

# 基于 ITS2 序列及其二级结构对防己及其混伪品的鉴定

杨美青\*, 杜燕

(内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古包头 014040)

**[摘要]** 目的:利用核糖体 DNA 第 2 内部转录间隔区(ITS2)及其二级结构对传统中药材防己及其混伪品进行分子鉴定及聚类分析。方法:从 GenBank 上下载 36 条防己及其混伪品的 ITS 序列,利用 Geneious R11.0.3 进行序列比对,运用 MEGA 7.0 计算种内、种间 K2P 遗传距离,构建邻接(NJ)系统进化树,同时利用 ITS2 数据库在线软件预测各样本的二级结构,并利用 4Sale 软件进行二级结构的比对,最终运用 ProfDistS 软件基于距离法构建了 PNJ 进化树。结果:各种间平均遗传距离均远大于种内平均遗传距离,NJ 树显示防己及其混伪品聚为 6 个分支;混伪品与正品的二级结构均有一定的差异;PNJ 进化树比 NJ 树显示出更多的分支和更高的分辨率。结论:虽然 ITS2 可以作为防己及其混伪品的 DNA 条形码,但是若包含 ITS2 二级结构所蕴含的系统发育信息,鉴定结果更加精准。

**[关键词]** 防己; 二级结构; DNA 条形码; 分子鉴定

**[中图分类号]** R282.5; R282.7; Q942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0043-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180947

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180227.1443.006.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-27 17:31

## Identification of *Stephaniae Tetrandrae Radix* and Its Adulterants Based on ITS2 and Its Secondary Structure

YANG Mei-qing\*, DU Yan

(Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify *Stephaniae Tetrandrae Radix* and its adulterants based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) and its secondary structure. **Method:** Total 36 ITS sequences were downloaded from GenBank and aligned by Geneious R11.0.3. The intraspecific and interspecific K2P genetic distance was calculated by MEGA 7.0, and the neighbor joining (NJ) phylogenetic tree was built by the same software. Simultaneously, the secondary structure of each sample was predicted by the ITS2 Database online software and aligned by 4sale software. Finally, ProfDistS software was used to construct the profile neighbor-joining (PNJ) phylogenetic tree based on the distance method. **Result:** The average interspecific genetic distance was far greater than the average intraspecific genetic distance. NJ tree showed that *Stephaniae Tetrandrae Radix* and its adulterants were clustered into 6 branches; both *Stephaniae Tetrandrae Radix* and its adulterants had different secondary structures. The PNJ tree showed more branches and higher resolution than NJ tree. **Conclusion:** ITS2 can be used as a DNA barcode for distinguishing *Stephaniae Tetrandrae Radix* from its adulterants, but the identification results would be more accurate when considering the phylogenetic information contained in ITS2 secondary structure.

**[Key words]** *Stephaniae Tetrandrae Radix*; secondary structure; DNA barcoding; molecular identification

**[收稿日期]** 20171221(015)

**[基金项目]** 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY16214);包头医学院博士科研启动基金项目(BSJJ201622)

**[通信作者]** \*杨美青,博士,讲师,从事药用植物分子系统学与基因组学方向研究,E-mail: ymq40021011@163.com

防己正品为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* 的干燥根,功能祛风除湿、利尿通淋,含多种生物碱,其中粉防己碱(特船君, *tetrandrine*) 治风湿关节炎和高血压症均有效<sup>[1]</sup>。目前市场上出现了较多常见混伪品,经文献调研和市场调研,主要涉及 5 目(胡椒目、毛茛目、石竹目、无患子目、葫芦目),7 科(木通科、马兜铃科、毛茛科、防己科、石竹科、茶茱萸科和葫芦科),11 属(木通属、马兜铃属、铁线莲属、防己属、轮环藤属、秤钩风属、丝石竹属、微花藤属、风龙属、千金藤属和栝楼属),18 种基原植物,分别为洛防己(木通科植物三叶木通 *Akebia trifoliata* 的干燥根),大叶马兜铃(马兜铃科植物大叶马兜铃 *Aristolochia kaempferi* 的干燥根或根茎),川防己/宜宾防己(马兜铃科植物广西马兜铃 *A. kwangsiensis* 的干燥根或根茎),广防己(马兜铃科植物广防己 *A. fangchi* 的干燥根),汉中防己(马兜铃科植物异叶马兜铃 *A. kaempferi heterophylla* 的干燥根),冕宁防己(马兜铃科植物穆坪马兜铃 *A. moupinensis* 的干燥根),耳叶马兜铃(马兜铃科植物耳叶马兜铃 *A. tagala* 的干燥根),拐子药(毛茛科植物单叶铁线莲 *Clematis henryi* 的干燥根),木防己(防己科植物木防己 *Cocculus orbiculatus* 的干燥根),平昌防己(防己科植物轮环藤 *Cyclea racemosa* 的干燥根),湘防己(防己科植物秤钩风 *Diploclisia affinis* 的干燥根),丝石竹(石竹科植物长蕊石头花 *Gypsophila oldhamiana* 的干燥根),瘤枝微花藤(茶茱萸科植物瘤枝微花藤 *Iodes seguinii* 的干燥根),小果微花藤(茶茱萸科植物小果微花藤 *I. vitiginea* 的干燥根),青藤(防己科 *Sinomenium acutum* 植物青藤的干燥藤茎),头花千金藤(防己科植物头花千金藤 *Stephania cephalantha* 的干燥根),江南地不容(防己科植物江南地不容 *S. excentrica* 的干燥根),天花粉(葫芦科植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 的干燥根)<sup>[2-5]</sup>。这些药材与正品防己的功效主治相差很大,甚至有的混伪品具有一定的毒性,如马兜铃科的混伪品含马兜铃酸,有肾毒性,因此不能作为代用品。前人对于这些混伪品的研究大都集中在性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别(紫外光谱鉴别、理化反应、红外光谱鉴别、薄层色谱鉴别)和化学成分几方面<sup>[6-8]</sup>,但是由于防己的混伪品品种复杂,其基原植物隶属于多个科属,因此以上所述每种方法都未能全部运用到防己及其混伪品的鉴别研究中,结合准确性、实用性、应用性等指标综合评价,每种方法都有优缺点。因此,对于防己及其混伪

品的鉴定,急需一种快速、简便而且基于基因水平的新方法。

随着分子生物学的发展,越来越多的分子生物学技术开始在中药鉴定领域应用,尤其是 DNA 条形码技术<sup>[9-10]</sup>,其是指利用一段标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段,对物种进行快速准确鉴定的新兴技术。该技术最早应用于动物研究,选取的标准片段为一段长度约 650 bp 的线粒体基因 *COI*<sup>[11]</sup>,然而该基因在植物中进化速率相对缓慢,难以提供足够的信息位点<sup>[12]</sup>。为此,植物学家通过大量研究来筛选适合陆地植物的 DNA 条形码。国际生命条形码联盟植物工作组<sup>[13]</sup>建议将 *rbcL* + *matK* 组合作为陆地植物的核心 DNA 条形码;基于更大的数据分析与比对,中国条形码研究团队建议将 ITS 或 ITS2 作为陆地植物核心条形码的补充条形码<sup>[14]</sup>。中药材品种混乱及真伪鉴定方法欠缺严重影响中医药的疗效与安全,DNA 条形码技术的出现为中药材的准确鉴定带来了新的契机。陈士林首次提出将核基因组 ITS2 序列作为中草药通用 DNA 条形码<sup>[15-16]</sup>,同时国家药典委员会通过以 ITS2 为核心植物类药材 DNA 条形码鉴定体系。

在植物中,ITS2 是位于 5.8S 和 26S 之间一段长度约 220 bp 左右的核糖体 RNA。在细胞中,ITS2 rDNA 的二级结构是由 ITS 一级结构自身回折而形成部分碱基配对和单链交替出现的茎环结构,而且真核生物 ITS2 的二级结构已被证明含有高度保守的有 4 个螺旋和一些常见的模体<sup>[17]</sup>。由于 ITS 转录物在核糖体 RNA 成熟过程中降解,不加入成熟核糖体,因此受到的选择压相对较小,进化速率较快。在属间,科级以及更高分类阶元的系统发育关系中,ITS2 序列(一级结构)无法进行有效的比对,因此很多学者把目光聚焦在 ITS2 的二级结构<sup>[18-20]</sup>。其不仅包含了系统发育信息,而且通过二级结构的预测可以避免或排除旁系同源或假基因对于构建系统发育树的误导。目前 RNA 二级结构预测主要是基于最大碱基配对数的 Nussinov 算法<sup>[21]</sup>、基于最小自由能的 Zuker 算法<sup>[22]</sup>和最大权重配对法<sup>[23]</sup>等,其中,最小自由能法在序列长度较短的情况下能保证其预测结构的准确性,而且操作比较简便。大量 RNA 二级结构分析软件的出现,如 4Sale<sup>[24]</sup>, LocARNA<sup>[25]</sup> 等比对软件, CBC Analyzer<sup>[26]</sup>, ProfDistS<sup>[27]</sup> 等将利用二级结构构建系统发育树的软件,使得 RNA 二级结构运用到系统发育分析中成为可能。国内对于该领域的研究主要集中在 ITS2 二

级结构的预测方面<sup>[28-29]</sup>,而仅有少部分研究开始将 ITS2 二级结构所包含的信息运用到系统发育树的构建中<sup>[30-32]</sup>。因此本研究基于 ITS2 的一级结构和 ITS2 的二级结构对防己及其混伪品进行鉴定,不仅为防己的临床用药安全提供理论指导,并为中药材 DNA 条形码的选择提供一定的参考。

### 1 材料

本研究选取了正品防己及其常见的 11 种混伪品作为研究类群,其中防己科 4 种,马兜铃科 6 种,木通科 1 种;样本详细信息见表 1。

### 2 方法

**2.1 ITS2 序列的获得、筛选和比对** 从 GenBank 上下载正品防己及其混伪品的 ITS 序列,并利用其 Blast 功能或中药材 DNA 条形码鉴定系统(<http://www.tcmbarcode.cn/china/>)剔除可疑序列,而后基于 GenBank 序列注释信息或于隐马尔可夫模型(HMMs)<sup>[33]</sup>查找并去除 5.8S 和 26S rDNA 序列,获得标准的 ITS2 序列。将所有 ITS2 序列的 Fasta 格式导入 Geneious R11.0.3 软件,利用 Muscle 进行比对,最终进行人工手动校正。

**2.2 防己及其混伪品的种内、种间遗传距离以及聚类分析** 将比对好的矩阵导入 MEGA 7.0,并将类群按照种进行分组(由于冕宁防己和江南地不容只有 1 条序列,因此未将其进行分组)并计算出 K2P (Kimura 2-parameter)种内和种间遗传距离,并构建邻接(NJ)系统进化树,并自展分析 1 000 次来评价分支系统发育关系的可靠性。

**2.3 ITS2 二级结构的预测与比对** 利用网站 ITS2 数据库二级结构预测在线服务器(<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>)预测 ITS2 的二级结构,再将所有个体的核酸序列和二级结构联合矩阵输入到 4Sale 中,进行序列和二级结构的比对。

**2.4 ITS2 一级结构和二级结构系统发育树的构建** 从 4Sale 导出的比对好的 ITS2 sequence with secondary structure 矩阵输入到软件 ProfDistS 中,基于距离法利用剖面邻接(PNJ)构建系统发育树,并自展分析 1 000 次来评价分支系统发育关系的可靠性。

### 3 结果

**3.1 种内种间的变异分析** 34 条防己及其混伪品的序列种内 K2P 遗传距离分布于 0~0.034,平均遗传距离为 0.38,其中木防己、粉防己、三叶木通,大叶马兜铃、川防己和广防己种内 K2P 遗传距离为 0。

表 1 防己样本 GenBank 序列号及其对应物种信息

Table 1 Samples and their ITS2 GenBank numbers included in this study among Stephaniae Tetrandrae Radix and its adulterants

种名	样品名	GenBank
<i>Akebia trifoliata</i> 1	三叶木通	KF022325
<i>A. trifoliata</i> 2	三叶木通	KF022326
<i>A. trifoliata</i> 3	三叶木通	KF022327
<i>A. trifoliata</i> 4	三叶木通	GQ339574
<i>A. trifoliata</i> 5	三叶木通	FJ868728
<i>Aristolochia fangchi</i> 1	广防己	KP093067
<i>A. fangchi</i> 2	广防己	KM092120
<i>A. fangchi</i> 3	广防己	KM092121
<i>A. kaempferi</i> 1	大叶马兜铃	KM092144
<i>A. kaempferi</i> 2	大叶马兜铃	AM501928
<i>Aristolochia kaempferi heterophylla</i> 1	汉中防己	KM092143
<i>A. kaempferi heterophylla</i> 2	汉中防己	KM092142
<i>A. kaempferi heterophylla</i> 3	汉中防己	KM092141
<i>A. kaempferi heterophylla</i> 4	汉中防己	KM092140
<i>A. kwangsiensis</i> 1	川防己	KM092152
<i>A. kwangsiensis</i> 2	川防己	KM092151
<i>A. kwangsiensis</i> 3	川防己	KM092150
<i>A. kwangsiensis</i> 4	川防己	KM092145
<i>A. kwangsiensis</i> 5	川防己	KM092148
<i>A. moupinensis</i>	冕宁防己	KM092164
<i>A. tagala</i> 1	耳叶马兜铃	KP998800
<i>A. tagala</i> 2	耳叶马兜铃	KP998802
<i>A. tagala</i> 3	耳叶马兜铃	KM092167
<i>A. tagala</i> 4	耳叶马兜铃	KM092169
<i>A. tagala</i> 5	耳叶马兜铃	KP998803
<i>Cocculus orbiculatus</i> 1	木防己	AY864900
<i>C. orbiculatus</i> 2	木防己	KM092307
<i>C. orbiculatus</i> 3	木防己	KM092306
<i>C. orbiculatus</i> 4	木防己	KM092305
<i>C. orbiculatus</i> 5	木防己	GQ434397
<i>Stephania cephalantha</i> 1	头花千金藤	KJ566127
<i>S. cephalantha</i> 2	头花千金藤	AY017400
<i>S. excentrica</i>	江南地不容	KJ566136
<i>S. tetrandra</i> 1	粉防己	KJ566152
<i>S. tetrandra</i> 2	粉防己	EU808017
<i>S. tetrandra</i> 3	粉防己	FJ609735

与正品防己种间差异最小的是头花千金藤,遗传距离为 0.191,最大的是耳叶马兜铃,遗传距离为 0.657。各个种的种内和种间遗传距离见表 2。

表 2 防己正品及其混伪品种内和种间距离

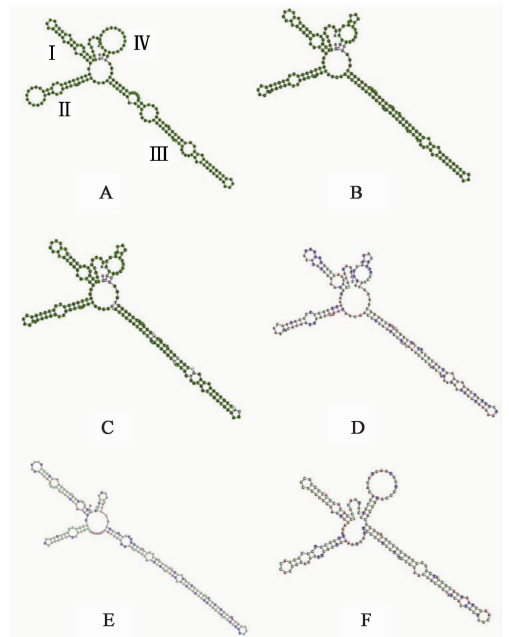
Table 2 Intraspecific and interspecific K2P genetic distance among *Stephaniae Tetrandrae Radix* and its adulterants

种名	木防己	粉防己	头花千金藤	三叶木通	耳叶马兜铃	汉中防己	大叶马兜铃	广防己	川防己
木防己	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-
粉防己	0.282	0.000	-	-	-	-	-	-	-
头花千金藤	0.365	0.191	0.034	-	-	-	-	-	-
三叶木通	0.563	0.536	0.556	0.000	-	-	-	-	-
耳叶马兜铃	0.663	0.657	0.696	0.562	0.007	-	-	-	-
汉中防己	0.527	0.523	0.587	0.403	0.334	0.004	-	-	-
大叶马兜铃	0.549	0.507	0.611	0.398	0.328	0.028	0.000	-	-
广防己	0.546	0.541	0.608	0.414	0.345	0.011	0.034	0.000	-
川防己	0.527	0.523	0.587	0.399	0.33	0.002	0.025	0.008	0.000

**3.2 ITS 二级结构的分析** 防己及其混伪品的二级结构符合被子植物一环(主环)四臂(4个螺旋区)的特征,其中臂IV变异最大,其次是臂I,臂II最为保守,臂III最长,在臂I和臂IV之间有一段比较保守的、富含嘌呤的单链结构<sup>[34]</sup>,见图1。正品防己包含7个内环,4个发夹环,1个多分支环结构;与其关系最近的头花千金藤包含6个内环,4个发夹环,1个多分支环结构;江南地不容和三叶木通与头花千金藤颈环数相同,木防己包含5个内环,4个发夹环,1个多分支环结构。虽然防己及其混伪品颈环数比较相近,但是环的大小、角度和位置上有一定的区别,因此防己及其混伪品的二级结构对于其物种鉴定具有一定的参考价值。

**3.3 单独基于 ITS2 序列(一级结构)VS 联合 ITS2 序列(一级结构)和二级结构系统发育关系分析** 基于 ITS2 序列(一级结构)和基于 ITS 序列(一级结构)和二级结构共同构建的正品防己及其混伪品的系统发育树的拓扑关系基本一致,都表明:与正品防己关系最近的种是头花千金藤,靴带支持率分别为 99% 和 98%,其次是木防己,靴带支持率分别为 99% 和 100%,具体系统发育树的拓扑关系见图 2 和图 3。

单独基于 ITS2 序列(一级结构)所构建的系统发育树表明,头花千金藤、耳叶马兜铃、木防己、三叶木通所有个体聚为一支,且支持率均为 100%,说明 ITS2 一级结构所提供的信息位点,可以将上述物种区分开。而汉中防己、大叶马兜铃、广防己和川防己共同聚为一支,该分支共包含 3 个亚分支,包括靴带支持率中等的大叶马兜铃分支和支持率比较低的广防己分支,以及包含汉中防己和川防己的呈梳子状结构的分支。基于 ITS2 序列(一级结构)和二级结



A. *Stephania tetrandra* \_ KJ566152; B. *S. cepharantha* \_ KJ566127; C. *S. cepharantha*\_AY01740; D. *S. excentrica* \_ KJ566136; E. *Akebia trifoliata*\_GQ339574; F. *Cocculus orbiculatus*\_AY864900

图 1 正品防己及其部分混伪品的 ITS2 的二级结构

Fig.1 ITS2 secondary structure of among *Stephaniae Tetrandrae Radix* and part of its adulterants

构共同所构建的系统发育树不仅囊括了单独基于一级结构信息所获得的所有结论,而且解决了梳子状拓扑结构。具体为川防己和广防己的所有种各自聚为一支,且靴带支持率为 90% 和 96%,汉中防己聚为一支。从整体上看,ITS 二级结构信息位点的加入,不仅使得系统发育树末端分支变多,而且提高了节点支持率。

**4 结论**

**4.1** ITS2 可以作为防己及其混伪品的 DNA 条形码 ITS2 序列较短,易扩增等特点,对于已经 DNA

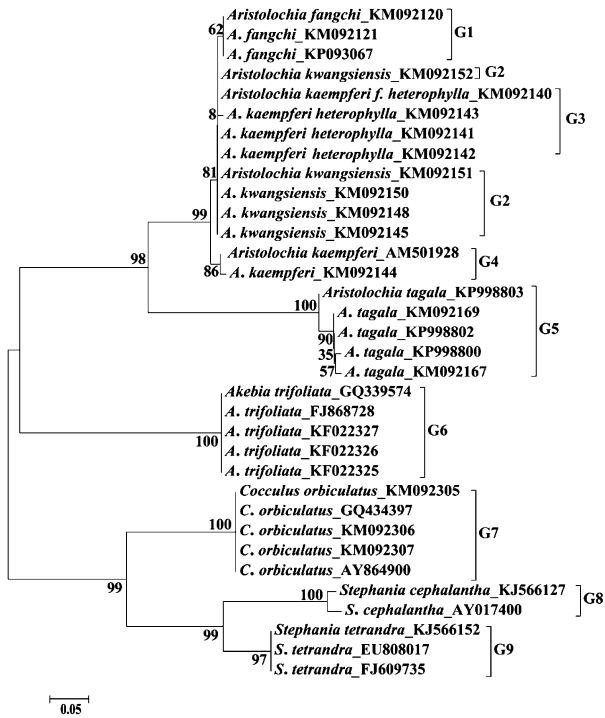


图 2 基于 ITS2 序列 (一级结构) 构建防己及其混伪品的邻接 (NJ) 树

Fig. 2 NJ tree of Stephaniae Tetrandrae Radix and its adulterants based on ITS2 sequence. Bootstrap values are indicated at nodes

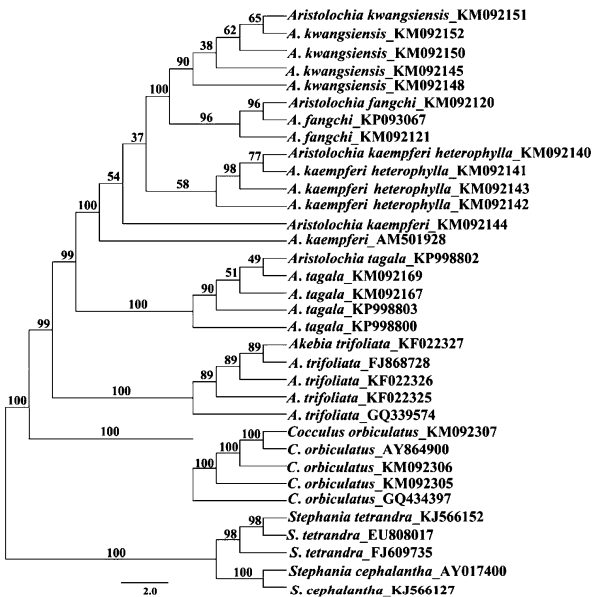


图 3 基于 ITS2 序列 (一级结构) 和 (二级结构) 构建的防己及其混伪品的邻接 (NJ) 树

Fig. 3 NJ tree of Stephaniae Tetrandrae Radix and its adulterants based on ITS2 sequence combined with ITS2 secondary structure. Bootstrap values are indicated at nodes

显示防己及其混伪品种内平均 K2P 遗传距离 (0.005) 远小于种间平均 K2P 遗传距离 (0.410), 并已达到序列差异的标准阈值 (即种间遗传距离超过种内遗传距离的十倍, 二者存在明显的间隙), 即种内和种间存在一个明显的 “Barcoding Gap” 区域<sup>[35]</sup>。此外, 由构建的邻接树可以看出, 正品防己单独聚成一支, 并与其他混伪品基原植物明显区分开。因此, ITS2 序列作为 DNA 条形码可以有效地鉴别防己基原植物及近缘种植物, 为防己药材基原植物鉴定及临床安全用药提供了分子依据。

**4.2 ITS2 二级结构所包含的系统发育信息对物种的鉴定的意义** ITS2 虽然被推荐为中药材核心 DNA 条形码, 但是在很多易混中药材中, 尤其是正品与混伪品为近缘类群时, ITS2 的分辨率依然不够, 支持率较低。因此, 本研究在不改变测序成本和考虑到中药材 DNA 降解的特点等条件下, ITS2 二级结构弥补了 ITS2 序列 (一级结构) 的不足, 可为防己及其混伪品的准确鉴定提供科学依据。本研究结果显示, ITS2 一级结构与二级结构联合数据比 ITS2 一级结构单独数据具有更多的系统发育关系信息位点, 能解决更多的亲缘关系, 同时提高了大部分分支的靴带支持率。因此, 在利用 ITS2 进行中药材物种鉴定时, 若兼顾 ITS2 二级结构包含的信息位点, 将有效提升 ITS2 条形码基因的物种分辨率。本研究不仅为药用植物 DNA 条形码的鉴定提供新的方法与思路, 而且对中药 DNA 条形码鉴定有重要的理论与实践价值。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 52.  
[2] 侯绍远. 防己及其伪品的性状鉴别 [J]. 中医药学报, 2002, 17(4): 11-12.  
[3] 白仲梅. 防己及其混伪品的鉴别 [J]. 西部中医药, 2007, 20(12): 54-56.  
[4] 雷永军, 何建国, 孟黎明, 等. 防己及其混伪品拐子药的比较鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(7): 629.  
[5] 孙安武. 防己与马兜铃科三种“防己”的鉴别 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2007, 5(7): 35-36.  
[6] 杨晖. 防己及伪品的理化鉴别 [J]. 海峡药学, 2007, 19(6): 76-77.  
[7] 李全红, 张秀桥, 陈朝晖. 防己及其常见伪品的鉴别 [J]. 湖北中医杂志, 2001, 23(5): 49.  
[8] 李亚玲, 叶云, 余德智. 防己及其混伪品的鉴别方法

- [J]. 国际中医中药杂志, 2012, 34(1): 37-41.
- [9] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [10] 熊波, 赵志礼, 倪梁红, 等. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用、局限性与展望 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2202-2206.
- [11] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.
- [12] 闫化学, 于杰. DNA 条形码技术在植物中的研究现状 [J]. 植物学报, 2010, 45(1): 102-108.
- [13] CBOL plant working group. A DNA barcode for land plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [14] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [15] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.
- [16] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [17] Coleman A W. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(10): 3322-3329.
- [18] 陈喆. 石斛属植物的分子鉴定及其亲缘关系研究 [D]. 杭州: 杭州师范大学, 2015.
- [19] 杨烁. ITS2 二级结构在药用植物 DNA 条形码鉴定中的可行性 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [20] 宋忠魁. 真核生物 ITS2 高级结构及其系统发育应用 [J]. 钦州学院学报, 2008, 23(3): 49-53.
- [21] Nussinov R, Pieczenik G, Griggs J R, et al. Algorithms for loop matchings [J]. Siam J Appl Math, 1978, 35(1): 68-82.
- [22] Zuker M, Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information [J]. Nucleic Acids Res, 1981, 9(1): 133-148.
- [23] Cary R B, Stormo G D. Graph-theoretic approach to RNA modeling using comparative data [J]. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1995(3): 75-80.
- [24] Seibel P N, Müller T, Dandekar T, et al. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE [J]. BMC Res Notes, 2008, 91(1): 1-7.
- [25] Will S, Joshi T, Hofacker I L, et al. LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs [J]. RNA, 2012, 18(5): 900-914.
- [26] Wolf M, Friedrich J, Dandekar T, et al. CBC Analyzer: inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures [J]. In Silico Biol, 2005, 5(3): 291-294.
- [27] Wolf M, Ruderisch B, Dandekar T, et al. ProfDistS: (profile-) distance based phylogeny on sequence-structure alignments [J]. Bioinformatics, 2008, 24(20): 2401-2402.
- [28] 刘金欣, 李耿, 陈彩霞, 等. 基于 ITS2 序列的中药材苍术种苗 DNA 条形码鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 34-38.
- [29] 王娟, 邵远洋, 晋小雁, 等. 不同产地丹参 ITS 序列及有效成分差异分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 40-44.
- [30] ZHANG W, YANG S, ZHAO H, et al. Using the ITS2 sequence-structure as a DNA mini-barcode: Acase study in authenticating the traditional medicine "Fang Feng" [J]. Biochem System Ecol, 2016, doi:org/10.1016/j.bse.2016.10.007.
- [31] ZHANG W, YUAN Y, YANG S, et al. ITS2 secondary structure improves discrimination between medicinal "Mu Tong" species when using DNA barcoding [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131185.
- [32] 杨烁, 薛渊元, 李美慧, 等. ITS2 二级结构系统发育信息在茄属药用植物 DNA 条形码鉴定中的应用价值 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 456-464.
- [33] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene, 2009, 430(1): 50-57.
- [34] Coleman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons [J]. Trends Genet, 2003, 19(7): 370-375.
- [35] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA Barcodes [J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): e312.

[责任编辑 全燕]