

基于第12节段基因序列的版纳病毒分子遗传进化分析

刘红 高晓艳 付士红 李铭华 翟友刚 孟维珊 孙肖红 王环宇 吕志
申辛欣 曹玉玺 何英 梁国栋

255000 淄博, 山东理工大学生命科学院生物技术系(刘红); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所脑炎室(刘红、高晓艳、付士红、李铭华、翟友刚、孟维珊、孙肖红、王环宇、吕志、申辛欣、曹玉玺、何英、梁国栋)

通信作者: 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.09.019

【摘要】 目的 了解自1980—2012年在世界各地分离的版纳病毒分子遗传进化特征。方法 采用多种生物信息学分析方法, 对1980—2012年我国及世界各地分离的版纳病毒进行基于第12节段基因序列的系统进化、分子溯源分析。结果 版纳病毒的共同进化祖先出现时间为315(95%HPD: 63~619)年前, 第12节段的进化速率为 2.33×10^{-3} (95%HPD: $2.84 \times 10^{-4} \sim 8.52 \times 10^{-3}$)碱基替换/位点/年, 提示版纳病毒属于新发快速进化的虫媒病毒。结论 版纳病毒属于快速进化的新发虫媒病毒, 其地域分布范围进一步扩大且已经分化出新的病毒变种, 应加强对该病毒在自然界分布及其致病性的监测。

【关键词】 版纳病毒; 虫媒病毒; 系统进化分析

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(81290342); 国家自然科学基金(81301479, 81501757); 山东省自然科学基金(ZR2013HQ008); 传染病预防和控制重点实验室发展项目(2014SKLID103)

Analysis on molecular genetic evolution of Banna virus based on the 12th segment Liu Hong, Gao Xiaoyan, Fu Shihong, Li Minghua, Zhai Yougang, Meng Weishan, Sun Xiaohong, Wang Huanyu, Lyu Zhi, Shen Xinxin, Cao Yuxi, He Ying, Liang Guodong
School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China (Liu H); Department of Viral Encephalitis, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Liu H, Gao XY, Fu SH, Li MH, Zhai YG, Meng WS, Sun XH, Wang HY, Lyu Z, Shen XX, Cao YX, He Y, Liang GD)
Corresponding author: Liang Guodong, Email: gdliang@hotmail.com

【Abstract】 Objective To understand the evolution characteristics of Banna viruses (BAVs) isolated worldwide from 1980 to 2012. **Methods** In this study, a phylogenetic analysis using Bayesian Markov Chain Monte Carlo simulations was conducted on all available 12th segment of genes of BAVs isolated worldwide from 1980 to 2012 to investigate the evolutionary and epidemiologic dynamics of BAVs. **Results** The Bayesian phylogenetic analysis of BAVs revealed that the common ancestor of BAVs appeared 315 (95%HPD: 63–619) years ago. The evolutionary rate of BAV based on the 12th segment gene was estimated to be 2.33×10^{-3} (95%HPD: $2.84 \times 10^{-4} \sim 8.52 \times 10^{-3}$) substitution per site per year, indicating BAV belong to an emerging arbovirus with rapid evolution. **Conclusion** The evolution of emerging BAVs is rapid and the distribution of BAVs has expanded with new variant being detected, so it is necessary to enhance the surveillance to fully understand the natural distribution and pathogenicity of BAVs.

【Key words】 Banna virus; Arbovirus; Phylogenetic analysis

Fund programs: Major Program of National Natural Science Foundation of China (81290342); National Natural Science Foundation of China (81301479, 81501757); Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2013HQ008); Development Grant of State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2014SKLID103)

版纳病毒(Banna virus, BAV)是呼肠孤病毒科(Seadornavirus genus)的模式病毒,其基因组为12节段双链RNA病毒^[1]。自1987年首次从我国云南西双版纳脑炎患者

标本中分离以来,相继在位于北温带、亚热带以及热带(赤道至北纬 42°)的中国^[2]、印度尼西亚(印尼)^[3]、越南^[4]等地的猪^[5]、牛、蜚^[6-7]、蠓及 3 属 10 种蚊虫标本中分离^[8]。2013 年,在匈牙利巴拉顿湖(Lake Balaton)的淡水鲤鱼肠内容物^[9]和中国云南省蚊虫标本中^[10],分别分离到版纳病毒样病毒(Banna-like virus, BALV),表明 BAV 蕴含着极丰富基因多样性已分化出新的变种并且具有跨地域传播的能力。鉴于 BAV 为新发虫媒病毒且与人畜疾病有密切关系。了解该病毒在自然界的起源进化过程,无论对于该病毒病的预防控制以及对于理解新发现的双链 RNA 病毒的分子遗传特性等病毒学理论研究均有重要意义。本研究对 1980—2012 年从不同地域和宿主中分离的 BAV 第 12 节段基因序列开展了系统的起源和进化分析,该节段编码双链 RNA 结合蛋白,是基因组中最保守也是目前该病毒基因序列信息最丰富的一个节段,因此采用此节段开展分析可以很好的了解该病毒在自然界进化的全貌。

材料与方法

1. 病毒分离及其序列测定:自 2000 年以来,在我国各地的猪场、牛场、鱼塘以及农村居民房屋等生境采集蚊虫标本。标本经过分类鉴定和登记后分装在冻存管中,置于液氮罐中保存,干冰运回中国 CDC 病毒性脑炎室开展病毒分离鉴定工作。病毒毒株的分离、复苏、扩增、RNA 的提取、cDNA 的制备过程同文献^[8]。使用覆盖 BAV 第 12 节段整个编码区的引物(BAV12F: AAA TTG ATA GYG YTT GCG TAA GAG, BAV12R: GTT CTA AAT TGG ATA CYG CGT GC)进行 PCR 扩增。PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。BAV 第 12 节段基因序列采用 ATGC 软件进行拼接、编辑、校正。

2. BAV 第 12 节段基因序列数

据集:对 1980—2012 年世界各地分离到的 44 株 BAV 第 12 节段基因序列信息进行了分析,毒株包括我国 7 个省或地区蚊虫和蜚标本中分离的 35 株病毒;1987 年首次在云南省脑炎病例分离的病毒株(BAV_ch),以及 3 株印尼蚊虫标本分离株(JKT6423、JKT6969、JKT7043)和 5 株越南蚊虫标本分离株(02VN009b、02VN018b、02VN078b、02VN178b、02VN180b)。这些毒株分离自 3 属 10 种蚊虫标本,

表 1 本文研究 BAV 分离株背景信息

毒株	分离时间	分离地	来源	参考文献
GS07-KD12	2007.08.16	中国甘肃省涇川县城关镇杨柳村牛棚	中华按蚊	[8]
GS07-KD15	2007.08.16	中国甘肃省涇川县城关镇杨柳村牛棚	三带喙库蚊	[8]
GS07-KD16	2007.08.16	中国甘肃省涇川县城关镇杨柳村牛棚	淡色库蚊	[8]
GS07-KD18	2007.08.16	中国甘肃省涇川县城关镇杨柳村牛棚	中华按蚊	[8]
GS07-KD27	2007.08.17	中国甘肃省涇川县城关镇水泉寺村猪舍	三带喙库蚊	[8]
GS07-KD29	2007.08.17	中国甘肃省涇川县城关镇水泉寺村猪舍	白纹伊蚊	[8]
GS07-KD30	2007.08.17	中国甘肃省涇川县城关镇水泉寺村猪舍	淡色库蚊	[8]
GS07-KD32	2007.08.17	中国甘肃省涇川县城关镇水泉寺村猪舍	淡色库蚊	[8]
GS07-KD38	2007.08.18	中国甘肃省涇川县城关镇水泉寺村猪舍	淡色库蚊	[8]
GS-KD42-2	2006.08.17	中国甘肃省武都东江猪场	三带喙库蚊	[8]
LN0684	2006.08.21	中国辽宁省锦州北宁市吴家乡猪圈 2	中华按蚊	[8]
LN0688	2006.08.21	中国辽宁省锦州北宁市吴家乡猪圈 3	中华按蚊	[8]
LN0689	2006.08.21	中国辽宁省锦州北宁市吴家乡猪圈 3	中华按蚊	[8]
LN0762	2007.07.25	中国辽宁省丹东市宽甸县大西岔镇猪圈	刺扰伊蚊	a
LN0764	2007.07.25	中国辽宁省丹东市宽甸县大西岔镇猪圈	刺扰伊蚊	a
LN0767	2007.07.25	中国辽宁省丹东市宽甸县大西岔镇猪圈	刺扰伊蚊	a
LN0776	2007.07.25	中国辽宁省丹东市宽甸县大西岔镇猪圈	刺扰伊蚊	a
LN0789	2007.07.25	中国辽宁省丹东市宽甸县大西岔镇猪圈	刺扰伊蚊	a
BJ95-75	1995	中国北京市	蚊	[8]
YN-6	2000	中国云南省	蚊	[8]
YN0556	2005.07.20	中国云南省兰坪县兔峨乡腊马登村	三带喙库蚊	[8]
YN0558	2005.07.20	中国云南省兰坪县兔峨乡腊马登村	三带喙库蚊	[8]
YN0659	2006.07.16	中国云南省泸水老窝	中华按蚊	[8]
YNSC043	2012	中国云南省	蜚	b
SX0765	2007.08.21	中国山西省五台县沟南村小洋河猪圈	淡色库蚊	[8]
SX0766	2007.08.21	中国山西省五台县沟南村小洋河猪圈	淡色库蚊	[8]
SX0767	2007.08.21	中国山西省五台县沟南村小洋河猪圈	杂蚊	[8]
SX0771	2007.08.21	中国山西省五台县沟南村小洋河猪圈	淡色库蚊	[8]
SX0789	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	杂蚊	[8]
SX0790	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	杂蚊	[8]
SX0793	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	淡色库蚊	[8]
SX0794	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	背点伊蚊	[8]
SX0795	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	淡色库蚊	[8]
SX0796	2007.08.22	中国山西省定襄县南林木村猪圈	淡色库蚊	[8]
NM0706	2007.08	中国内蒙古自治区通辽市奈曼旗鱼塘	凶小库蚊	[8]
02VN180b	2002.08	越南广平省	三带喙库蚊	[4]
02VN178b	2002.08	越南广平省	三带喙库蚊	[4]
02VN078b	2002.05	越南河西省	三带喙库蚊	[4]
02VN018b	2002.03	越南广平省	环带库蚊	[4]
02VN009b	2002	越南河西省	环带库蚊	[4]
JKT-6423	1980	印尼爪哇岛	伪杂库蚊	[3]
JKT-6969	1981	印尼爪哇岛	迷走按蚊	[3]
JKT-7043	1981	印尼爪哇岛	淡色库蚊	[3]

注: a 表示本文首次测定序列, b 表示序列信息来源于 GenBank

1种蜃标本以及病例标本(表1)。BAV分布在赤道至北纬42°之间,包括赤道地区(印尼)属于热带雨林气候;亚热带地区(越南和中国云南省)属于热带季风性气候;以及北温带地区(中国内蒙古、辽宁、山西、北京、甘肃)属典型的中温带季风性气候。2013年及2015年分别在匈牙利(北纬47°)以及中国云南省报道分离到BALV,为了阐明这些毒株和BAV真正的亲缘关系,本研究同时构建了BAV与BALV株序列数据集,包括2株从GenBank下载的BALV序列和44株BAV第12节段序列信息。

3. BAV第12节段序列分析:BAV数据集的序列比对和编辑分别采用ClustalW 2和BioEdit软件进行;核苷酸和氨基酸同源性基因以及其序列特征分别使用MegAlign(DNASTAR, Madison, WI, USA)、GenDoc软件分析,系统进化分析采用Mega 6.0软件进行。

4. 基于时间尺度的BAV系统进化分析:进行基于时间尺度的系统进化分析前,采用SIMPLLOT和RDP4软件包开展病毒数据集的重组信息的筛查,未在病毒第12节段检测到重组序列信号。BAV第12节段的最近共同进化祖先(time to the most recent common ancestor, tMRCA)、碱基替换速率以及具有时间尺度的系统进化分析采用BEAST软件包(<http://beast.bio.ed.ac.uk/>)进行^[11]。采用MrModelTest软件进行最佳碱基替换模型的筛选,GTR+I+G模型被评估为最适合的碱基替换模型。分别选择严格分子钟(strict clock)和松弛分子钟(relaxed clock)匹配4种种群增长模型进行计算参数设置。运算链长根据预实验结果以最终ESS数值>200为标准进行调整。

结 果

1. 基于时间尺度的BAV系统进化分析:贝叶斯种群动态模型被评估为最适合的参数模型,据此模型计算获得BAV最大可信树主要进化分支的后验概率数值均>0.8,表明结果具有很高的信度。进一步分析发现,BAV最近共同进化祖先出现在距今315年前(95%HPD:63~619),之后逐渐演化为两个主要的基因型别,基因A型和基因B型。基因B型主要由赤道地区分离株构成,其最近共同进化祖先出现时间在距今45(95%HPD:36~81)年前;基因A型主要由北纬15°~42°区域分离的毒株构成,出现时间为距今217(95%HPD:51~424)年前。基因A型之后又经历了两次种群分化事件,分别在距今

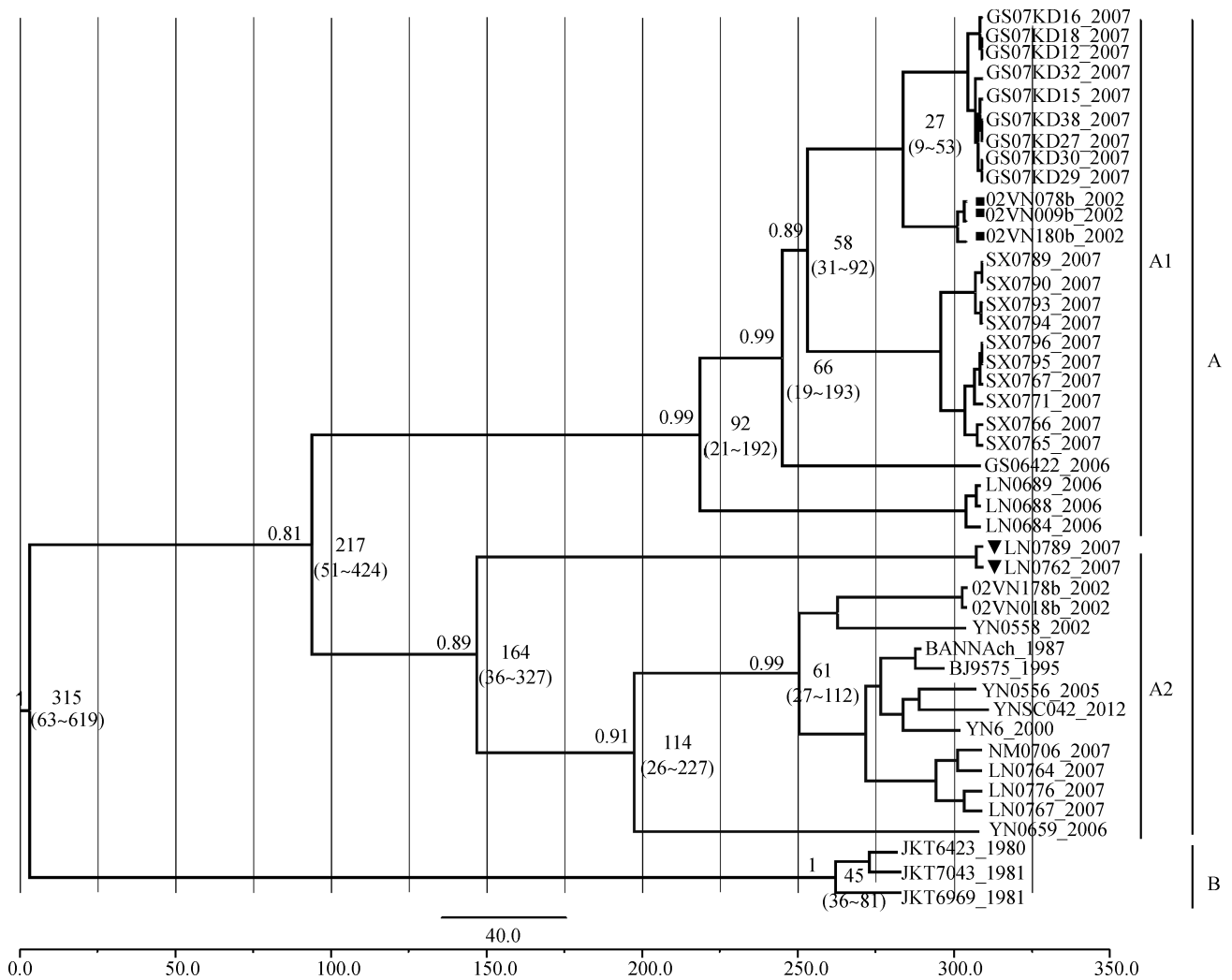
92年前和164年前根据南北地域差异分化出了基因A1(毒株主要分布于北纬30°以上)和基因A2亚型(毒株主要分布于北纬15°~30°之间)。BAV的系统聚类表现出明显的地域分布特征,即同一地域分离的BAV毒株聚类成簇,表现出更近的亲缘关系,地理距离远的毒株进化距离较远聚类成不同的进化分支(图1)。

由北纬30°以上分离株组成的A1亚型混杂着3株越南株(图1,黑色正方形标注),而由北纬15°~30°分离株组成的基因A2亚型混杂着5株2007年从中国辽宁地区分离的BAV(图1,黑色三角形标注)。

不同吸血昆虫及不同宿主动物来源的BAV系统聚类分析显示,BAV依据地域分布聚类成簇,不同宿主来源的病毒在进化树的分布没有表现出明显的依据种属来源不同而聚类成簇的现象。

2. BAV基因序列分析:对1980—2012年不同宿主和不同地域分离的44株BAV第12基因节段的核苷酸序列分析发现:①基因结构特征:BAV第12节段的编码区长度为624 nt,编码208个氨基酸。不同基因型别、不同宿主来源的病毒编码区长度不存在差异。44株BAV的5'末端序列很保守,均为5' ACC AAC ATG GAT CCT; 3'末端的序列为TCC GCG TAA(TGA) AYA R。②BAV的终止密码子的使用具有明显的基因型别特征:基因A1亚型,基因A2亚型及基因B型的终止密码子分别为TGA、TAA和TGA。③核苷酸和氨基酸同源性分析:44株BAV核苷酸同源性在84.8%~100.0%之间,核苷酸同源性平均为92.52%;氨基酸同源性在85.1%~100.0%之间,平均氨基酸同源性为98.23%。位于北纬30°以上的A1亚型毒株之间核苷酸同源性在93.3%~100.0%之间, $\mu=96.96\%$;氨基酸同源性在93.3%~100.0%之间,平均为96.17%;位于北纬15°~30°A2亚型毒株之间的核苷酸同源性在90.4%~100.0%之间,平均为95.94%,氨基酸同源性在96.3%~100.0%之间,平均为98.19%;北纬15°以下印尼分离株群基因B型的核苷酸和氨基酸的同源性为99.6%(表2)。同一地域分离的毒株之间同源性可达到99.0%,而最南部的毒株与最北端的毒株核苷酸同源性仅有84.8%;云南蚊虫、蜃和患者标本中分离的毒株之间同源性为99.7%,表现出密切的亲缘关系。

3. BAV与BALV样病毒的亲缘关系分析:为了详细阐明新分离BALV与BAV及其他Seadornavirus属病毒的亲缘关系。采用最大似然法构建了系统进化



注：后验概率标注在主要进化结点的左上方,分歧时间及其95%HPD标注在结点右侧

图1 具有时间尺度的BAV系统进化树

表2 BAV不同基因型分布、核苷酸和氨基酸同源性

基因型别	地域分布	核苷酸同源性(%)		氨基酸同源性(%)	
		BAV整体	BAV各种群	BAV整体	BAV各种群
A1	北纬>30°地区	84.8 ~ 100.0	93.3 ~ 100.0, \bar{x} =96.96	85.1 ~ 100.0	93.3 ~ 100.0, \bar{x} =96.17
A2	北纬15° ~ 30°地区	\bar{x} =92.52	90.4 ~ 100.0, \bar{x} =95.94	\bar{x} =98.23	96.3 ~ 100.0, \bar{x} =98.19
B	北纬<15°地区		99.6		99.6

注：A1、A1、B表示相对应基因型别

树(图2),结果显示匈牙利和中国云南省新分离的两株BALV隶属于Seadornavirus属,位于BAV、辽宁病毒(Liaoning virus, LNV)和卡迪皮诺病毒(Kadipiro virus, KDV)进化分支之间,两株BALV聚类成簇,形成了与BAV有密切亲缘关系的独立进化分支。

4. 进化速率、选择压力分析:BAV进化速率计算结果显示其平均碱基替换速率为 2.33×10^{-3} (95%HPD: $2.84 \times 10^{-4} \sim 8.52 \times 10^{-3}$)碱基替换/位点/年。BAV第12节段选择压力分析结果显示,其非同义/同义置换率($\omega = dN/dS$ ratio) $\omega = 0.157 \pm 0.053$ 。

讨论

呼肠孤病毒科Seadornavirus属是国际上新成立病毒属,目前包括3种病毒分别为BAV、LNV和KDV^[12]。BAV是该病毒属代表种也是国际上第一个由我国科学家分离并以我国地名命名的病毒^[13]。该病毒中文名称曾经为新环状病毒、Colti病毒等^[12],BAV最初分离自不明原因发热和病毒性脑炎病例标本,同时检测到病例抗体滴度呈现4倍以上增高,因此被认为是一个新发现的与人类脑炎有密切关联的虫媒病毒。本研究从分子进化角度对

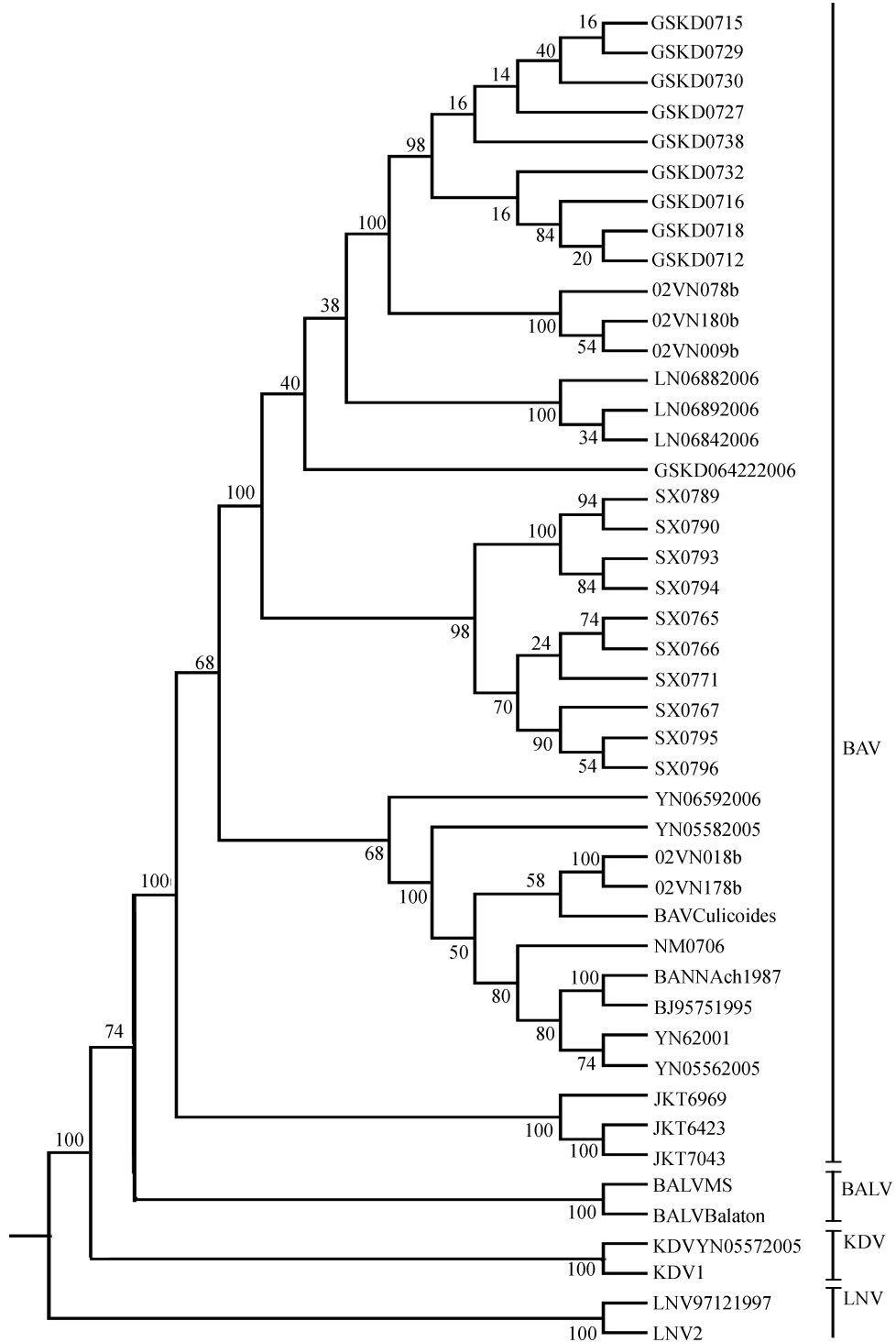


图2 BAV与其他东南亚十二节段双链RNA病毒属病毒亲缘关系

BAV起源进化、碱基替换速率、毒株之间的亲缘关系、宿主屏障等科学问题进行了分析。结果显示BAV最早的共同进化祖先大约出现在300多年前,与其他已知的虫媒病毒相比属于新发病毒:如乙型肝炎病毒的共同进化祖先出现时间约为距今3 000多年^[14], LNV的共同进化祖先为1 500年前出现^[15]。值得注意的是最近在巴西等地流行并造成严重公共

卫生问题的寨卡病毒(Zika Virus, ZIKV)共同祖先出现的时间为距今325年前^[15],提示BAV与ZIKA是在同一时期出现的虫媒病毒,这类新发的虫媒病毒出现年代不长,进化变异迅速、生存适应能力强,可被多种宿主媒介携带,通过叮咬人畜造成疾病的传播,是一类需要给予足够重视的新发病原体,应加强对这类新发虫媒病毒的基础和应用研究以应对可能突

发的重大公共卫生事件。

BAV的毒株之间具有明显的地域分布特征,亲缘关系与毒株之间的地理距离成正比,但不同基因型别的毒株可以通过季风和候鸟的作用传播至新的地域^[7-8],迅速适应并进化出在适合当地生存的种群,表明BAV不存在地理屏障。不同宿主种类分离的BAV无论从基因结构、核苷酸和氨基酸同源性还是系统进化特征分析均不具有种属差异。这些特性进一步说明,BAV可以适应不同的宿主和生存环境,具有极强的传播能力和生存适应性。

BAV第12节段的选择压力 $\omega < 1$,表明其在自然界主要受净化选择压力作用,即大部分有害的突变被净化选择压力清除。BAV在产生的初期由“旧病毒”演化而来,因此积累了丰富的种群多样性以高效的适应环境和宿主。值得注意的是,近期不断有BAV变种在不同地域和宿主中分离的报道,如匈牙利新分离的BALV^[9]和中国云南省新分离的芒市病毒^[10]等均提示BAV的活动异常活跃,其变异已突破病毒种内的限制而进化出新的病毒种,这些新病毒种是否仍然维持原有BAV生物学表型和致病力,或者出现完全不同生物学特性,以至于突破原有宿主攻击范围造成新的公共卫生危机,是亟待研究的课题。

本研究表明BAV不具备地域和宿主屏障,快速的突变率使其准种中蕴藏着丰富的基因多样性,同时赋予其丰富的分化潜力,为了适应新的宿主和生境该病毒可能会产生新的基因型别甚至是与“旧版纳病毒”差异明显的“新型版纳病毒变种”,特别是BAV及其衍生病毒的地域分布已超出我们以往的认知,具有进一步扩大的倾向。鉴于BAV与人畜疾病密切的关系特别是其具有活跃的变异和传播能力,应加强世界范围特别是北半球高纬度地区传播媒介和人畜动物中的监测。

但需要指出的是,BAV为12节段双链RNA病毒,虽然其第12节段基因序列最为保守且其序列信息最丰富可以代表BAV进化特征。但要真正全面了解BAV在自然界进化状态,亟需进一步开展基于其全基因组序列进化分析。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: VIIIth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 504-510.
- [2] 徐普庭, 王逸民, 左建民, 等. 从云南省无名热病人和脑炎病人分离到新环状病毒[J]. 病毒学报, 1990, 6(1): 27-33.

- Xu PT, Wang YM, Zuo JM, et al. New orbiviruses isolated from patients with unknown fever and encephalitis in Yunnan province [J]. Chin J Virol, 1990, 6(1): 27-33.
- [3] Brown SE, Gorman BM, Tesh RB, et al. Coltiviruses isolated from mosquitoes collected in Indonesia [J]. Virology, 1993, 196(1): 363-367. DOI: 10.1006/viro.1993.1490.
- [4] Nabeshima T, Nga PT, Guillermo P, et al. Isolation and molecular characterization of Banna virus from mosquitoes, Vietnam [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1276-1279. DOI: 10.3201/eid1408.080100.
- [5] 徐普庭, 王逸民, 左建民, 等. 云南省猪牛体内发现人源同型新环状病毒[J]. 病毒学报, 1990, 6(4): 327-331.
- Xu PT, Wang YM, Zuo JM, et al. Recovery of the same type of virus as human new orbivirus from sera of Cattles and pigs collected in Yunnan Province [J]. Chin J Virol, 1990, 6(4): 327-331.
- [6] 李其平, 谢杏初, 郅琦, 等. 首次从新疆的蜱和病牛血清分离到新环状病毒[J]. 地方病通报, 1992, 7(4): 64-69.
- Li QP, Xie XC, Zhi Q, et al. First isolation of new orbivirus (Banna) from ticks and infected cattle sera in Xinjiang [J]. Endemic Dis Bull, 1992, 7(4): 64-69.
- [7] Liu H, Gao XY, Liang GX. Newly recognized mosquito-associated viruses in mainland China, in the last two decades [J]. Virol J, 2011, 8: 68. DOI: 10.1186/1743-422X-8-68.
- [8] Liu H, Li MH, Zhai YG, et al. Banna virus, China, 1987-2007 [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(3): 514-517. DOI: 10.3201/eid1603.091160.
- [9] Reuter G, Boros Á, Delwart E, et al. Novel seadornavirus (family Reoviridae) related to Banna virus in Europe [J]. Arch Virol, 2013, 158(10): 2163-2167. DOI: 10.1007/s00705-013-1712-9.
- [10] Wang JL, Li HC, He YW, et al. Isolation and genetic characterization of Mangshi virus: a newly discovered seadornavirus of the reoviridae family found in Yunnan Province, China [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0143601. DOI: 10.1371/journal.pone.0143601.
- [11] Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7: 214. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.
- [12] Attoui H, Jaafar FM, de Micco P, et al. Coltiviruses and seadornaviruses in North America, Europe, and Asia [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(11): 1673-1679. DOI: 10.3201/eid1111.050868.
- [13] Tao SJ, Chen BQ. Studies of coltivirus in China [J]. Chin Med J, 2005, 118(7): 581-586.
- [14] Gao XY, Liu H, Li MH, et al. Insights into the evolutionary history of Japanese encephalitis virus (JEV) based on whole-genome sequences comprising the five genotypes [J]. Virol J, 2015, 12: 43. DOI: 10.1186/s12985-015-0270-z.
- [15] Faye O, Freire CCDM, Iamarino A, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(1): e2636. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002636.

(收稿日期: 2016-03-07)

(本文编辑: 斗智)