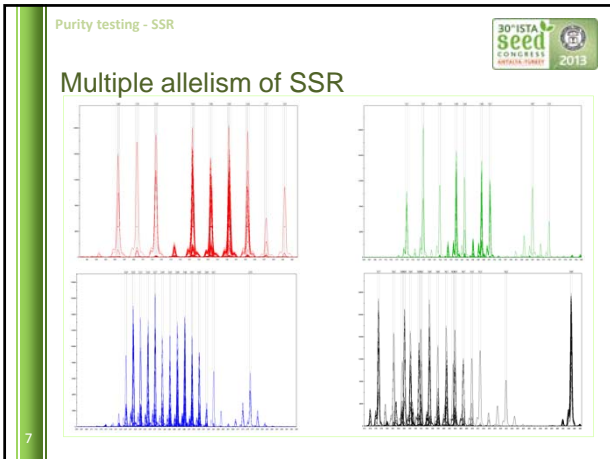
### Purity testing - SSR

#### SSR analyzed with capillary electrophoresis

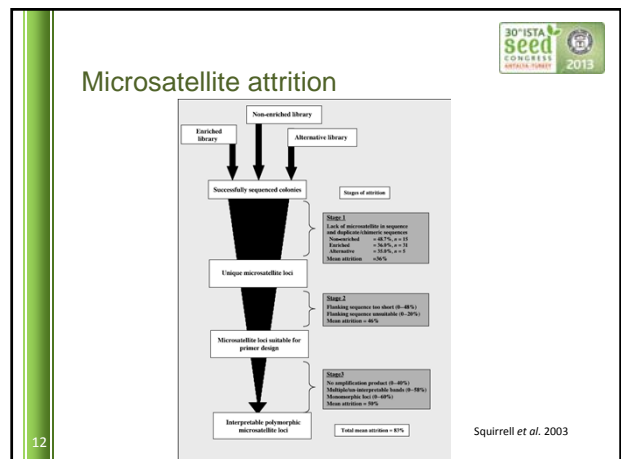
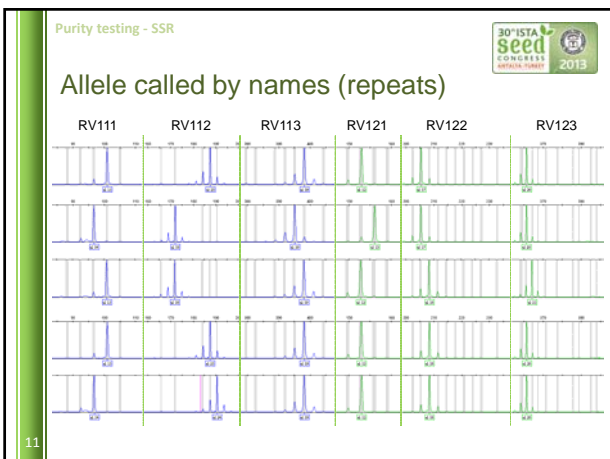
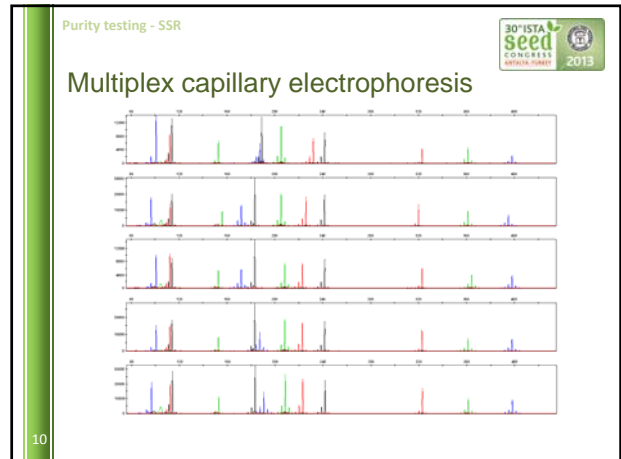
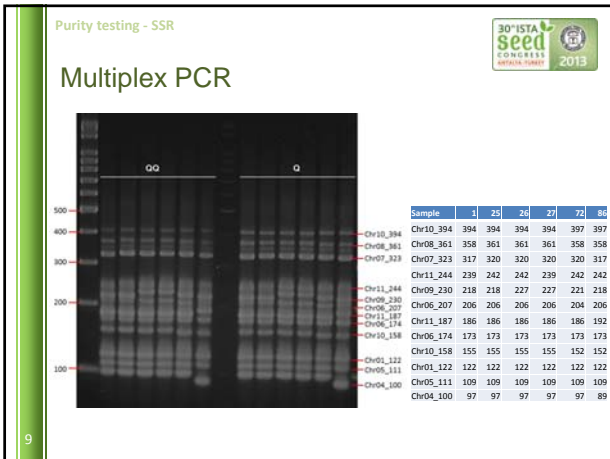
Pepper CAMS405 Minamiyama et al. (2007) (TC)<sub>18</sub> PIC = 0.81



6



- Purity testing - SSR
- 30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013
- ### SSR marker
- Advantages of SSRs:
    - Co-dominant marker
    - Require very little and not necessary high quality DNA
    - Highly polymorphic
    - Simple interpretation of results
    - Easily automated, allowing multiplexing
    - High discriminatory power and high reproducibility
  - Disadvantages of SSRs:
    - Costly
    - Complex discovery procedure
- 8



Purity testing - SSR

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

### Suggested strategy for mining SSR markers from 454 data at low coverage

13

Purity testing - SSR

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

### NGS & SSR Mining

Study	Organism	Sample sequenced	Sample type	Platform	Mining tool	SSR	Primer/polymorphism	Assembly tool
Somers et al., 2011	Earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> )		Enrichment	Titanium	MSATCOMMANDER 0.8.1		48/16	CAP3
Sinama et al., 2011	Lepidoptera ( <i>Euphydryas aurinia</i> )	1/32	Enrichment	Titanium	ODD	3413	96/12	
Buehler et al., 2011	<i>Arabis alpina</i>	1/16	Shotgun	Titanium	MSATCOMMANDER 0.8.2	341	34/19	
Abbott et al., 2011	<i>Didemnum vexillum</i>	9/8	Shotgun	GS-FLX	Custom Perl script	775	48/12	Unknown
Teichen et al., 2010	Okaloosa Darter ( <i>Etheostoma okaloosae</i> )	1/8	Shotgun	Titanium	MSATCOMMANDER 0.8.2	7420	39/30	
Perry and Rowe, 2010	Water strider ( <i>Gerris incognitus</i> )	1/4	Shotgun	Titanium	Exact Tandem Repeat Analyzer 1.0	30820	23/10	Unknown
Magalin et al., 2010	Lichenized ascomycete	1/2	Shotgun	GS-FLX	MSATCOMMANDER 0.8.2	653	20	GS de novo assembler
Duckett and Stow, 2010	<i>Gethya variegata</i>		Shotgun	GS-FLX	MSATCOMMANDER 0.8.2	732	15/15	
Dubut et al., 2010	<i>Zingel asper</i>	1/32	Enrichment	Titanium	ODD		181/58	
Csencsics et al., 2010	Dwarf bulrush ( <i>Typha minima</i> )	1/16	Shotgun	Titanium	MSATCOMMANDER 0.8.2	307	30/17	
Boomer and Stow, 2010	Australian gummy shark ( <i>Mustelus antarcticus</i> )	1/16	Shotgun	GS-FLX	MSATCOMMANDER 0.8.2	4368	20/12	Unknown
Castoe et al., 2009	Copperhead snake ( <i>Agkistrodon contortrix</i> )	1/4	Shotgun	GS-FLX	Custom Perl script	14612		
Abdelkrim et al., 2009	Fossil bone of moa	1/4	Shotgun	GS-FLX	MSATCOMMANDER 0.8.1	195	7/1	
Abdelkrim et al., 2009	Blue duck ( <i>Hymenolaimus malaccorhynchus</i> )	1/16	Shotgun	GS-FLX	MSATCOMMANDER 0.8.1	231	24/13	

Lepais and Bacles (2011)

14

Purity testing - SNP

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

### Mining tomato SNP markers from Illumina HiSeq2000 data

--Picture kindly provided by Dr. Kai-Yi Chen

15

Purity testing - SNP

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

### SNP genotyping

• Single Base extension (SBE)

16

Purity testing - SNP

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

### Characteristics of SNP markers

- Abundant
- Binary
- Stable, mutation rate lower than SSR
- May be designed to be analyzed by multiple platforms
- Less discriminatory than SSR, amendable by increasing the number of loci
- Some platforms compatible with automation → High throughput
- Mining SNP without reference genome is possible with GBS (genotyping-by-sequencing)

17

Purity testing - SNP

30<sup>th</sup> ISTA Seed Congress Valencia, Spain 2013

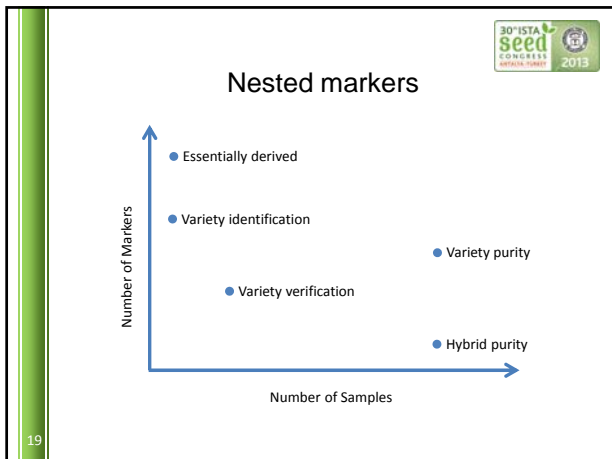
### Variety identification vs. Variety testing

The goal of variety testing is to determine the extent to which the submitted seed sample conforms to the species or cultivar claimed for it.

--International Rules for Seed Testing, ISTA

Variety identification	Variety testing
<b>Variety protection</b>	<b>QA for Seed production</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniqueness</li> <li>• Large or unlimited scope</li> <li>• Small sample size</li> <li>• Costs aware</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniformity</li> <li>• Limited scope</li> <li>• Large sample size</li> <li>• Costs conscious</li> </ul>

18



30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Seed health testing

- Extract pathogen, dilute and plated on selective or semi-selective medium.
- PCR used for identification of suspect colonies.

**7-020: Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on *Daucus carota***

20

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Seed health testing

## Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

- LAMP Primers are designed based on six regions as a target.
- Reaction temperature is constant (60~65°C).
- Efficiency of amplification is very high.
- Electrophoresis is not needed.

BFB symptom on watermelon caused by *Acidovorax citrulli* (A. avenae subsp. citrulli)

--Kindly provided by Masatoshi SATO  
Incorporated administrative agency  
National Center for Seeds and Seedlings(NCSS)

21

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Seed health testing

## Analysis

Real-time turbidity meter

#### Visual analysis

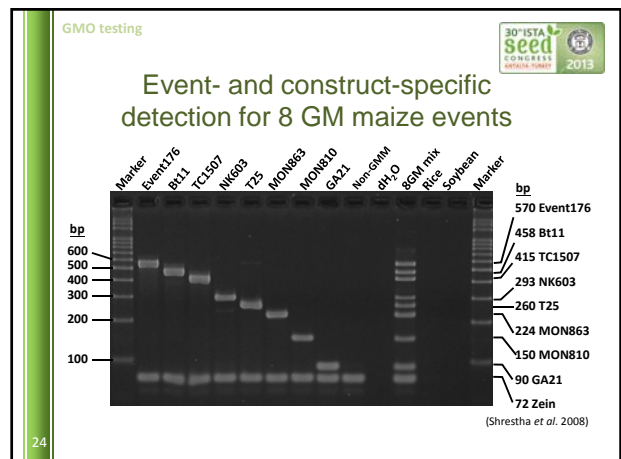
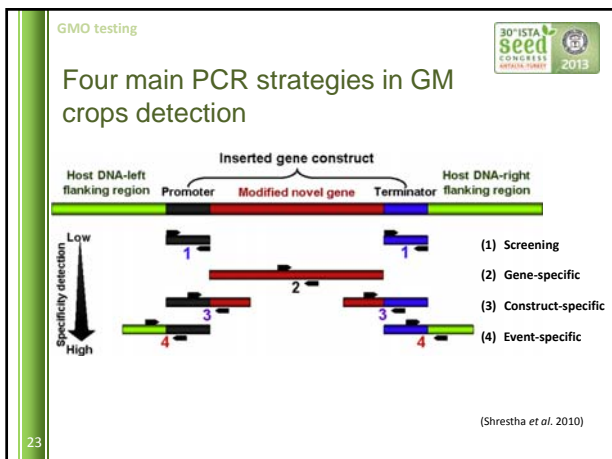
Magnesium Pyrophosphate (+)  
Products of LAMP reaction

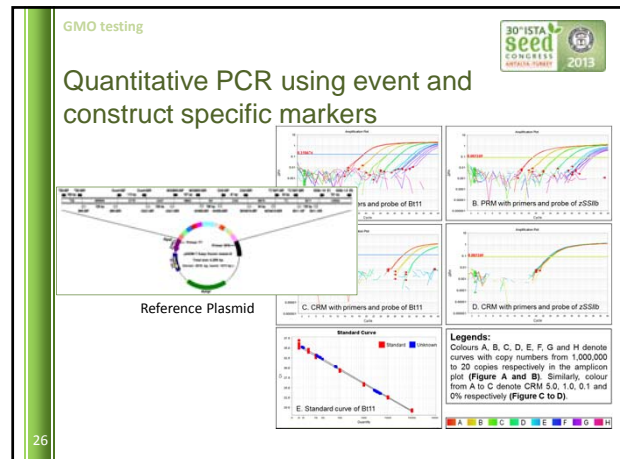
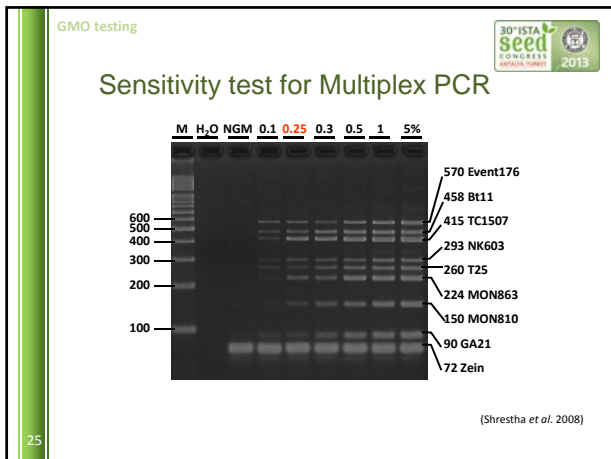
#### Real-time analysis

Absorbance value (650nm)  
Reaction time (min)

Detection sensitivity : LAMP = PCR

22





Species identification

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Species identification:

- DNA barcode (Kress and Erickson 2007):
  - A combination of the non-coding *trnH-psbA* spacer region and a portion of the coding *rbcl* gene as a two-locus global land plant barcode may provide the necessary universality and species discrimination.
  - Amplicon size in 340-660 bp
  - Abundant in A/T, difficult for primer/probe design
  - Species is identified based on DNA sequence

27

Species identification

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### DNA markers for species identification

- Criteria:
  - Species specific
  - Uniform among varieties
  - Single copy (optional)
  - 60-150 bp of sequence suitable for primer/probe design
- Methods:
  - Qualitative, semi-quantitative or quantitative

28

Species identification

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Source of markers:

- Endogenous reference genes (for GMO testing)
  - **Maize**: alcohol dehydrogenase (*Adh1*), high mobility group protein (*hmgA*), invertase A (*ivrt*), zein and starch synthase IIb (*SSIIb*)
  - **Canola**: acetyl-CoA carboxylase (*BnACCg8*) and fatty acyl-ACP thioesterase (*FatA*)
  - **Oat**: avenin
  - **Soybean**: lectin 1 (*lect1*)
  - **Wheat**: acetyl-CoA carboxylase and waxy-D1
  - **Barley**:  $\gamma$ -hordein
  - **Rice**: *gos9* and sucrose phosphate synthase (*SPS*)
  - **Sunflower**: helianthinin

29

Species identification

30<sup>th</sup> ISTA seed CONGRESS 2013

### Source of markers:

- Allergenic products (EU Directive 2003/89/EC):
  - Wheat
  - Sesame
  - Celery
  - Lupin
  - Buckwheat
  - Peanuts, Cashew, Hazelnuts, Pecan, Pistachio, Walnuts

30





**Thank you for your attention!**

