

DOI:10.11937/bfyy.201617046

分子标记在山葡萄品种鉴定上的应用现状

宋慧芳, 刘海双, 李昌禹, 艾军, 张庆田, 杨义明

(中国农业科学院 特产研究所, 吉林 长春 130112)

摘要:分子标记已在山葡萄资源鉴定中得到较为广泛的应用。现以山葡萄资源收集、保存、鉴定和利用现状的基础上,归纳、分析了分子标记在山葡萄品种鉴定上的应用现状,重点阐述了DNA条形码的分析过程,并指出已有分子标记技术在品种鉴定中的优势与不足,认为山葡萄资源鉴定应侧重于功能型分子标记,因此,提出将DNA条形码分子技术应用到山葡萄品种鉴定的重要性。

关键词:山葡萄;分子标记;DNA条形码

中图分类号:Q 946.3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)17-0188-05

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)为落叶藤本,起源于黑海和地中海沿岸,原产于中国东北、俄罗斯远东、朝鲜

第一作者简介:宋慧芳(1990-),女,内蒙古赤峰人,硕士研究生,研究方向为山葡萄资源与分子生物学。E-mail:810828520@qq.com.

责任作者:李昌禹(1971-),男,吉林人,硕士,副研究员,现主要从事特种作物育种与分子生物等研究工作。E-mail:lcy_lcy2002@163.com.

基金项目:农业部物种资源保护(农作物)资助项目(2015NWB043);国家现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-30-7)。

收稿日期:2016-04-21

半岛等区域。其植株可抵抗-40℃的低温,是抗寒育种研究的珍贵资源^[1-2]。俄罗斯保存近300份山葡萄种质资源^[3],我国国家果树种质左家山葡萄圃于1988年建成,圃中保存近400份种质资源^[4]。自1963年发现两性花品种“双庆”以来,以“双庆”作亲本进行种内杂交,先后选育出“双丰”“双优”“双红”等两性花品种^[5]。但越来越多品种的育种亲本都集中在少数优良品种上,这样使得选育出的新品种在植物学性状上存在相似性,而且随着育种研究的不断深入,同名异物、同物异名及品种杂乱的混淆现象频繁出现。因此,找出一种能够稳定、高效、准确的鉴定山葡萄品种方法非常重要。

[26] 关文强,陈丽,李喜宏.红富士苹果自发气调保鲜技术研究[J].农业工程学报,2004,20(5):218-221.

[27] 汪鲁聪,刘美华,张连文,等.果品物流运输包装件堆码性能的实验研究[J].包装工程,2012,33(19):11-14.

[28] 李春飞,卢立新,宋妹妹.缓冲包装结构对箱装苹果振动损伤与动力学特性的影响[J].食品与生物技术学报,2007,26(3):10-13.

[29] 王岭松,王东爱,杨贵娜,等.论冷链物流及其鲜活产品的绿色包装

[J].包装学报,2009,1(1):31-33.

[30] 刘文良,刘荣.新时期水果礼品包装设计的再思考[J].包装工程,2015,36(18):83-91.

[31] 王瑾瑜,赵强,刘波,等.果蔬纸在包装工业中的应用[J].中国包装工业,2015(7):56.

[32] 陈昌杰.降解塑料在包装方面的应用[J].上海塑料,2014(4):13-16.

[33] 洪泽雄.绿色食品包装材料的发展[J].轻工科技,2015(3):22-23.

Effect and Technical Requirement of Apple Packaging After Harvest

HOU Xueqian, ZHOU Huiling, JIANG Shuai, SHI Yali, TANG Yongping

(College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Apple is thought to be ‘a full range of healthy fruit’ due to its high nutritional value, the domestic demand and output of it shows a rising trend year by year. As one of the most value-added links in commercial production of fruit, packaging is important to improve the competitiveness of apple market. This paper started with the relationship between packaging and postharvest physiology and quality of apple, proposed the technical requirements of the packaging during storage, transportation and sales of apple, provided theoretical and technical reference to improve the level of postharvest commercialization, to reduce the loss after apple harvest, and to promote the development of apple industry.

Keywords: apple; packaging; preservation; technical requirements

多年来,山葡萄种质资源的鉴定都以形态学标记为主要依据,这种方法虽然简单、经济,但鉴定范围有一定的局限性,很多形态性状表现易受到季节变化、栽培管理方式、环境因子的影响。从遗传学角度分析,不同资源品种的表现型存在的差异实质上就是由基因型决定^[6],因此,通过分子标记技术在资源鉴定中的应用,可以弥补形态学鉴定的缺陷。目前已有的分子标记方法有同工酶标记、SRAP、RAPD、SSR、AFLP等,新的分子标记技术也在不断开发中,主要原因为准确鉴定资源品种越来越重要。例如:在新品种审定前都要进行品种鉴定,鉴定出品种的特异性;引进外来品种时必须进行快速的鉴定,确保新品种的性状特征;对于管理不严谨的苗木市场,以假乱真等现象的发生,伪劣苗木不仅给农民造成一定经济损失,还给花费几年到几十年的育种研究者造成无法弥补的损失,严重影响了山葡萄产业的发展。因此,能够有效且实用的鉴定山葡萄资源品种鉴定的分子标记技术是必要的。

1 分子标记技术在山葡萄资源上的应用现状

1.1 种质资源鉴定及遗传多样性分析

山葡萄资源丰富,在生产上主要采用扦插等无性繁殖方法进行扩繁,所以在市场中存在苗木混杂的现象。刘鑫铭^[7]和宪立杰^[8]在遗传物质的基础上利用DNA指纹图谱,通过反映生物个体差异的DNA电泳图谱进行资源鉴定。王军等^[9-10]利用改良CTAB法提取的DNA直接用于RAPD分析,首次利用RAPD技术对7份山葡萄种质进行鉴定。金炳奎等^[11]将6份山葡萄种质利用2对引物进行成功鉴定,并建立了SRAP技术体系。樊秀彩等^[12]利用SSR标记方法鉴定239株山葡萄与河岸葡萄的

杂交后代,其结果表明161株后代为真正的杂交种。

1.2 目标性状连锁基因标记

对山葡萄重要的性状相关连锁基因进行标记、定位,通过克隆测序转化为SCAR标记,可直接用于抗性鉴定等。张剑侠等^[13]利用RAPD技术发现了与山葡萄抗寒基因相连锁的分子标记S241-717和S238-854。王军等^[14]利用RAPD技术找到雄性山葡萄相关标记OPA18-700和山欧杂种后代果皮白色相关的标记OPY02-750。唐美玲^[15]利用AFLP技术,分别找到与山葡萄雄花相关的分子标记和与两性花相关的分子标记,并转化成SCAR标记对杂种后代进行性别鉴定。

1.3 分子遗传图谱的构建与QTL定位

山葡萄在分子标记辅助育种方面落后于其它植物资源。BLASI等^[16]利用6个RGA标记引物和22对SSR引物,分别对山葡萄231株自交后代构建遗传图谱,形成了19个连锁群,其中第14号上检测到抗霜霉病的主效QTL。刘镇东^[17]将SRAP与SSR2种分子标记相结合,分别构建了山葡萄品种“双优”和“北冰红”分子遗传图谱。

2 分子标记技术及其在山葡萄资源鉴定中的优势与不足

随着分子标记技术在山葡萄品种鉴定的不断改进和应用,越来越多的分子标记技术应用到山葡萄种质资源的鉴定中,虽然仍存在一些问题有待深入的研究^[18],但在对山葡萄资源鉴定和评价上也提供了科学依据。基于山葡萄品种鉴定技术对分子标记的要求以及分子标记方法本身的特点而对它们的优势和不足进行一定的总结,见表1。

表1 山葡萄资源鉴定中常用的分子标记方法的比较

Table 1 The comparison of molecular markers in identifying amur grape

分子标记类型 Molecular marker	多态性水平 Polymorphism level	DNA要求 DNA requirement	检测基因区域 Scan region	重复性 Repetitive	成本费用 Cost	参考文献 Reference
同工酶标记	高	低	单拷贝区	中等	高	[19]
RAPD	中等	中等	整个基因组	差	低	[9]
ISSR	中等	低	重复序列间隔区	中等	中等	[12]
AFLP	高	高	整个基因组	差	高	[15]
SRAP	高	低	基因编码区	中等	中等	[22]
SSR	中等	中等	重复序列	中等	高	[21]

2.1 分子标记技术及其在山葡萄资源鉴定中的优势

植物学研究最早的同工酶标记共显性可直接检测杂合子,晁无疾等^[19-20]对山葡萄种质进行了同工酶分析,指出每个种对于酶带数目及酶活性都有各自的特异性。基于PCR技术的RAPD、SSR、ISSR等分子标记技术操作简单、应用方便,RAPD技术虽然在稳定性和重

复性不够理想,但适当的增加引物长度是可以克服的。王军等^[9]用12个引物共扩增出74个位点,多态性达65%,但扩增结果的重复性和稳定性不足,对于杂合和纯合类不易区分。吴子龙等^[21]利用9对SSR引物,对8个山葡萄及山欧杂种进行区分。基于PCR和限制性酶切相结合的AFLP、SRAP等分子标记技术提供的大量

信息以及丰富的多态性,金炳奎等^[22]用 16 对引物扩增 6 个山葡萄品种,对扩增的 96 条条带进行分析,多态性达 67.71%。虽在分子标记研究中起到了非常重要的作用,但需要较高的试验技能和精密的仪器设备。

2.2 分子标记技术及其在山葡萄资源鉴定中的不足

虽然分子标记技术不断成熟,但在应用实践上仍存在一定的局限性,同工酶标记可分析的数量达 100 多种,由于环境和外界条件的影响限制了其应用。RAPD 技术在稳定性和重复性上不是很理想,AFLP 技术操作较繁杂,技术要求在实践应用上有一定的难度。SSR 是由几个碱基组成的串联重复的一般在 1 000 bp 以内的 DNA 序列,其检测的是单一的多等位基因位点^[18,23]。

综上,现有分子标记技术在山葡萄资源鉴定中的应用,在进行实践鉴定中都有着一定的局限性,基于分子水平上找到一种适合山葡萄种质资源鉴定的理想方法是至关重要的。

3 DNA 条形码技术在品种鉴定中的研究现状

DNA 条形码(DNA barcoding)是一种利用生物体内有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段,用来鉴定物种及研究物种间的遗传关系的分子标记技术,现已成功应用于生物物种间的快速鉴定研究^[24]、物种之间的分类研究^[25]、生态多样性调查研究^[26]、基础生态学研究^[27]等领域。

3.1 DNA 条形码的研究进展

加拿大奎尔夫大学动物学家 VALENTINI 等^[27]、HEBERT 等^[28-29]对动物界中 11 个门 13 320 个物种的 COI 基因序列进行研究,首次提出将线粒体 COI(细胞色素 C 氧化酶亚基基因)作为动物界中通用的 DNA 条形码标准序列。随后,世界各国都开始了 DNA 条形码的相关研究,我国学者陈士林等^[30]对 150 多个科的药用植物 DNA 条形码序列进行研究,并建立了药用植物 DNA 条形码鉴定技术体系,袁录霞^[31]利用 DNA 条形码技术对柿属植物的分类学地位、物种起源和种质进化进行研究,于杰^[32]从 9 个 DNA 序列中筛选出鉴定柑橘果树类的最佳 DNA 条形码序列,陈亚辉等^[33]利用 ITS、ITS2、psbA-trnH、matK 4 条序列分析不同品种美国山核桃的种间 K2P 遗传距离并构建了 NJ 树。

3.2 DNA 条形码在种质资源鉴定和新物种发现上的相对优势

DNA 条形码不受个体形态发育阶段的影响,植株的任何组织在任何发育时期均可用于分析^[34];DNA 条形码技术具有引物少、可重复、操作简单等优点,只需

1 对或几对通用引物就可以解决一个大的类群的鉴定^[32];A、T、G、C 核苷酸序列组成数字化的数据库加快对已知物种的识别速度,同时便于新物种的发现;DNA 条形码发展的方向是手机大小的便携式手持设备,完成样品的处理、扩增、测序和鉴定,这样可以极大地降低分类学对人力和财力的需求^[30];DNA 条形码序列存在共显性标记可鉴别纯合和杂合基因型,序列具有通用性可以在更大范围的类群中建立 DNA 条形码鉴定体系^[34]。

3.3 DNA 条形码序列筛选的研究

多位学者提出了一些植物 DNA 条形码候选序列以及不同的序列组合:nrITS 和 psbA-trnH^[35];rpoC1,rpoB,matK,rpoC1,matK,psbA-trnH^[36];rbcL^[37];psbA-trnH,rbcL^[38];matK,atpF-atpH,psbA-trnH,matK,atpF-atpH 和 psbK-psbI^[37];trnL^[39];matK^[40],但尚未达成一致意见^[38,41]。2009 年国际生命条形码联盟植物工作组(CBOL)对被子植物、裸子植物、藻类在内的 550 个物种的 rpoB、rpoC1,rbcL,matK,trnH-psbA,atpF-atpH 和 psbK-psbI 等 7 个叶绿体 DNA 片段进行研究,指出单序列、双序列和三序列组合分别可达到最高 69%、75%和 76%的鉴定能力,并提出 rbcL 和 matK 组合可以作为陆地植物的核心 DNA 条形码序列^[42]。CBOL PLANT WORKING GROUP^[43]对我国 75 科 141 属 1 757 种种子植物样本采用 rbcL、matK、trnH-psbA 和 ITS 4 个候选序列进行了研究,指出 ITS (ITS2) 可作为种子植物鉴定的核心条形码之一,则 trnH-psbA 获得的序列质量较低。第三届国际生命条形码大会上提出,将 ITS (包括 ITS2) 和 trnH-psbA 作为植物条形码的辅助条形码^[44]。陈士林等^[30]选用 7 条 DNA 候选序列对 6 000 多个样本在 PCR 扩增效率、种间种内变异差异、Barcoding gap、鉴定成功率等分析,指出植物 DNA 条形码通用引物序列及其反应条件(表 2)。

3.4 DNA 条形码数据分析的研究

DNA 条形码作为数字化的 DNA 序列信息,因其准确性、丰富性和可重复性已成为物种鉴定的有用工具,但是在序列分析上有一定的难度,例如:重建系统的进化关系‘Tree-Based Method’和计算遗传距离‘Distance-Based Method’,包括 p-distance、K2P distance 及其它计算序列的种内和种间距离,比较种内和种间相差的 barcoding gap 来评价能否成功对物种进行鉴定^[40,45],还可以基于 Blast 搜索算法‘BLAST-based method’,通过建立资源数据库确定阈值,通过比较建立的数据库中的 query 序列在数据库 Blast 中是否存在同样的序列,来判断能否成功鉴定^[46-47]。

表 2 植物 DNA 条形码通用引物序列

Table 2 The candidate loci of DNA barcodes and their primers

片段 Fragment	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequences of primer	反应条件 Conditions of reaction
BHITS2	2f	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,40 个循环,72 ℃ 10 min
	3r	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
	Fwd PA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	
psbA-trnH	Rev TH	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	95 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,30 个循环,72 ℃ 7 min
	309R	CGATCTATTCATTCAATATTC	
matK	1326F	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,26 个循环,72 ℃ 7 min
	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	
rbcL	724r	TCGCAITGTACCTGCAGTAGC	95 ℃ 2 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,34 个循环,72 ℃ 7 min
	5a fwd	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	
ITS	4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	95 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min+3 s/循环,25 个循环,72 ℃ 7 min

4 展望

近些年,DNA 条形码的应用虽然在动物鉴定上达到了理想的效果,但在植物鉴定方面仍在研究中,主要是应用生物信息技术的结果分析过程较难,但是 DNA 条形码技术较其它分子标记,在实践应用中有着操作简单、结果稳定等优势。随着山葡萄新品种的申请数量、选育品种数目的增多,品种保护和快速准确鉴定工作越来越重要,因此,亟需快速准确的新技术鉴定山葡萄种质资源。

应用于山葡萄资源鉴定的分子标记技术已经逐渐取代了以植物学为基础的形态学标记,同工酶、RAPD、SSR 等标记都存在着鉴定种类少、重复性差等不足,尤其在实践鉴定中缺乏快速、客观、重复鉴定的准确性。目前,DNA 条形码技术在药用植物芸香科、姜科、菊科等,木本植物柿属、柑橘、美国山核桃等优良品种的鉴定中得到成功应用。为了使 DNA 条形码技术应用于更多植物的品种鉴定,将鉴定序列上传到 GenBank 中,形成植物的 DNA 条形码序列分子身份证,DNA 条形码技术具备了其它分子标记所要达到的标记鉴定优势,所以在植物鉴定研究中具有广阔的发展前景。

参考文献

[1] 李晓艳,杨义明,范书田,等. 山葡萄种质资源收集,保存,评价与利用研究进展[J]. 河北林业科技,2014(5):115-121.
[2] 宋润刚,艾军,李晓红,等. 中国山葡萄产业的发展及对策[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2009(6):64-69.
[3] 刘闯萍,王军,沈育杰. 山葡萄资源性状评价[J]. 东北林业大学学报,2007,35(3):79-81.
[4] 沈育杰,赵淑兰,杨义明,等. 我国山葡萄种质资源研究与利用现状[J]. 特产研究,2006,28(3):53-57.
[5] 王军,宋润刚,尹立荣. 两性花山葡萄新品种-双丰[J]. 园艺学报,1996,23(2):207-207.
[6] HEBERT P D N,STOECKLE M Y,ZEMLAK T S,et al. Identification of bird through DNA barcodes[J]. Public Library of Science Biology, 2004, 2 (10):e312.

[7] 刘鑫铭. 葡萄种质表型遗传多样性分析及初级核心种质构建[D]. 洛阳:河南科技大学,2010.
[8] 宪立杰. 葡萄品种资源评价及 DNA 指纹图谱建立研究[D]. 保定:河北农业大学,2013.
[9] 王军,葛玉香,贺普超. RAPD 标记在山葡萄种质鉴定中的应用[J]. 植物研究,2004,24(4):473-476.
[10] 王军,贺普超. 山葡萄基因组 DNA 提取及 RAPD 鉴定[J]. 果树科学,2000,17(2):79-82.
[11] 金炳奎,宗成文,曹后男,等. 山葡萄 SRAP 技术体系的建立及其在品种鉴定中的应用[J]. 吉林农业大学学报,2013,35(2):198.
[12] 樊秀彩,张颖,姜建福,等. SSR 分子标记鉴定山葡萄和河岸葡萄种间杂种[J]. 西北植物学报,2012,32(11):2195-2200.
[13] 张剑侠,熊燕,王跃进,等. 中国野生葡萄抗寒基因 RAPD 标记及其序列分析[J]. 中国农学通报,2010,26(10):30-37.
[14] 王军,贺普超. 山葡萄种质资源研究与利用的历史回顾[C]//葡萄研究论文集,呼和浩特:内蒙古少年儿童出版社,2003.
[15] 唐美玲,孔瑾,许雪峰,等. 山葡萄性别相关 AFLP 标记筛选及 SCAR 标记转化[J]. 园艺学报,2008,35(2):195-200.
[16] BLASI P,BLANC S,WIEDEMANN-MERDINOGLU S,et al. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8,a locus conferring resistance to grapevine downy mildew[J]. Theoretical and Applied Genetics,2011,123(1):43-53.
[17] 刘镇东. 山葡萄高密度分子遗传图谱构建及抗寒性 QTL 定位研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.
[18] 朱旭东,上官凌飞,孙欣,等. DNA 标记在植物品种鉴定上的应用现状[J]. 中国农学通报,2014,30(30):234-240.
[19] 晁无疾,牛淑贞. 我国葡萄野生种质资源的同工酶研究初报[J]. 中国果树,1981(4):41-44.
[20] 晁无疾. 我国葡萄生产,科研发展现状[J]. 葡萄栽培与酿酒,1996 (1):1-7.
[21] 吴子龙,王军. 山葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析及核心种质初步构建[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2007.
[22] 金炳奎,宗成文,曹后男,等. 山葡萄 SRAP 技术体系的建立及其在品种鉴定中的应用[J]. 吉林农业大学学报,2013,35(2):198.
[23] 张庆田,范书田,杨义明,等. 山葡萄分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报,2013(12):1-5.
[24] LIU J I E,MOELLER M,GAO L M,et al. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the discovery of

cryptic species[J]. Molecular Ecology Resources, 2011, 11(1): 89-100.

[25] FU Y M, JIANG W M, FU C X. Identification of species within *Tetrastigma* (Miq.) Planch. (Vitaceae) based on DNA barcoding techniques[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 237-245.

[26] LAHAYE R, van de BANK M, BOGARIN D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(8): 2923-2928.

[27] VALENTINI A, POMPANON F, TABERLET P. DNA barcoding for ecologists[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2009, 24(2): 110-117.

[28] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, de WAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.

[29] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

[30] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.

[31] 袁录霞. 基于分子标记和 DNA 条形码的大别山特产柿种质的遗传多样性和系统发育学[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

[32] 于杰. 柑橘及其近缘属植物 DNA 条形码研制及其物种的鉴定研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.

[33] 陈亚辉, 朱海军, 生静雅, 等. DNA 条形码序列对不同品种美国山核桃的鉴定[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1445-1450.

[34] 刘震. 樟科和忍冬科的 DNA 条形码筛选研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.

[35] KRESS W J, WURDACK K J, ZIMMER E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374.

[36] CHASE M W, COWAN R S, HOLLINGSWORTH P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon, 2007, 56(2): 295-299.

[37] NEWMASER S G, FAZEKAS A J, RAGUPATHY S. DNA barcoding in land plants: Evaluation of rbcL in a multigene tiered approach[J]. Botany, 2006, 84(3): 335-341.

[38] KRESS W J, ERICKSON D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e508.

[39] TABERLET P, COISSAC E, POMPANON F, et al. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(3): e14-e14.

[40] LAHAYE R, van der BANK M, BOGARIN D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(8): 2923-2928.

[41] BARCODES P P. Wanted: a barcode for plants[J]. Science, 2007, 318(5848): 190.

[42] LI D Z, GAO L M, LI H T, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(49): 19641-19646.

[43] CBOL PLANT WORKING GROUP. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(31): 12794-12797.

[44] HOLLINGSWORTH P M, GRAHAM S W, LITTLE D P. Choosing and using a plant DNA barcode[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19254.

[45] ZHU Y J, YAO H. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, 45(3): 376-382.

[46] CHEN S, YAO H, HAN J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.

[47] WILL K W, RUBINOFF D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification[J]. Cladistics, 2004, 20(1): 47-55.

Progress on Cultivar Identification of Amur Grape Using Molecular Markers

SONG Huifang, LIU Haishuang, LI Changyu, AI Jun, ZHANG Qingtian, YANG Yiming

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112)

Abstract: Molecular markers are widely used in amur grape resources. The progress of cultivar identification of amur grape using molecular markers by basing on its collection, reservation, identification and utilize were summarized and analysed in this paper. Meanwhile, the process of DNA barcoding was analyzed, the advantages and disadvantages of the existing molecular markers identification techniques were expounded. Functional molecular marker were also considered as the important technology. As a result, it was very important to propose DNA barcoding in identifying.

Keywords: amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.); molecular markers; DNA barcoding