

## 出國報告（出國類別：研究）

# 赴荷蘭建置雙方蝴蝶蘭DNA資料庫

服務機關：行政院農業委員會種苗改良繁殖場

姓名職稱：張惠如 助理研究員

派赴國家：荷蘭

出國期間：103年8月31日至9月13日

報告日期：103年10月31日

## 目 次

|  |    |
|--|----|
| 摘要.....                                | 1  |
| 壹、目的.....                              | 2  |
| 貳、行程.....                              | 4  |
| 參、研習內容與心得.....                         | 6  |
| 一、荷蘭品種檢定專責機構 Naktuinbouw.....          | 6  |
| 二、利用 BioNumerics 分析軟體進行蝴蝶蘭品種基因型分析..... | 6  |
| 三、雙方技術合作細節討論.....                      | 8  |
| 肆、檢討與建議.....                           | 10 |
| 伍、附圖 .....                             | 12 |
| 陸、附件 .....                             | 16 |

## 摘要

Naktuinbouw為荷蘭執行植物品種檢定的專責機構，亦負責歐盟成員國數種作物品種申請案件之檢定工作，具相當豐富的品種檢定業務經驗及人力。本次前往Naktuinbouw進行研習，研習內容主要分為：一、利用BioNumerics分析軟體進行蝴蝶蘭品種基因型分析，建立蝴蝶蘭DNA資料庫。以瞭解我方建立蝴蝶蘭DNA資料庫時需注意的參數設定、資料格式及未來雙方合作所需交換的資料內容等問題。；二、為有效辦理第14屆臺荷農業合作會議之決議事項，針對雙方蝴蝶蘭DNA資料庫合作案，對於蝴蝶蘭DNA材料與基因型分析結果交換等技術合作細節進行溝通協調。透過與其技術人員的交流與經驗分享，可在往後操作上更加留意一些可以增加準確度及資料庫運作順暢度的地方，進而提升分子鑑別技術及DNA資料庫於性狀檢定作業上的輔助性。

## 壹、目的

植物新品種為育種者心血結晶，為保障育種者權利及促進農業發展，並符合WTO之規範，我國自2005年完成「植物品種及種苗法」之修正並公告實施後，開始促成國內對品種權的認知，並進一步推進與國際觀念接軌。種苗場於2006年7月正式承接並執行品種檢定之技術工作。為辦理植物品種權性狀檢定相關業務，於97年派員參加國際植物品種保護訓練班。而荷蘭為歐洲施行植物品種權保護經驗豐富之國家，故於98年至101年，也陸續派不同技術人員赴荷蘭植物品種檢定機構（Naktuinbouw）研習多種植物品種檢定技術。

目前品種檢定方法為外表性狀檢定方法，但有時受不同外在環境的影響；或是在作物的某些生長期如苗期等，並不容易以外在性狀來區分個別差異。因此，若能利用分子標誌技術可直接鑑定植物基因型的遺傳歧異度(genetic diversity)特性，不僅可輔助性狀檢定方法，提供分子層次上的鑑定依據，還可達到協助侵權鑑定分析的目的。另外，UPOV成立UPOV-BMT ( UPOV working group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA-profiling in particular ) 是為生化分子技術及DNA鑑定工作團隊，探討利用分子標誌於植物品種保護之應用相關問題，除於2007年及2010年發布有關植物品種DNA描繪(DNA profiling)方法的參考準則外，也對於使用分子標誌輔助性狀檢定提出三個看法：a. 應用於預測傳統性狀，提供分類依據；b. 建立分子標誌與性狀間的相關性，用來估計遺傳的相似性，以協助選擇參考品種；c. 建立新的品種權檢定系統。可見未來國際上利用分子標誌技術輔助品種性狀檢定作業，是有其需要性與趨勢性。

而荷方於97年度第11屆臺荷農業合作會議中，始提出有關蝴蝶蘭品種DNA分子標誌合作一事，經過雙方相關技術人員就分子鑑定流程、儀器系統與結果分析等細節進行多次交流與討論後。於101年度「第14屆台荷農業合作會議」中針對雙方技術人員所提出的四點建議方式，決議為求雙方互利之研究工作，有關蝴蝶蘭品種分子鑑定技術合作案，臺荷雙方同意以第二點建議方式：「相同品種各自

建立資料庫並調和資料格式進行多年期之合作」(如附圖一)。為有效辦理臺荷農業合作會議之決議事項，需要雙方針對材料的交換、採樣與DNA萃取方法與分析結果交換等技術合作細節再進行交流討論，因此，藉此次赴荷研習的機會，在蝴蝶蘭品種分子鑑定技術、DNA資料庫及未來侵權案件實務檢測等方面進行相互交流，以提供我國執行蝴蝶蘭分子標誌鑑別系統之參考資料。並期許未來將以此合作方式為模式，拓展與其他國家的合作交流機會，有助提升我國品種權保護於國際上的認可，進一步提升我國研發品種於國際市場之競爭力。

## 貳、行程

| 日期   | 星期 | 地區及行程                     | 研習內容   |
|------|----|---------------------------|--|
| 8/31 | 日  | 台北→阿姆斯特丹                  | 搭機赴荷蘭阿姆斯特丹   |
| 9/1  | 一  | 荷蘭 阿姆斯特丹 →<br>Naktuinbouw | 1. 抵達荷蘭<br>2. 拜訪相關人員及討論研習行程細節內容  |
| 9/2  | 二  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 1. Naktuinbouw 利用分子標誌建立植物 DNA 資料庫概況。<br>2. 討論有關蝴蝶蘭 DNA 資料庫雙方合作，各自執行之進度。  |
| 9/3  | 三  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 1. BioNumerics 軟體版本比較及參數設定等。<br>2. 蝴蝶蘭 DUS 檢定溫室參觀。   |
| 9/4  | 四  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 利用 BioNumerics 軟體進行數據分析演練及相關問題討論   |
| 9/5  | 五  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 利用 BioNumerics 軟體進行數據分析演練及相關問題討論   |
| 9/6  | 六  | 假日                        | 資料收集與整理。   |
| 9/7  | 日  | 假日                        | 資料收集與整理。   |
| 9/8  | 一  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 1. 利用 BioNumerics 軟體進行數據分析演練及相關問題討論。<br>2. 討論利用 BioNumerics 軟體進行分析數據交換格式及內容。   |
| 9/9  | 二  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 1. 針對雙方技術合作，進行有關蝴蝶蘭 SSR 分子標誌結果判定、參考品種選定、實際應用及 DNA 資料庫等議案討論。<br>2. 確認雙方蝴蝶蘭核酸萃取方法。<br>3. 有關蝴蝶蘭 DNA 材料及基因型分析數據交換相關細節討論。               |
| 9/10 | 三  | 荷蘭 Naktuinbouw            | 1. 擬訂未來雙方交換 DNA 材料及分析資料之作業細節建議書。<br>2. 參加 Naktuinbouw 針對育種者及業者所舉辦的「Ownership and use of DUS samples during and after the DUS test」 |

|      |   |                |   |
|------|---|----------------|---|
| 9/11 | 四 | 荷蘭 Naktuinbouw | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 未來雙方蝴蝶蘭品種分子檢定技術與 DNA 資料庫於實務應用上的問題討論。</li> <li>2. 未來雙方分子鑑定技術合作的目標及執行進度討論。</li> </ol> |
| 9/12 | 五 | 荷蘭 阿姆斯特丹→台北    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 確認未來雙方交換 DNA 材料及分析資料之作業細節建議書內容。</li> <li>2. 由荷蘭飛回台灣。</li> </ol>                     |
| 9/13 | 六 | 荷蘭 阿姆斯特丹→台北    | 抵達台灣  |

## 參、研習內容與心得

### 一、荷蘭品種檢定專責機構 Naktuinbouw

Naktuinbouw 機構位於荷蘭的 Roelofarendsveen 地區，主要業務除了品種檢定外，亦有實驗室及檢驗部門，為荷蘭及歐盟國家之民眾及業者提供多種關於種子健康、品質檢測及品種檢定之服務，並設有各項服務之收費標準。本次研習主要是與 Naktuinbouw 之 Research & Development 實驗室主持人，亦為利用分子標誌技術進行品種鑑定與建立作物 DNA 資料庫之負責人 Dr. Hedwich Teunissen 聯繫研習時間與相關細節。在事前聯絡溝通時，雙方取得本次研習的共識為探討雙方合作細節與建置蝴蝶蘭 DNA 資料庫細節。討論議題主要著重在如何交換 DNA 材料及分析資料、試驗分析的參考品種設定、建立識別結果的共識及侵權鑑定分析流程等問題。

### 二、利用BioNumerics分析軟體進行蝴蝶蘭品種基因型分析

Naktuinbouw 是利用 APPLIED MATHS 公司所開發的軟體 BioNumerics，配合 LI-COR 4300 電泳系統，進行作物品種 DNA 分子標誌的鑑定分析，包括 SSR 分子標誌跟 AFLP 分子標誌。BioNumerics 可用來分析 DNA 分子標誌的指紋圖譜 (fingerprinting)、DNA 序列、進行親緣演化樹分析、計算品種間相似度等，並可以儲存並同時比較大量的核酸分析結果。透過 101 年度至 Naktuinbouw 進行研習的經驗，與回國後請國內代理商進一步介紹此軟體的功能與實際操作方式，發現 BioNumerics 的確很適合作為建置與整合品種 DNA 資料庫的工具。針對蝴蝶蘭品種 SSR 分子鑑別技術，種苗場及 Naktuinbouw 各自所使用的技術分析平台分別為 ABI PRISM 3730 DNA analyzer 系統及 LI-COR 4300 電泳系統，使得 SSR-PCR 的原始數據分別呈現 peak 的型式與電泳圖型式。透過 BioNumerics 軟體可成功轉化這兩種數據型式，可一起在軟體中進行分析比較。而現今 BioNumerics 最新版本 (Ver. 7.1)，已經可以直接分析使用 ABI 系統所得的分析數據。因此利用 BioNumerics 7.1 版進行基因型鑑定分析時，已經不需要經過轉換的程序，即可分析雙方不同型式的原始數據，對於我國與荷蘭雙方於蝴蝶蘭 DNA 資料庫的技術合作案上，提供了更為有利與方便的工具。

本次研習為實際利用BioNumerics 7.1版軟體，進行雙方SSR-PCR資料(臺：10組引子組、ABI螢光分析系統；荷：8組引子組、LI-COR 螢光分析系統)的基因型分析(Genotyping)，由軟體操作的觀摩、演練與討論，以瞭解我方建立蝴蝶蘭DNA資料庫時需注意的參數設定、資料格式及未來雙方合作所需交換的資料內容等問題。在演練的過程中發現幾點需要注意的事項：

1. 由於軟體程式的設計，針對ABI分析系統的原始數據，在一開始輸入時的檔名格式需一致，以利進行軟體中” KEY” 跟” POOL” 的參數設定，在軟體中KEY是不可重複的，且因為分析時需建立不同實驗分析類型如：fingerprint type、character type等，這些分析類型在每次建立時皆須給予名稱。因此，為求未來資料庫中便於管理，KEY、POOL及分析類型的命名原則以越為簡潔越好。詳細的相關資料，皆可利用excel檔進行管理，再附加於分析資料的備註欄中，一同儲存於資料庫中即可。
2. 在分析的過程中可以設定軟體估算的精準度，例如在我方的ABI分析系統中是以GeneScan 500 LIZ (1~500 b.p)做為核酸長度標準品(size ladder)，且希望分析結果的差異性識別能達1 b.p以上，因此精準度設定應為 $1/500$ 為0.2% (如附圖二)。
3. 在先前的研習交流中的結果發現：以相同的SSR引子與相同的蝴蝶蘭材料進行SSR-PCR試驗後，同一組SSR分子標誌於LI-COR 4300與ABI PRISM 3730兩分析系統中，所得之對偶基因大小差異多為3-5bp。例如在相同蝴蝶蘭樣品其代號為stu的材料中，由V312這組SSR引子對進行分析後，在LI-COR系統所得之scoring數值為121,167；在ABI系統所得之scoring數值為117,162。造成兩系統分析所得之對偶基因的數值不同，但如果轉換成對偶基因碼(allele code)則會得到相同的品種鑑別結果。經過探討後發現這樣差異性的結果最可能的造成原因在於：不同系統所使用的核酸長度標準品不同，經過內差法計算後所造成的誤差。因此在進行基因型分析時，對於每組SSR primer所產生的識別條帶(marker allele)應該以代號標示較為適用於雙方蝴蝶蘭DNA資料庫(如附圖三)。

### 三、雙方技術合作細節討論

於101年度曾赴Naktuinbouw進行蝴蝶蘭品種分子鑑定技術研習與交流，在那次研習中對於Naktuinbouw蝴蝶蘭品種SSR分子檢測之流程，包括：蝴蝶蘭植株葉片採樣、蝴蝶蘭DNA萃取流程、SSR-PCR、LI-COR 4300電泳分析的過程皆有實際觀摩與操作過。而 Dr. Hedwich Teunissen和其助理 Mr. Daniel Deinum也在這兩次的雙方交流討論的過程中，對於我方所建立的蝴蝶蘭品種SSR分子檢測流程有所了解。因此，對於我們雙方技術合作的細節內容，在這樣彼此對彼此有一定程度的了解下，經過幾天的積極討論與交換相互意見(如附圖四右)，對於未來的雙方進行「交換蝴蝶蘭DNA材料與基因型分析資料」的工作上，在技術流程取得雙方共識並撰寫相關細節內容(如附件一)，其重點內容包括有：

1. 預計每年進行一次蝴蝶蘭DNA材料的交換，並於同一年度完成基因型分析並交換分析資料。
2. 交換的蝴蝶蘭DNA材料以僅以代號標示，其他有關品種的資訊需經行政機關及育種者同意後才能交換。
3. 蝴蝶蘭DNA材料及基因型分析資料以一定格式、容量、容器交換。
4. 雙方利用BioNumerics軟體進行基因型分析，並建立蝴蝶蘭DNA資料庫。
5. 雙方於分析結果出現鑑別差異時，需先經過討論，必要時須交換SSR引子重新分析確認。
6. 當發現交換的蝴蝶蘭DNA材料與現有蝴蝶蘭DNA資料庫資料出現100%一致時，發現方需通知另一方。

另外，本次也有機會可以和負責Variety Testing部門的Dr. Ettehoven, C. Kees，有關雙方蝴蝶蘭DNA資料庫的技術合作一事，針對Naktuinbouw的相關規劃與目標進行討論(如附圖四左)。Dr. Ettehoven, C. Kees提出幾點看法：

1. Naktuinbouw花了3-4年的時間建立蝴蝶蘭品種SSR分子鑑別技術與DNA資料庫，希望透過和臺灣的合作，使得DNA資料庫更為完善，並作為一個很好的篩選參考品種

資料庫，有助協助Naktuinbouw蝴蝶蘭性狀檢定工作。

2. 此次雙方技術合作應在取得品種權人同意的前提下，因此Naktuinbouw也能藉此瞭解品種權人對於利用DNA品種識別技術協助品種檢定作業的看法，及重新檢視品種檢定材料的使用規範。
3. 對於雙方交換DNA材料與基因型分析資料，也需獲得行政主管機關的同意，Naktuinbouw規劃在今年(103)年底完成育種者同意書的撰寫及取得CPVO及荷蘭政府的同意(CPVO對性狀檢定材料的使用規範如附件二)。
4. 對於雙方交換蝴蝶蘭DNA材料，Naktuinbouw預計以已取得品種權保護的荷蘭品種為交換目標。

## 肆、 檢討與建議

DNA 分子標誌可以輔助性狀檢定方法，提供分子層次上的鑑別依據。因此，開發具專一性及高鑑別力之 DNA 分子標誌系統，為目前的國際趨勢也為品種檢定專責單位所考量的。在本次的研習討論過程中，發現實際應用上仍有許多需進一步探討與解決的問題：包括侵權鑑定所提出報告內容、技術方法推動國際認證等相關問題。以及在臺荷雙方合作上的問題：包括取得行政主管機關及品種權者的授權、對於交換資料的保密性、未來雙方資料庫中其他資料是否能交流等。雖然以上的議題，在本次的研習期間，皆有提出與荷方技術人員進行討論，但是由於許多問題也是 Naktuinbouw 面臨到正陸續討論解決方法中；有的問題甚至是首次面對到，因此就目前雙方的經驗裡無法有明確且合適的答案。只能透過不斷與相關的技術人員、育種者及行政主管機關人員進行交流討論，彙整大家的意見後，才能有更進一步的應對提案。因此，對於未來我國在推動這項技術上提出幾點建議：

- (一)、加強技術人員的交流與溝通：因為蝴蝶蘭品種分子鑑別技術主要目的是輔助品種性狀檢定工作及提供侵權鑑定的分子依據，且透過到 Naktuinbouw 研習發現，執行蝴蝶蘭品種分子標誌分析的試驗工作的 Mr. Daniel Deinum 常常會與負責蝴蝶蘭性狀檢定工作的 Mr. Ing. Ruud Miedema 聯繫，除因應每年一月及八月申請蝴蝶蘭品種權的檢定材料取樣外，在於申請者對於對照品種的挑選是否合適、樣品進行分析比對後的結果、性狀檢定與分子鑑別結果具有差異等時，兩人也會對於雙方的檢定結果進行討論。因此未來將多和性狀檢定人員進行交流與溝通，以了解性狀檢定作業所需，而能實質發揮分子鑑別技術輔助性狀檢定工作的功效。
- (二)、整合蝴蝶蘭品種資料庫：目前，種苗場為了蝴蝶蘭品種性狀檢定工作，在建立蝴蝶蘭性狀資料庫及影像資料庫上花費許多心力，因此未來在蝴蝶蘭 DNA 資料庫逐漸建置後，可以進一步將 DNA 資料庫、性狀資料庫及影像資料庫進行連結，加強輔助蝴蝶蘭品種檢定工作，提升品種鑑定的效率。
- (三)、加強與育種者及業者的交流：這次研習期間剛好可以參加 Naktuinbouw 所

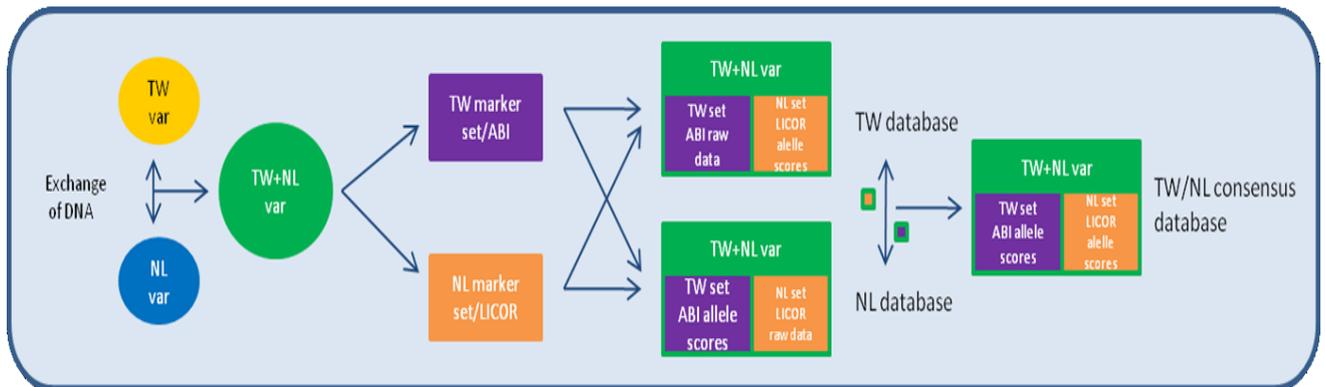
舉辦的育種者說明會，這是第一次 Naktuinbouw 針對性狀檢定材料後續使用在建立 DNA 資料庫及國際合作上所舉辦的說明會(如附圖五)。此說明會不僅僅只有荷蘭的育種者及業者參加，由於是視訊會議也讓其他國家的人透過連線可以一起參與。在這次說明會中總共有四個演講主題，分別是：

1. The role of the DUS sample during and after the DUS test.
2. The UPOV position on the use of molecular (DNA) techniques in the DUS process and the use of DNA techniques in the DUS procedure and in case of suspicion on infringement at Naktuinbouw.
3. The use of DNA and DNA data.
4. The importance of DNA techniques and availability of reference material in the fight against infringement on Plant Breeders' Rights.

從此會中的育種者或業者反應的意見發現，其所考量的與臺灣的育種者及業者相去不遠，提出的問題包括：關於自身權利的損失與否?DNA 分析資料的所有權?後續如果要使用這些 DNA 資料是否可行?等。從這些問題也提供了技術人員不同的思考層面，因此後續應加強與育種者及業者的交流，以完善相關作業流程的規劃及提升技術實際應用性。

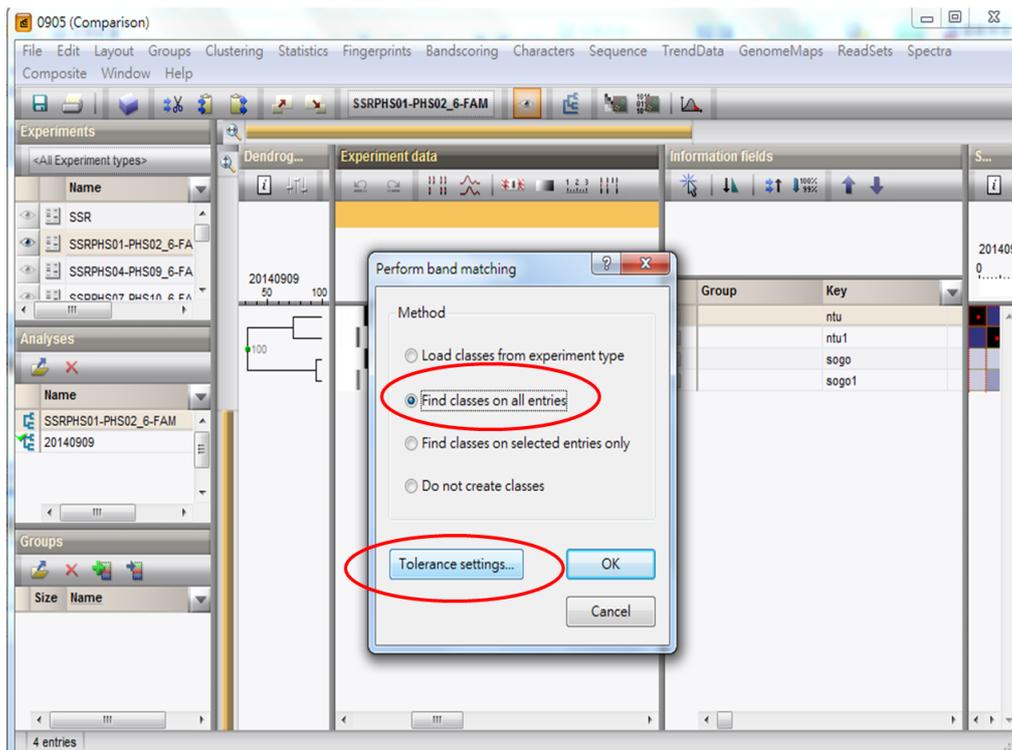
## 伍、 附圖

附圖一、 臺荷雙方合作模式：相同品種各自建立資料庫並調和資料格式進行多年期之合作



附圖二、 BioNumerics 軟體分析中的精準度設定

1. find classes on 可找到所有的band
2. tolerance setting 可設定找尋band的精準度





Microsoft Excel interface showing a spreadsheet with columns A through N and rows 1 through 26. The formula bar displays 'PhalaenopsisSSR@00001898'. The spreadsheet contains numerical data, with a red box highlighting the cells in columns L, M, and N for rows 6, 7, and 8.

|    | A                        | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     | K     | L     | M     | N     |
|----|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |                          | P23:X | P23:A | P23:U | P23:B | P23:C | P23:D | P23:V | P23:W | P23:E | P23:T | P23:F | P23:G | P23:H |
| 1  | PhalaenopsisSSR@00001898 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 2  | PhalaenopsisSSR@00002058 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 3  | PhalaenopsisSSR@00001892 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 4  | PhalaenopsisSSR@00002052 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 5  | PhalaenopsisSSR@00001891 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     |
| 6  | PhalaenopsisSSR@00002051 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 0     | 0     |
| 7  | PhalaenopsisSSR@00001901 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 8  | PhalaenopsisSSR@00002061 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 9  | PhalaenopsisSSR@00001900 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 10 | PhalaenopsisSSR@00002060 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 11 | PhalaenopsisSSR@00001899 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 12 | PhalaenopsisSSR@00002059 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 13 | PhalaenopsisSSR@00001905 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 14 | PhalaenopsisSSR@00002065 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 15 | PhalaenopsisSSR@00001906 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 16 | PhalaenopsisSSR@00002066 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 17 | PhalaenopsisSSR@00001904 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 18 | PhalaenopsisSSR@00002064 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     | 1     |
| 19 | PhalaenopsisSSR@00001896 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 20 | PhalaenopsisSSR@00002056 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 21 | PhalaenopsisSSR@00001894 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 22 | PhalaenopsisSSR@00002054 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 23 | PhalaenopsisSSR@00001897 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| 24 | PhalaenopsisSSR@00002057 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 25 | PhalaenopsisSSR@00001902 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 26 | PhalaenopsisSSR@00001902 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |

附圖四、與 Naktuinbouw 相關人員討論會後合照



附圖六、Ownership and use of DUS samples during and after the DUS test



## 陸、 附件

《附件一》

### **Proposal of the cooperation between TSIPS and Naktuinbouw**

After the well discussion between the experts of Taiwan TSIPS and the Netherlands Naktuinbouw, some proposals have been developed to shape exchanging works on use of DNA database as support to the DUS testing of *Phalaenopsis*.

**\*\*The DNA materials and genotyping data should be exchange based on standards of the document. (Agreement of cooperation between Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Council of Agriculture, Executive Yuan (TSIPS) and Naktuinbouw, The Netherlands)**

For DNA material exchange:

1. We agree to exchange the new varieties that are granted PBR (after the DUS trials are finished). There is a fixed moment per year (January) for the exchange of DNA.
2. The number of varieties that will be exchanged is dependent on the number of applicants. Since we aim for a database that is as complete as possible, it is inevitable to exchange all applicant varieties that are granted PBR. This number will vary every year and might be divergent between TW and NL.
3. Sampling two plants from each variety. We will initially use codes

- instead of the real name of the variety. This way we can provide unprejudiced and anonymous comparison of the DNA profiles. After approval of the variety owner, variety names can be exchanged as well.
4. We will use the CTAB DNA extraction method for *Phalaenopsis* DNA sample preparation is performed. (The CTAB DNA extraction methods on both sides are nearly identical. The differences have no influence on DNA quality.)
  5. The exchanged quantity of every sample is 25ul of original (non-diluted) DNA extraction solution. (Transportation on room temperature).
  6. Distribute the 25ul of DNA solution into 96 Micronic Plate. Every well/position consists of a small tube that can be sealed (and opened) individually (screw cap). One tube/well contains one sample.
  7. Sample related information shall be exchanged within excel files via e-mail.
  8. Advance notice through emails before sending DNA materials and after receiving the exchanged samples.

For genotyping data exchange:

1. Since both countries use their own marker sets and platform (LI-COR and ABI), each side shall be responsible and work independently on the genotyping work.
2. Using software BioNumerics to do allele scoring, and then export the results from BioNumerics as excel file. Alleles are scored in a binary way: present or absent (or uncertain for unclear result or missing data).
3. There will be one moment per year to exchange the genotype data from

all samples that have been exchanged in January.

4. The information in exchanged excel file should include: the sample name (the code), the name of markers/alleles, the scoring results (using “0” or “1” to represent) and others\*\*.  
(\* \* The others exchange information have to be agreed by the applicants, CPVO and the government on both sides.)

Others:

1. Both sides shall communicate through emails when analysis result of variety identification is different from one another. Marker sets shall be exchange and should only be used in *Phalaenopsis* variety identification when necessary (check for reproducibility or aberrant results).
2. When the genotyping result of the exchanged variety have a 100% match with a variety that already exists in DNA database, both sides shall give notice to each other via emails.



## CPVO Policy on the Status of Plant Material Used for DUS Testing Purposes

This aim of this document is to make transparent the policy of the CPVO concerning material sent for DUS testing in the framework of Community Plant Variety Right applications. It will also contribute to a coherent practise by all examination offices in the CPVO. This will permit breeders to make an informed decision before sending material for testing. It is not the competence of the CPVO to decide what examination offices may do in relation to material submitted in the framework of a national pvr application or for national listing purposes. Accordingly, the CPVO cannot assure breeders that the below policy has been applied when the CPVO takes over reports from tests which has been carried out or is in the process of being carried out. The CPVO would nevertheless urge examination offices to follow the same principles when testing varieties for purposes other than in the framework of Community Plant Variety Right applications.

The policy does not apply to any other examination offices other than examination offices entrusted by the Administrative Council of the CPVO for a certain species (hereinafter “EU Network Offices”). Accordingly, when the below mentioned policy refers to a transfer of material between two EU Network Offices, this relates only to material of species that the receiving EU Network Office is entrusted to test by the Administrative Council of the CPVO.

### 1. What should an EU Network Office do with plant material if the application is withdrawn or if it is rejected?

1.1 The EU Network Office should either destroy or send back the material to the applicant.

1.2 If the variety is of common knowledge, the EU Network Office may keep the material in its reference collection

### 2. May an EU Network Office send material

#### 2.1) To an EU Network Office

2.1.1 On request the EU Network Office should send material to another EU Network Office entrusted for the same species.

2.1.2 If the sample consists of parent lines or would disclose information on hybrid formulas, the EU Network Office should inform the person entitled that the material has been sent to another EU Network Office.



2.1.3 The EU Network Office shall not use sub-samples received from another EU Network Office for any other purposes than for DUS tests. The provisions on confidentiality and conflicts of interest in the Designation Agreement between the CPVO and the EU Network Office shall apply.

#### 2.2) *To an Other Examination Office*

2.2.1 The EU Network Office may send material to an Other Examination Office only if consent has been obtained from the person entitled. However, if the variety is being sold on the market, consent from the person entitled is not required

### 3. **What may the EU Examination Office do with material after the variety has been granted a Community pvr?**

3.1 If the EU Network Office does not keep a living reference collection the material shall be destroyed or sent back to the applicant.

3.2 If the EU Network Office keeps a living reference collection the material should be kept by the EU Network Office.

3.3 If the material is kept, the EU Network Office may, on request, transfer material to another EU Network Office or to an Other Examination Office on the same conditions as provided for in Section 2 above.

### 4. **After the Community Plant Variety Expires**

4.1 Material kept in a reference collection should be kept upon expiry of a Community plant variety right.



(資料來源：

[http://www.cpvo.europa.eu/documents/announcement/2012/CPVO\\_Policy\\_on\\_the\\_Status\\_of\\_Plant\\_Material\\_Used\\_for\\_DUS\\_Testing\\_Purposes.pdf](http://www.cpvo.europa.eu/documents/announcement/2012/CPVO_Policy_on_the_Status_of_Plant_Material_Used_for_DUS_Testing_Purposes.pdf) )