

· 综述 ·

ISSR 标记技术及其在药用植物遗传育种中的应用

王明明, 宋振巧, 王建华*

(山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:简单重复序列间扩增(ISSR)是在简单重复序列(SSR)基础上发展起来的一种新技术。该技术以锚定的微卫星 DNA 为引物, 对与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片断进行 PCR 扩增。ISSR 标记具有较长的引物序列, 退火温度高, 表现出较好的稳定性, 且结合位点丰富, 可以检测到基因组中多个位点的差异, 能够揭示出比限制性片段长度多态性(RFLP)、随机引物扩增多态 DNA(RAPD)、SSR 更多的多态性信息。对 ISSR 标记技术的原理、特点及其在药用植物种质鉴定、遗传多样性、居群遗传结构、进化与亲缘关系分析以及分子辅助育种等研究方面的应用进行了综述。

关键词:分子标记; ISSR; 药用植物; 遗传育种

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0134-04

Inter-simple sequence repeat and its application in medicinal plant genetic breeding

WANG Ming-ming, SONG Zhen-qiao, WANG Jian-hua

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Key words: molecular marker; ISSR; medicinal plant; genetic breeding

药用植物在人类疾病的防治以及天然药物的筛选中占有重要地位。我国地域辽阔, 药用植物资源丰富, 但是药用植物的基础研究一直比较薄弱, 尤其是遗传育种方面更为缺乏, 这在一定程度上限制了我国药用植物资源的深入开发和利用。在药用植物的研究利用过程中也存在一些问题, 如缺乏系统的整理和准确的鉴定, 导致中药材存在同物异名、同名异物的现象普遍存在, 市场上正品、伪品、替代品共存; 由于缺乏简便、有效的种质特性评价方法, 未能在种植中加以选优去劣, 导致多数药用植物种质混杂, 质量难以保证; 虽然有些大宗药材已实施 GAP 种植, 但优质高产品种仍十分匮乏。因此要取得药用植物研究特别是遗传育种方面的突破性进展, 高新技术的支持和应用是十分必要的。

借鉴大田作物的成功经验, 在加快药用植物遗传育种进程中, DNA 分子标记技术将起到关键作用。DNA 分子标记是指在 DNA 水平上, 以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记, 它能够直接反映基因组 DNA 间的差异。相比形态、细胞学、生化及同工酶等标记手段具有快速、微量、特异性强的特点; 不受生长发育阶段、供试部位、环境条件的影响, 特别适合中药正伪品鉴别、种质鉴定等方面的研究, 尤其是在种质资源遗传多样性评价、基因定位、分子标记辅助育种等方面显示出广阔的应用前景。

简单重复序列间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR)是一种新型的分子标记, 由加拿大蒙特利尔大学的

Zietkiewicz 等于 1994 年提出。它结合了随机引物扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)和简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记技术的优点, 与以往的分子标记相比, 能够提供更多的基因组 DNA 信息。现已广泛应用于药用植物种质资源鉴定、进化与亲缘关系分析、遗传多样性与居群遗传结构检测、遗传作图、基因定位、分子标记辅助育种等方面研究。

1 ISSR 标记的技术原理及特点

真核生物基因组中广泛存在着由 1~4 个碱基对组成的简单重复序列, 又称微卫星(microsatellite), 如 (AG)_n、(GACA)_n、(GT)_n 等。ISSR 分子标记就是用锚定的微卫星 DNA 为引物, 在 SSR 序列的 3' 或 5' 端加锚 2~4 个随机核苷酸, 在 PCR 反应中, 锚定引物可以引起特定位置退火, 导致锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片断进行 PCR 扩增。所扩增的 Inter-SSR 区域的多个条带可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳或者琼脂糖凝胶电泳得以分辨^[1]。

ISSR 标记技术试验操作简单、快速、高效, 不需要繁琐地进行基因文库构建、杂交和同位素显示等步骤; 重复序列和锚定碱基的选择是随机的, 无需知道任何靶标序列的 SSR 背景信息, 从而降低了技术难度和实验成本; 无需活材料, 无组织器官特异性, 能实现全基因组无编码取样; 采用了较长的引物 (15~24 bp), 退火温度较高, 因此, 引物具有更强的专一性, 增强了实现的可重复性。ISSR 标记的缺点就是, 在 PCR 扩增

收稿日期: 2006-05-12

作者简介: 王明明(1984—), 男, 山东省潍坊市人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源开发与分子生物学方面的研究。

* 通讯作者 王建华 Tel: (0538)8248076 E-mail: jhwangjh@163.com

时需要一定时间摸索最适反应条件;呈孟德尔式遗传,即显性遗传标记,不能区分显性纯合基因型和杂合基因型。

2 ISSR 标记技术在药用植物遗传育种中的应用

2.1 种质资源鉴定:药用植物种质资源的鉴定和评价对于育种亲本选择、丰富遗传基础以及种质资源合理利用开发等方面都是非常重要的。传统药用植物种质资源的鉴定评价方法依赖于宏观特征,如叶片形状等,但可用的形态性状少且受环境影响大,因此需要高效、准确、不受环境因素影响的鉴定技术。沈颖等^[2]使用 ISSR 标记技术对石斛属(*Dendrobium* Sw.) 9 种植物进行了石斛种间鉴别。沈永宝等^[3]通过 5 条 ISSR 引物产生的特异性片段就可鉴别出 13 个银杏 *Ginkgo biloba* L. 主要栽培品种。Kojoma 等^[4]利用 ISSR 引物可区分无法采用 HPLC 法区分的大麻 *Cannabis sativa* L. 2 个样品。Gardner 等^[5]使用 2 个 ISSR 引物可区分 32 个铁线莲属(*Clematis* L.) 蔓生栽培品种。周延清等^[6,7]用 RAPD 和 ISSR 技术对怀地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* (Chao et Schih) Hsiao 进行了种质分析。结果表明,ISSR 标记技术的多态性和重复性优于 RAPD 技术。因此 ISSR 技术是一种快速、准确可以产生足够多态位点的标记方法,且不受环境影响,可在分子水平进行种质资源鉴定、评价研究,从而为进一步加快育种进程提供了可能。

在遗传物质和生态因子长期作用下使药材产生“道地性”,如泰山的白首乌,然而道地药材的遗传学特征及“道地性”的本质至今尚无充分的科学证据。探索道地药材的遗传基因、揭示道地药材的本质是药用植物遗传育种研究的重要内容之一。目前对这方面的研究还较少。左云娟等^[8]采用 ISSR 分子标记技术结合实地形态观察的方法,鉴定道地药材江枳壳品种,而且指出同一产地同一品种的不同样品存在同名异物和同物异名现象。因此,对药用植物的道地品种种质资源的搜集鉴定、探索道地药材的遗传本质、选育优质高产新品种具有重要意义。长期以来,中药材缺乏系统的整理和准确的鉴定手段,市场上存在伪劣品并不鲜见,正伪品的鉴定方面,分子标记技术有其优越性。

2.2 检测遗传多样性和居群遗传结构:ISSR 技术在生物学中最主要的应用是分析和评估种群的遗传多样性。物种的遗传多样性是长期进化的结果,也是其生存和发展的前提。对物种遗传多样性和遗传结构的研究,是探讨其适应性、生存力的基础,也是分析濒危物种致濒机制的基础,从而帮助制定科学有效的保护策略和措施。由于 ISSR 技术能提供较大数目的 DNA 片段,可以扫描基因组内的多态位点,因而是一种用于分析物种、种群、不同品系,甚至是个体间遗传差异的理想方法。

Nan 等^[9]对来自 4 个自然居群和栽培材料的 60 个四季报春 *Primula obconica* Hance ssp. *obconica* 进行了 ISSR 遗传多样性分析,结果显示自然居群的遗传多样性高于栽培居群。Ge 等^[10]利用 ISSR 对穗花杉 *Amentotaxus argotaenia* (Hance) Pilger 的遗传多样性和居群遗传结构进行了分析。马永等^[11]利用 ISSR 技术对叉孢苏铁 *Cycas segmentifida* D.

Y. Wang et C. Y. Deng 遗传多样性进行研究,从 103 条引物中筛选出 12 条用于所有样品的扩增。结果表明,种级水平上,叉孢苏铁具有中等稍高的遗传多样性水平,且各居群间有着很高的遗传分化度。葛永奇等^[12]对 2 个栽培和 3 个野生银杏群体进行 ISSR 检测。结果表明,银杏具有丰富的遗传变异。邱英雄等^[13]对 7 个野生群体的明党参 *Changium smyrnioides* Wolff 和 1 个栽培群体的川明参 *Chuanminshen violaceum* Sheh et Shan 进行 ISSR 遗传多样性和遗传结构分析。结果表明,明党参群体水平的遗传多样性高于川明参群体,且遗传变异主要存在于不同群体间。

进一步通过相关分析、聚类分析等数量遗传分析可进行不同亲缘物种间的遗传聚类的划分,这种划分可反映出与地理分布的相关性,确定是否呈现一定的地域性,从而为这些物质的保护、可持续利用奠定理论基础。吴卫等^[14]使用 22 个 ISSR 引物检测了 70 份鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 种质资源遗传多样性。根据 ISSR 遗传相似系数划分的类群主要同染色体数目有关,也与地理分布有一定关系。张木清等^[15]采 ISSR 分子标记技术检测了 8 省区的 30 个斑茅 *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw., 根据研究结果进行聚类 and 主成分分析,可将 30 个斑茅无性系归为 4 大类,同一地区的斑茅无性系基本聚在同一类,呈现出一定的地域性分布规律。梁洪卉等^[16]利用形态性状和 ISSR 分子标记对冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的分析表明,青海省不同地区的冬虫夏草可分为环青海湖产区和其他产区两大类,说明青海省的冬虫夏草表现出明显的地域性分布。周俊亚^[17]和彭云滔^[18]分别对栽培罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 样品和野生罗汉果进行了遗传多样性分析,不同样品的遗传关系与产地有关,同一地区的关系较近,而不同地区的样品间差异明显。宾晓芸等^[19]对金花茶 *Camellia nitidissima* Chi 的研究也得出相同的结论,金花茶 4 个自然分布居群间的遗传距离与地理距离成显著的正相关。而 Jian 等^[20]应用 11 个 ISSR 引物研究了来自华南地区的 6 个自然种群的红植植物银叶树 *Heritiera littoralis* Dryand. 的遗传多样性表明,不同的生境(海生和陆生)并没有对银叶树的种群分化在基因水平上带来显著影响。Li 等^[21]对中国南方 7 个不同鸭舌草 *Monochoria vaginalis* (Burm. f.) Presl ex Kunth 居群进行 ISSR 分析认为居群间的遗传多样性与地理分布有较低的相关性。

在濒危、特有药用植物研究方面,ISSR 标记技术可以对物种濒危程度进行评价,从而有助于制定科学有效的保护策略和措施。杨淑达等^[22]应用 ISSR 标记分析了中国西南地区特有植物滇牡丹 *Paeonia delavayi* Franch.。结果表明,滇牡丹遗传多样性水平较高,居群间遗传分化大,滇牡丹并不濒危。李群等^[23]利用 ISSR 分子标记对四川濒危植物延龄草 *Trillium tschonoskii* Maxim. 7 个自然居群的遗传多样性水平和遗传结构进行了研究,与其他一些濒危植物相比,延龄草的遗传多样性较低。肖龙骞等^[24]利用 100 个 ISSR 引物中筛选出的 11 个能够扩增出清晰条带的引物对贵州苏铁

Cycas guizhouensis K. M. Lan et R. F. Zou 的 12 个自然居群的遗传分析表明, 贵州苏铁遗传多样性水平比较低。刘美华等^[25]通过 ISSR 标记技术对昆仓锦鸡儿 *Caragana polourensis* Franch. 及其近缘种吐鲁番锦鸡儿 *C. turfanensis* Kom. 遗传多样性进行检测, 与在相同生境中生长的濒危植物小沙冬青 *Ammopiptanthus nanus* Cheng f. 的遗传多样性作了比较。结果表明, 不同的遗传多样性水平可能是造成它们生长状态不同的主要原因之一。

2.3 药用植物进化与亲缘关系: ISSR 分子标记可从 DNA 水平有效揭示药用植物物种自然居群、品种中遗传结构的基因流动与演变等系统发育与亲缘关系的真实本质, 可真实地阐明生物的遗传背景差异、物种演化与亲缘关系。药用植物进化与亲缘关系是遗传育种研究的重要内容, 决定了这些种质在今后育种实践中的有效利用, 为药用植物的开发利用提供真实的生物学依据。

Huang 等^[26]采用 ISSR 分子标记研究了番薯属 (*Ipomoea* L.) 植物的亲缘关系, 发现三浅裂野牵牛 *I. trifida* (H. B. K.) G. Don 与常见栽培植物甘薯 *I. batatas* (L.) Lam. 最为接近, 而 *I. ramosissima* (Poir.) Choisy 和 *I. umbraticol* House 与常见栽培甘薯亲缘关系最远。Sun 等^[27]利用 ISSR 标记技术分析了来自中国 and 美国的野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi、食用葛 *P. edulis* Pamp.、山葛 *P. montana* (Lour.) Merr.、三裂叶葛藤 *P. phaseoloides* (Roxb.) Benth.、粉葛 *P. thomsoni* Benth. 的亲缘关系, 与其他同属植物相比, 来自美国 and 中国的野葛样品具有较近的亲缘关系。曹雅男等^[28]利用 RAPD 和 ISSR 方法对 4 种正品龙胆亲缘关系进行分析表明, 坚龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. 与三花龙胆 *G. triflora* Pall.、龙胆 *G. scabra* Bunge、条叶龙胆 *G. manshurica* Kitag. 的遗传距离较远; 而三花龙胆和龙胆亲缘关系较近。汪岚等^[29]使用 7 个 ISSR 引物对 12 个莲藕品种进行分析, 将其分为美洲莲、亚洲莲与亚洲莲的杂交后代和亚洲莲 3 个大类; 与以前的 RAPD 研究不同, 中国莲与日本莲有很近的亲缘关系。

2.4 基因定位与分子标记辅助育种: 育种目的在于实现现有品种改良, 品种改良的实质就是对目的基因进行选择并实现优异基因集成的过程。因而, 实现目的基因的快速定位, 提高其选择效率, 是加快育种进程的关键。基因定位就是筛选与目的基因连锁的遗传标记。分子标记相对于形态标记具有无可比拟的优越性, 在育种中的应用日益增加。Ratnaparkhe 等^[30]利用 ISSR 引物定位鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. 中抗镰刀菌萎蔫病基因, 结果发现 UBC-855500 和 UBC-8251200 与该抗病基因连锁, 遗传距离分别为 5.2 cM (centimorgans) 和 5.0 cM, 并将其转化为序列特征化扩增区域 (sequence characterised amplified region, SCAR) 标记。利用分子标记可以在育种过程中进行亲本性状的鉴定、检测, 辅助选择亲本及子代, 加速品种的培育, 缩短育种周期。

遗传连锁图谱是随着各类分子标记的发展而形成的, 有着极其重要的意义, 可用来定位和标记目标基因, 推动标记

辅助育种在生产中的应用。同时它也利用图谱克隆重要基因, 是揭示多基因性状遗传基础的重要工具。遗传连锁图谱研究的目的是寻找足够的多态分子标记, 将所有基因定位到特定染色体的特定区域, 最好是在染色体步查距离内。因为 ISSR 能够揭示高度多态性, 遍布于整个染色体上, 所以它是绘制遗传连锁图的理想标记。Winter 等^[31]构建了一个 354 个标记包括 37 个 ISSR 标记的完整的鹰嘴豆抗镰刀菌萎蔫病基因分子图谱, 该图谱总长 2 077.9 cM, 平均图距为 6.8 cM。Santra 等利用 *C. arietinum* (FLIP84-92C, 抗病亲本) × *C. reticulatum* (PI 599072, 感病亲本), 获得 F5 和 F6 的重组自交系群体, 通过 RAPD-ISSR 和同工酶引物对该群体进行扩增, 建立了一个总长为 981.6 cM, 平均图距为 8.4 cM 的抗壳二孢叶枯病分子图谱。

3 展望

ISSR 标记技术在药用植物遗传育种中发挥了重要作用。当然 ISSR 标记亦存在一些缺点, 限制了其在某些方面的应用。目前 ISSR 技术主要应用于农作物、果树、林木、花卉、草坪等方面的研究, 在药用植物方面的应用虽已有一些报道, 但相对较少。ISSR 标记以其多态性高、可重复性强、简便快速等优势, 必将使其在药用植物“道地性”基因定位、道地药材机制、中药品质与标准化、濒危珍稀动植物保护与利用、中药化学型 (有效成分) 与基因型相关性分析等方面发挥更大的作用。

References:

- [1] Zhou Y Q. Application of DNA Molecular Markers Technique to Plant Research (DNA 分子标记技术在植物研究中的应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [2] Shen Y, Xu C, Wan X F, et al. Application of ISSR-PCR to identification of different *Dendrobium* Sw. species [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 423-427.
- [3] Shen Y B, Shi J S, Zhao H L. Identification on the main cultivated varieties of *Ginkgo biloba* using ISSR DNA marker [J]. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2005, 41(1): 202-204.
- [4] Kojima M, Iida O, Makino Y, et al. DNA Fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Planta Med*, 2002, 68: 60-63.
- [5] Gardner N, Hokanson S C. Inter-simple sequence repeat fingerprinting and genetic variation in a collection of *Clematis* cultivars and commercial germplasm [J]. *Hort Sci*, 2005, 40(7): 1982-1987.
- [6] Zhou Y Q, Jiang J Z, Li Z Y, et al. Assessment of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* germplasm detected by RAPDs and ISSRs [J]. *Heredita* (遗传), 2004, 26(6): 922-928.
- [7] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. ISSR Identification of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* in Huai zone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 257-261.
- [8] Zuo Y J, Zhu P L, Liu Q, et al. Genetic relationships among *Fructus Aurantii* cultivars revealed by ISSR [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(18): 1416-1419.
- [9] Nan P, Shi S H, Peng S L, et al. Genetic diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from central and south-west China as revealed by ISSR markers [J]. *Ann Bot*, 2003, 91(3): 329-333.
- [10] Ge X J, Zhou X L, Li Z C, et al. Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting [J]. *J Plant Res*, 2005, 118(6): 415-422.
- [11] Ma Y, Li N, Zhong Y C, et al. Optimization and preliminary application of ISSR-PCR amplification for *Cycas segmentifida* [J]. *Subtrop-Plant Sci* (亚热带植物科学), 2005, 34(1):

- 10-13.
- [12] Ge Y Q, Qiu Y X, Ding B Y, et al. An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant *Ginkgo biloba* [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), 2003, 11(4): 276-287.
- [13] Qiu Y X, Fu C X, Wu F J. Analysis of population genetic structure and molecular identification of *Changium smyrnioides* and *Chuanminshen violaceum* with ISSR marker [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 598-603.
- [14] Wu W, Zheng Y L, Chen L, et al. Analysis on genetic diversity of germplasm resources of *Cordate Houttuynia* by ISSR marker [J]. *World Sci Technol: Modern Tradit Chin Med* (世界科学技术: 中医药现代化), 2003, 5(1): 70-77.
- [15] Zhang M Q, Hong Y X, Li Q W, et al. Molecular polymorphic analyses for the germplasms of *Erianthus arundinaceus* collected in China [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2004, 13(1): 1-6.
- [16] Liang H H, Cheng Z, Yang X L, et al. Genetic variation and affinity of *Cordyceps sinensis* in Qinghai Province based on analysis of morphologic characters and inter-simple sequence repeat markers [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1859-1864.
- [17] Zhou J Y, Tang S Q, Xiang W S, et al. Genetic diversity of cultivated Luohanguo (*Siratia grosvenorii*) based on ISSR marker [J]. *Guihai* (广西植物), 2005, 25(5): 431-436.
- [18] Peng Y T, Tang S Q, Li B L, et al. Genetic diversity of *Siratia grosvenorii* detected by ISSR marker [J]. *Biodiv Sci* (生物多样性), 2005, 13(1): 36-42.
- [19] Bin X Y, Tang S Q, Zhou J Y, et al. ISSR Analysis on genetic diversity of *Camellia nitidissima* Chi (Theaceae) in China [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2005, 23(1): 20-26.
- [20] Jian S G, Shi S H, Zhong Y, et al. Genetic diversity among south China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. *J Genet Mol Biol*, 2002, 13(4): 272-276.
- [21] Li W G, Shen J J, Wang J B. Genetic diversity of the annual weed *Monochoria vaginalis* in southern China detected by random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat analysis [J]. *Weed Res*, 2005, 45(6): 424-430.
- [22] Yang S D, Shi S H, Gong X, et al. Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs [J]. *Biodivers Sci* (生物多样性), 2005, 13(2): 105-111.
- [23] Li Q, Xiao M, Guo L, et al. Genetic diversity of the rare and endangered plant *Trillium tschonoskii* in Sichuan Province [J]. *J Beijing Fores Univ* (北京林业大学学报), 2005, 27(4): 1-6.
- [24] Xiao L Q, Ge X J, Gong X, et al. Genetic diversity of *Cycas guizhouensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2003, 25(6): 648-652.
- [25] Liu M H, Li Z C, Chen H S, et al. Genetic variation of *Caragana polourensis* (Leguminosae) [J]. *Guihaia* (广西植物), 2005, 25(1): 53-57.
- [26] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationship of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea series* Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050-1060.
- [27] Sun J H, Li Z C, Jewett D K, et al. Genetic diversity of *Pueraria lobata* (Kudzu) and closely related taxa as revealed by inter-simple sequence repeat analysis [J]. *Weed Res*, 2005, 45(4): 255-260.
- [28] Cao Y N, Li Q Z, Sun Y, et al. Analysis of genetic diversity in certified *Radix Gentianae* by RAPD and ISSR [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 100-103.
- [29] Wang L, Han Y C, Peng Y L, et al. Application of ISSR technique to genetic research of lotus root [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 2004, 26(3): 20-22.
- [30] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97(4): 515-519.
- [31] Winter P, Benko-Iseppon A M, Huttel B, et al. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross; localization of resistance genes for Fusarium wilt races 4 and 5 [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101(7): 1155-1163.

中药在美国的专利保护分析

杨莉, 李野

(沈阳药科大学工商管理学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 中药由于有效成分不清楚, 作用复杂等原因, 长期以来一直被认为是很难获得西方专利制度的保护。通过检索美国专利全文数据库, 分析了从 1977 年到 2006 年近 30 年来, 美国对中药的专利保护情况及特点, 得出中药能够在美国获得有效的专利保护的结论, 并为了解美国中药专利保护情况提供参考。同时, 在美国很大一部分中药专利是由美国和日本等发达国家获得的现状也引发思考, 作为中药的起源地, 我国应该如何更好地保护并利用中药文化遗产。

关键词: 中药; 专利; 美国

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)01-0137-04

Analysis of patent protection of Chinese materia medica in USA

YANG Li, LI Ye

(College of Business Administration, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Key words: Chinese materia medica (CMM); patent; USA

收稿日期: 2006-04-13

作者简介: 杨莉 (1981—), 女, 博士研究生, 主要从事药品知识产权保护方面的研究。

Tel: 13889355679 E-mail: yanglishanxi@126.com

作者: [王明明](#), [宋振巧](#), [王建华](#), [WANG Ming-ming](#), [SONG Zhen-qiao](#), [WANG Jian-hua](#)
 作者单位: [山东农业大学农学院](#), 山东, 泰安, 271018
 刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
 英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
 年, 卷(期): 2007, 38(1)
 被引用次数: 14次

参考文献(31条)

- [Zhou Y Q DNA分子标记技术在植物研究中的应用](#) 2005
- [Shen Y;Xu C;Wan X F Application of ISSR-PCR to identification of different Dendrobium Sw.species \[期刊论文\]-中草药](#) 2005(03)
- [Shen Y B;Shi J S;Zhao H L Identification on the main cultivated varieties of Ginkgo biloba using ISSR DNA marker\[期刊论文\]-林业科学](#) 2005(01)
- [Kojoma M;Iida O;Makino Y DNA Fingerprinting of Cannabis sativa using inter-simple sequence repeat \(ISSR\)amplification\[外文期刊\]](#) 2002(1)
- [Gardner N;Hokanson S C Inter-simple sequence repeat fingerprinting and genetic variation in a collection of Clematis cultivars and commercial germplasm](#) 2005(07)
- [Zhou Y Q;Jiang J Z;Li Z Y Assessment of genetic diversity of Rehmannia glutinosa germplasm detected by RAPDs and ISSRs\[期刊论文\]-遗传](#) 2004(06)
- [Zhou Y Q;Jing J Z;Li Z Y ISSR Identification of genetic diversity of Rehmannia glutinosa in Huai zone\[期刊论文\]-中草药](#) 2005(02)
- [Zuo Y J;Zhu P L;Liu Q Genetic relationships among Fructus Aurantii cultivars revealed by ISSR\[期刊论文\]-中国中药杂志](#) 2005(18)
- [Nan P;Shi S H;Peng S L Genetic diversity in Primula obconica \(Primulaceae\) from central and south-west China as revealed by ISSR markers\[外文期刊\]](#) 2003(03)
- [Ge X J;Zhou X L;Li Z C Low genetic diversity and singificant population structuring in the relict Amentotaxus argotaenia complex \(Taxaceae\) based on ISSR fingerprinting\[外文期刊\]](#) 2005(06)
- [Ma Y;Li N;Zhong Y C Optimization and preliminary application of ISSR-PCR amplification for Cycas segmentifida\[期刊论文\]-亚热带植物科学](#) 2005(01)
- [Ge YQ;Qiu Y X;Ding B Y An ISSR analysis on population genetic diversity of the relict plant Ginkgo biloba\[期刊论文\]-生物多样性](#) 2003(04)
- [Qiu Y X;Fu C X;Wu F J Analysis of population genetic structure and molecular identification of Changium smyrnioides and Chuanminshen violaceum with ISSR marker\[期刊论文\]-中国中药杂志](#) 2003(07)
- [Wu W;Zheng Y L;Chen L Analysis on genetic diveristy of germplasm resources of Cordate Houttuynia by ISSR marker\[期刊论文\]-世界科学技术-中医药现代化](#) 2003(01)
- [Zhang M Q;Hong Y X;Li Q W Molecular polymorphic analyses for the germplasms of Erianthus arundinaceus collected in China\[期刊论文\]-植物资源与环境学报](#) 2004(01)
- [Liang H H;Cheng Z;Yang X L Genetic variation and aiffinity of Cordyceps sinensis in Qinghai Province based on analysis of morphologic characters and inter-simple sequence repeat markers\[期刊论文\]](#)

文]-[中草药](#) 2005(12)

17. [Zhou J Y;Tang S Q;Xiang W S](#) [Genetic diversity of cultivated Luohanguo \(*Siratia grosvenorii*\) based on ISSR marker](#)[期刊论文]-[广西植物](#) 2005(05)
18. [Peng Y T;Tang S Q;Li B L](#) [Genetic diversity of *Siratia grosvenorii* detected by ISSR marker](#)[期刊论文]-[生物多样性](#) 2005(01)
19. [Bin X Y;Tang S Q;Zhou J Y](#) [ISSR Analysis on genetic diversity of *Camellia nitidissima* Chi \(Theaceae\) in China](#)[期刊论文]-[武汉植物学研究](#) 2005(01)
20. [Jian S G;Shi S H;Zhong Y](#) [Genetic diversify among south China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats \(ISSR\) analysis](#) 2002(04)
21. [Li W G;Shen J J;Wang J B](#) [Genetic diversity of the annual weed *Monochoria vaginalis* in southern China detected by random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat analysis](#)[外文期刊] 2005(06)
22. [Yang S D;Shi S H;Gong X](#) [Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs](#)[期刊论文]-[生物多样性](#) 2005(02)
23. [Li Q;Xiao M;Guo L](#) [Genetic diversity of the rare and endangered plant *Trillium tschonoskii* in Sichuan Province](#)[期刊论文]-[北京林业大学学报](#) 2005(04)
24. [Xiao L Q;Ge X J;Gong X](#) [Genetic diversity of *Cycas guiahouens*](#)[期刊论文]-[云南植物研究](#) 2003(06)
25. [Liu M H;Li Z C;Chen H S](#) [Genetic variation of *Caragana polourensis* \(Leguminosae\)](#)[期刊论文]-[广西植物](#) 2005(01)
26. [Huang J C;Sun M](#) [Genetic diversity and relationship of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas*\(Convolvulaceae\) as revealed by inter-simple sequence repeat \(ISSR\) and restriction analysis of chloroplast DNA](#)[外文期刊] 2000(7)
27. [Sun J H;Li Z C;Jewett D K](#) [Genetic diversity of *Pueraria lobata* \(Kudzu\) and closely related taxa as revealed by inter-simple sequence repeat analysis](#)[外文期刊] 2005(04)
28. [Cao Y N;Li Q Z;Sun Y](#) [Analysis of genetic diversity in certified *Radix Gentianae* by RAPD and ISSR](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2005(01)
29. [Wang L;Han Y C;Peng Y L](#) [Application of ISSR technique to genetic research of lotus root](#)[期刊论文]-[氨基酸和生物资源](#) 2004(03)
30. [Ratnaparkhe M B;Tekeoglu M;Muehlbauer F J](#) [Intersimple-sequence-repeat \(ISSR\) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters](#)[外文期刊] 1998(04)
31. [Winter P;Benko-Iseppon A M;Huttel B A](#) [A linkage map of the chickpea \(*Cicer arietinum* L.\) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum*×*C. reticulatum* cross:localization of resistance genes for *Fusarium* wilt races 4 and 5](#)[外文期刊] 2000(07)

本文读者也读过(1条)

1. [侯娅丽, 刘文忠](#) [ISSR分子标记及其在动物遗传育种中的应用](#)[期刊论文]-[上海畜牧兽医通讯](#)2004(4)

引证文献(14条)

1. 常楚瑞, 王晓丽. 脱氧核糖核酸分子标记在天麻辅助育种研究中的应用[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2012(4)
2. 周洁, 王忠华. 浙贝母遗传多样性的ISSR分析[期刊论文]-[浙江农业科学](#) 2012(2)
3. 张艳玲, 孙万慧, 胡孔峰, 尹健, 夏至, 高致明. 猫爪草遗传多样性的ISSR分析[期刊论文]-[河南农业科学](#) 2010(9)
4. 冉茂权, 张强, 崔清梅, 侯伟华, 李卫东, 梁金波. 恩施州茶树地方种质资源的收集整理[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2012(35)
5. 汤晓闯, 王晓慧, 梁广, 姜程曦, 肖健, 李校堃. 温郁金ISSR-PCR反应体系的建立及条件优化[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2008(22)
6. 聂莼, 陈少容, 梁晓乐, 辛宁. 药用银花的品种遗传多样性鉴别方法研究进展[期刊论文]-[广西中医学院学报](#) 2011(1)
7. 王志清, 王英平, 郭靖, 赵亚会, 李昌禹, 田丽. “福星01”人参与黄果人参与人参农家类型的ISSR、RAMP分析[期刊论文]-[吉林农业大学学报](#) 2010(3)
8. 王馨, 鸭乔, 杨熊明, 晏朴华, 李林玉, 董志渊, 李绍平. 2个灯盏细辛新品种的选育[期刊论文]-[中草药](#) 2013(13)
9. 薛艺敏, 何天友, 黄宇, 荣俊冬, 陈礼光, 郑郁善. 九节茶种质遗传多样性ISSR分析[期刊论文]-[农学学报](#) 2011(12)
10. 李婷, 林文津, 徐榕青, 张亚敏. ISSR技术在药用植物种质研究中的应用[期刊论文]-[中国民族民间医药](#) 2010(1)
11. 周轩. 油橄榄种质资源分类及品种鉴定研究进展[期刊论文]-[生命科学仪器](#) 2009(6)
12. 刘明言, 张慧慧. 中药生产工艺、单元操作、传递及过程工程学[期刊论文]-[中草药](#) 2011(4)
13. 卜静, 王冬梅, 李登武. 不同产地野生玉竹种质资源多样性与亲缘关系的ISSR分析[期刊论文]-[中草药](#) 2012(9)
14. 陈晓斌, 邹冬梅, 田维敏, 蒋昌顺. 应用ISSR标记分析12份臂形草种质的遗传差异[期刊论文]-[热带作物学报](#) 2008(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200701046.aspx