

综 述

水生动物虹彩病毒的分子生物学

萧 枫 张奇亚

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

MOLECULAR BIOLOGY OF IRIDOVIRUSES FROM AQUATIC ANIMALS

XIAO Feng and ZHANG Qi-Ya

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 水生动物; 虹彩病毒; 分子生物学

Key words: Aquatic animals; Iridovirus; Molecular biology

中图分类号: S941.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-202-05

近年来在世界范围出现的由虹彩病毒感染引起的水生动物高发病率和高死亡率现象给水产产业造成了重大经济损失, 引起了病毒学家们的热切关注^[1,2]。根据 ICTV 第七次报告, 虹彩病毒科(Iridoviridae)分为 4 个属, 包括感染脊椎动物的蛙病毒属(Ranavirus)和淋巴囊肿病毒属(Lymphocystivirus), 以及感染无脊椎动物的虹彩病毒属(Iridovirus)和绿虹彩病毒属(Chloriridovirus)^[3]。已见报道的水生动物虹彩病毒中, 有来源于鱼类的传染性造血器官坏死病毒(Epizootic hematopoietic necrosis virus, EHNV)、真鲷虹彩病毒(Red sea bream iridovirus, RSIV)、非洲鱼虹彩病毒(African lampeye iridovirus, ALIV)、虹鳟鱼病毒(Rainbow trout virus, RTV)、欧鲢病毒(European sheatfish virus, ESV)、欧洲鲶鱼病毒(European catfish virus, ECV)、大口鲈鱼病毒(Largemouth bass virus, LMBV)、黄鲈虹彩病毒(Grouper iridovirus, GIV); 也有来源于两栖类的饰纹汀蛙虹彩病毒(Bohle iridovirus, BIV)、蛙虹彩病毒(*Rana grylio* virus, RGV)、虎纹蛙病毒(Tiger frog virus, TFV); 以及来源于爬行类的 TV3(Box turtle 3)和 TV5(Tortoise virus 5)等。对其进行超微形态结构、理化性质及血清学方面的比较^[4-13], 表明它们有明显地相似性。本

文拟就有关研究进展作一综述。

1 病毒的基因组结构

已知的虹彩病毒(包括以昆虫为宿主)有近百种, 但对病毒基因组进行过研究的不超过 10 种^[5,14-17]。最早测出全序列的水生动物病毒是淋巴囊肿病毒 I 型(Lymphocystis disease virus-1, LCDV-1)^[15,18], 其基因组为单分子线状双股 DNA。从鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)和虎纹蛙(*Rana tigrina rugulosa*)中分离到的两个虹彩病毒株 ISKNV 和 TFV 的全序列也已测出^[5,19]。并对已测出的四株虹彩病毒基因组结构进行了比较(表 1)。虽然最早分离自美国的 FV3(Frog virus 3)是蛙病毒属的代表株, 但迄今其基因组的全序列尚未发表。

2 病毒的功能基因

相对其它病毒而言, 虹彩病毒基因组十分庞大。虽已测出 4 株虹彩病毒基因组的全序列, 但还有许多开放阅读框(ORF)尚未在转录和翻译水平上得到验证。目前只是对水生动物虹彩病毒进化上比较保守的基因, 如主要衣壳蛋白基因、胞嘧啶甲基转移酶

收稿日期: 2003-06-11; 修订日期: 2003-07-17

基金项目: 国家自然科学基金(30107026); “863”项目(2001AA626030); 中国科学院方向性创新项目(220313)资助

作者简介: 萧 枫(1977—), 女, 硕士, 现主要从事水生动物病毒学的研究

通讯作者: 张奇亚, zhangqy@ihb.ac.cn

表 1 已报道的虹彩病毒基因组特性
Tab. 1 Characteristics of the genomes of 4 iridoviruses reported

病毒株	LCDV- 1 ^c	CIV ^d	ISKNV ^e	TFV ^f
分类地位	淋巴囊肿病毒属	虹彩病毒属	待定	蛙病毒属
基因组大小(bp)	102, 653	212, 482	111, 362	105, 057
GC 含量	29. 07%	28. 63%	54. 78%	55. 01%
ORF 个数 ^a	195	468	124	105
基因编码能力 ^b	40—1199	40—2432	40—1208	40—1294
测定时间	1997	2001	2001	2002
GenBank 登录号	L63545	AF303741	AF371960	AF389451
参考文献	[15]	[17]	[19]	[5]

a. ORF: 开放阅读框(Open Reading Frame); b. 基因编码能力: 指 编码氨基酸的大小范围; c. LCDV- 1: Lymphocystis disease virus- 1, 淋巴囊肿病毒 I 型; d. CIV: Chilo iridescent virus, 绿虹彩病毒; e. ISKNV: Infectious spleen and kidney necrosis Iridovirus, 传染性脾肾坏死病毒; f. Tiger frog virus, 虎纹蛙病毒

基因等进行了较深入的研究。

胞嘧啶 5 甲基转移酶(Cytosine DNA methyl transferases, Mtases) 基因 在真核生物中普遍存在 DNA 甲基转移酶基因。该基因也存在于淋巴囊肿病毒和蛙虹彩病毒的基因组中。虹彩病毒的胞嘧啶甲基转移酶基因包括 5 个保守的模体。DNA 甲基化可能是作为限制—修饰系统中的一部分, 保护病毒基因组免遭病毒编码的内切酶破坏。FV3 中 Mtase 基因的开放阅读框长 642bp, 编码 214 个氨基酸, 推测分子量为 24. 8kD^[20]。其开放阅读框包含有 4 个高度保守序列的模体, 但缺少第 5 个负责特异结合 DNA 的模体。对 LCDV 以及其它一些虹彩病毒的 DNA 甲基转移酶基因序列也陆续作了分析^[21, 22], 并与相应病毒株的 MCP 基因序列比较的结果一致^[23]。

核糖核苷酸还原酶(Ribonucleotide reductase) 基因 核糖核苷酸还原酶基因在很多生物中都具有较高的同源性, 其功能是将核苷酸还原为相应的脱氧核苷酸, 在 DNA 病毒中携带有此基因是为了保证其拥有足够量的底物, 以完成基因组复制。通过比较人、痘苗病毒、非洲猪瘟病毒和疱疹病毒的核糖核苷酸基因序列所设计的引物, 成功地从虹彩病毒 RSIV 中扩增出了该基因, RSIV 与痘苗病毒和非洲猪瘟病毒该基因的同源性分别为 40. 2% 和 26. 2%^[24]。

延迟早期基因 p31 基因 Schmitt 最早报道了 FV3 p31 基因的核苷酸序列, 指出 p31 为 FV3 的延迟早期基因^[25]。ISKNV p31 基因可编码长 261 个氨基酸、分子量为 29. 5kD 的蛋白^[26]。其编码区上下游各有反向重复序列, 可形成环状结构, 靠近 3' 端有 2 个相隔不远的由 7 个谷氨酸残基相连的区域。在 LCDV-1、

EHNV、ISKNV 和 TFV 中也陆续发现了该基因^[5, 15, 16]。

主要衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP) 虹彩病毒的二十面体衣壳由一个单一的多肽——MCP 组成, 其分子量约为 49kD, 占病毒可溶性蛋白的 90%。FV3 的 MCP 可以产生中和抗体^[27]。Mao 等克隆并测出 FV3 的 MCP 基因全序列, 为 1575bp。LCDV- 1 的 MCP 由 459 个氨基酸组成; FV3 中 MCP 含有 463 个氨基酸; 在昆虫虹彩病毒 I IV-22(*Simulium iridescent virus* type 22, I IV 22) 中为 472 个氨基酸; 昆虫虹彩病毒 I IV 1(*Tipula iridescent virus* type 1, I IV 1) 中含有 464 个氨基酸, I IV 6(即二化螟虹彩病毒 CIV) 为 467 个氨基酸。尽管这 5 种病毒分属 3 个病毒属(淋巴囊肿病毒属、蛙病毒属和虹彩病毒属), 所感染的宿主分类地位也不同, 然而 MCP 基因中含有许多高度保守的结构域, 氨基酸同源性达 65. 9%^[28]。

MCP 基因和及其编码氨基酸序列的同源性可以反映不同虹彩病毒株之间的亲缘关系^[14, 28, 30], 因此该基因被视为虹彩病毒分子进化的标记。参照基因保守区的结构, 设计了 PCR 引物, 用于对新的或未知病毒株进行 DNA 扩增。如, MCP 基因 5' 端保守区的特异引物(正向, 5' GACITGGCCACTTATGAC 3'; 反向, 5' GTCTCTGGAGAAGAAGAA3'), 能从 FV3 及多种虹彩病毒中扩增出 531bp 的核苷酸^[6]。作者实验时利用这一对引物比较了 3 个中国分离株 RGV9506、RGV9807 和 RGV9808(*Rana grylio virus*) 与 FV3 相应基因片段的同源性^[29], 显示它们的核苷酸同源性分别为 99. 6%, 99. 8% 及 98. 4%, 由此基因片段推导的氨基酸序列同源性超过 97%, 而与 LCDV- 1 的同源性只有 72%。可见从中国分离的这几株蛙虹彩病毒与 FV3 有非常密切的亲缘关系(图 1)。

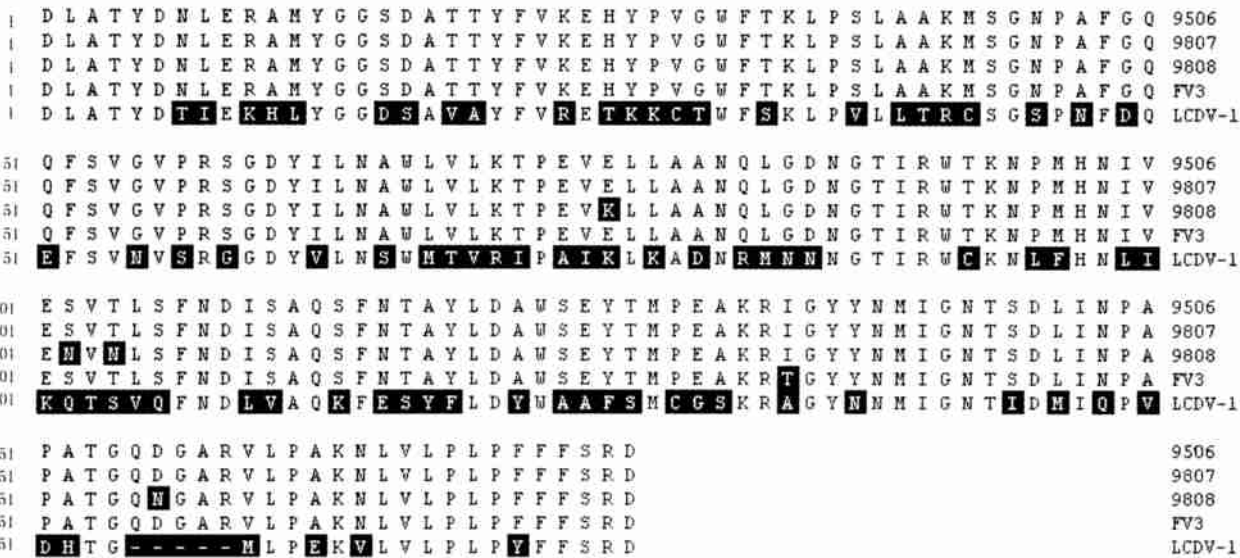


图1 5株虹彩病毒主要衣壳蛋白基因的氨基酸序列比较。其中9506、9807、和9808 3株 RGV 为作者所在实验室分离到的。图中阴影部分表示不同的氨基酸。RGV9506, GenBank 登录号: AF192509; RGV9807, GenBank 登录号: AF192508; RGV9808, GenBank 登录号: AY294406; FV3, GenBank 登录号: No. U36931; LCDV-1, 淋巴囊肿病毒 1 型, GenBank 登录号: No. L63545

Fig. 1 Partial comparison of MCP amino acids among 3 RGV isolates, FV3 and LCDV-1. RGV9506, GenBank Accession No. AF 192509; RGV9807, GenBank Accession No. AF 192508; RGV9808, GenBank Accession No. AY294406; FV3, GenBank Accession No. U36931; LCDV-1, GenBank Accession No. L63545

eIF-2 α 基因 真核起始因子 2 (eukaryotic initiation factor 2) 的 α 亚单位是细胞翻译机制中的关键成分。当细胞被病毒感染, 依赖 RNA 的蛋白激酶催化 eIF-2 α 发生磷酸化, 从而抑制细胞蛋白的合成。对 EHN 基因组进行研究时发现了一个与 eIF-2 α 有同源性的基因^[16]。比较多种感染鱼类和蛙虹彩病毒的 eIF-2 α 基因序列, 结果显示它们在核苷酸和氨基酸水平上都有很高的同源性。进一步与痘病毒以及真核生物的 eIF-2 α 的氨基酸序列比较时揭示序列中存在着一个高度保守的模式。对 EHN 的 eIF-2 α 基因进行原核和真核水平的表达, 产物为一个 31kDa 的蛋白^[16, 31]。研究还表明, 虹彩病毒的 eIF-2 α 基因可能在细胞凋亡中发挥作用^[31]。

3 病毒与细胞基因的同源性及病毒的进化

病毒为细胞内寄生生物, 细胞基因组和病毒基因组可相互作用, 共同进化。在对虹彩病毒基因组序列的分析中发现, 某些基因编码的产物是宿主细胞蛋白的同系物或会参与到细胞周期调控和宿主免疫系统中。这些基因编码的产物包括病毒转录和复制所必须的 DNA 聚合酶、依赖 DNA 的 RNA 聚合酶、胞嘧啶 DNA 甲基转移酶、拓扑异构酶 II 型和至少 2 种不同的 DNA 解旋酶; 病毒基因编码的蛋白还参与到宿主细胞的核酸代谢中, 如核糖核苷酸还原酶的

两个亚单位、胸苷激酶和 5'-3' 核酸外切酶。另外, 在 LCDV 中发现了细胞蛋白修饰酶的同系物——组织蛋白酶类 B 型半胱氨酸蛋白酶。此外, 虹彩病毒基因组编码的细胞蛋白同系物可能直接参与了细胞周期或者宿主的免疫系统, 这些蛋白包括细胞凋亡抑制因子、类胰岛素生长因子、3 β -羟固醇氧化还原酶和可溶性肿瘤坏死因子受体等。它们与细胞蛋白的同系物相比含有较高的多重保守结构域^[5, 15, 32-38]。

DNA 聚合酶是研究得比较多的一种 DNA 病毒蛋白, 其保守特性已运用于病毒系统发育学的研究^[39]。经对几种真核生物 DNA 病毒的 DNA 聚合酶基因序列进行比对后, 绘制了系统发育树, 可见虹彩病毒与藻类 DNA 病毒科 (Phycodnaviridae)、囊泡病毒科 (Ascoviridae) 和非洲猪瘟病毒科 (Asfarviridae) 病毒在进化上比较接近^[38, 40]。

4 病毒的结构蛋白和基因组多态性分析

病毒蛋白包括结构蛋白和非结构蛋白, 水生动物虹彩病毒经 SDS-PAGE 单向凝胶电泳, 通常能分辨出约 20 条结构多肽^[6, 8, 30]。利用这种方法对纯化的病毒粒子进行分析, 可以较清楚地观察到病毒在结构多肽上的差异。因此, 对不同病毒的结构多肽进行比较, 可为病毒分类提供重要依据。通常用于

鉴别蛙虹彩病毒的标记是病毒粒子有无一条 50kD 左右的主要衣壳蛋白。单向 SDS-PAGE 电泳, 分离到病毒的结构多肽分子量范围一般在 8—121kD^[8] 之间。Hyatt 分析比较了 30 种水生动物虹彩病毒的结构多肽, 显示多数病毒在 8—65kD 区的蛋白图谱非常相似, 有 12 条相同的多肽带^[30]。

限制性内切酶 Hpa II 和 Msp I 是一对异源同功酶, 它们都能识别 CCGG 序列, 但是当识别序列中第二个 C 在 5' 发生甲基化时, Hpa II 不能切割, 而 Msp I 仍有作用。因此, 比较这两种酶消化基因组 DNA 后的电泳图谱可以分辨出基因组是否存在甲基化^[30, 23]。对基因组进行 DNA 限制性片段长度多肽性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)分析, 可以区别不同病毒株。用 Hind III、Kpn I、Xba I、BamH I 和 Xho I 等内切酶对病毒的基因组进行分析, 根据内切酶种类及酶切后病毒相同片段的多少来分类, 同一类病毒有的相同片段超过 70%—80%, 而不同类的病毒只有 20%—30% 的片段相同。一般来说, 从同一地区或同类宿主中分离到的病毒基因同源性较高。

5 展望

最近有报道指出, 蛙虹彩病毒感染是引起蛙大批死亡、并导致其种群数量不断下降的一个重要原因^[2, 10, 41]。在全球普遍流行的蛙虹彩病毒是否与早年从美国分离到的无明显毒性的 FV3 有关? 如何对水生动物虹彩病毒流行趋势进行预测及控制? 这些都是水生动物虹彩病毒基础研究所面临的紧迫而又非常重要的课题。

相对于医学病毒学和兽医病毒学的分子生物学研究, 当前关于水生动物虹彩病毒的分子生物学研究较为滞后, 文献报道多集中于分子生物学基本特性上, 如结构蛋白、限制性内切酶图谱、保守基因序列等方面的比较。虽然早在 20 世纪 80 年代就有关于 FV3 部分基因调控机制的讨论, 但是诸如病毒蛋白在转录过程中的作用、病毒的装配机制、以及病毒与宿主的相互作用等等方面的问题却知之甚少。目前已测出的 3 株水生动物虹彩病毒基因组全序列则为研究工作带来了新的生机。利用世界各大数据库 (GenBank/EMBL/DBS) 中海量的生物信息资源, 并结合各种实验手段, 将大大加速了解虹彩病毒的基因组成及基因功能, 建立蛙虹彩病毒生物信息库。由于水生动物虹彩病毒具有宿主种类的多样性、分布地区的广泛性、部分基因的高度同源性、以及与水

生生态的密切相关性等特征, 因此将比较基因组学的方法应用其中, 将有助于人们理解各种虹彩病毒基因在基因结构上的差异, 同时也是认识水生动物虹彩病毒分子结构、并揭示其致病分子机理的基本途径之一。

参考文献:

- [1] Zhang Q Y. A review of researches on ecology of lower aquatic vertebrate viruses [J]. *Chinese J Virol*, 2001, **17**(3): 280—284. [张奇亚. 水生低等脊椎动物病毒生态学研究. 病毒学报, 2001, **17**(3): 280—284]
- [2] Chinchir V G. Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold blooded killers [J]. *Arch Virol*, 2002, **147**: 447—470
- [3] van Regenmortel MHV. Introduction to the species concept in virus taxonomy [A], van Regenmortel M. H. V *et al.* Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego, 2000. 3—16
- [4] Zhang Q Y, Li Z Q, Jiang Y L, *et al.* Preliminary studies on virus isolation and cell infection from disease frog *Rana grylio* [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1996, **20**(4): 390—392 [张奇亚, 李正秋, 江育林, 等. 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究. 水生生物学报, 1996, **20**(4): 390—392]
- [5] He J G, Lu L, Deng M, *et al.* Sequence Analysis of the Complete Genome of an Iridovirus Isolated from the Tiger Frog [J]. *Virology*, 2002, **292**: 185—197
- [6] Mao J H, Hedrick R P, Chinchir V G. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses [J]. *Virology*, 1997, **229**: 212—220
- [7] Hedrick R P, McDowell T S, Ahne W, *et al.* Properties of three iridovirus like agents associated with systemic infections of fish [J]. *Dis Aquat Org*, 1992, **13**: 203—209
- [8] Hengstberger S G, Hyatt A D, Speare R, *et al.* Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Bohle iridoviruses, recently isolated Australian iridoviruses [J]. *Dis Aquat Org*, 1993, **33**: 1—9
- [9] Hedrick R P, McDowell, T S. Properties of iridoviruses from ornamental fish [J]. *Vet Res*, 1995, **26**: 423—427
- [10] Zhang Q Y, Xiao F, Li Z Q, *et al.* Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog (*Rana grylio*) with lethal syndrome [J]. *Dis Aquat Org*, 2001, **48**(1): 27—36
- [11] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line [J]. *Aquaculture*, 1999, **175**: 185—197
- [12] Nakajima K, Maeno Y, Yokoyama K, *et al.* Antigen analysis of red sea bream iridovirus and comparison with other fish iridoviruses [J]. *Fish Pathol*, 1998, **33**(2): 73—78
- [13] Sudthongkong C, Miyata M, Miyazaki, T. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami [J]. *Dis Aquat Org*, 2002, **48**: 163—173
- [14] Mao J H, Tham T N, Gentry G A, *et al.* Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3 [J]. *Virology*, 1996, **216**: 431—436

- [15] Tidona C A, Darai G. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus[J]. *Virology*, 1997, **230**: 207—216
- [16] Yu Y X, Bearzotti M, Vende P, *et al.* Partial mapping and sequencing of a fish iridovirus genome reveals genes homologous to the frog virus 3 p31, p40 and human eIF2 α [J]. *Virus Res*, 1999, **63**: 53—63
- [17] Jakob N J, Muller K, Bahr U, *et al.* Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: Coding strategy of the genome of *Chilo* iridescent virus [J]. *Virology*, 2001, **286**: 182—196
- [18] Tidona C A, Darai G. Lymphocystis disease virus(*Iridoviridae*)[A]. Webster RG, Granoff A Encyclopedia of Virology[M]. San Diego: Academic Press 1999, 908—911
- [19] He J G, Deng M, Weng S P, *et al.* Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus[J]. *Virology*, 2001, **291**: 126—139
- [20] Kaur K, Rohozinski J, Goorha R. Identification and characterization of the frog virus 3 DNA methyltransferase gene [J]. *J. Gen Virol*, 1995, **76**: 1937—1943
- [21] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, *et al.* Identification of the gene encoding the DNA(cytosine 5) methyltransferase of lymphocystis disease virus[J]. *Virus Genes*, 1996, **12**: 219—229
- [22] He H H, Deng M, He J G, *et al.* Identification and characterization of the infectious spleen and kidney necrosis virus cytosine DNA methyltransferase gene[J]. *Chinese J Virol*, 2001, **17**(4): 349—355. [何华虹, 邓敏, 何建国, 等. 鲟鱼传染性脾肾坏死病毒的胞嘧啶 5 甲基转移酶基因结构及序列分析. 病毒学报, 2001, **17**(4): 349—355]
- [23] Mao J H, Wang J, Chinchir C D, *et al.* Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. *Dis Aquat Org*, 1999, **37**: 104—114
- [24] Oshima, S I, Hata J, Segawa C, *et al.* A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus[J]. *Anal Biochem*, 1996, **242**: 15—19
- [25] Schmit M P, Tondre L, Kirn A, *et al.* The nucleotide sequence of a delayed early gene(31K) of frog virus 3[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**: 400
- [26] Deng M, He J G, Weng S P *et al.* Characterization of the p31 gene of infectious spleen and kidney necrosis virus of *Siniperca chuatsi* [J]. *J Fisheries of China*, 2001, **25**(6): 542—546. [邓敏, 何建国, 翁少萍, 等. 鲟鱼传染性脾肾坏死病毒p31 基因结构及序列分析. 水产学报, 2001, **25**(6): 542—546]
- [27] Tham T N, Mesnard J M, Tondre L, *et al.* Mapping of the gene coding for the major late structural polypeptide on the frog virus 3 genome [J]. *J Gen Virol*, 1986, **67**: 301—308
- [28] Tidona C A, Schnitzler P, Kehm R, *et al.* Is the major capsid protein of Iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? [J] *Virus Gene*, 1998, **16**: 59—66
- [29] Zhang Q Y, Xiao F, Li Z Q, *et al.* Comparison of Sequence Homology of Major Capsid Protein Gene of Ranavirus Frog Virus3 and *Rana Grylio* Virus isolates from China[J]. *Chinese J Virol*, 2001, **17**(4): 372—374. [张奇亚, 肖枫, 李正秋, 等. 从我国分离的 3 株蛙虹彩病毒与蛙病毒 3 型主要衣壳蛋白基因同源性的比较[J]. 病毒学报, 2001, **17**(4): 372—374]
- [30] Hyatt A D, Gould A R, Zupanovic Z, *et al.* Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses [J]. *Arch Virol*, 2000, **145**: 301—331
- [31] Esbauser S, Bremont M, Ahne W. Comparison of the eIF-2 α homologous proteins of seven ranaviruses (*Iridoviridae*) [J]. *Virus Genes* 2001, **23**: 347—359
- [32] Holland J, Domingo E. Origin and evolution of viruses [J]. *Virus Genes*, 1998, **16**: 13—21
- [33] Muller K, Tidona C A, Darai G. Identification of a gene cluster within the genome of chilo iridescent virus encoding enzymes involved in viral DNA replication and processing [J]. *Virus Genes*, 1999, **18**: 243—264
- [34] Bahr U, Tidona C A, Darai G. The DNA sequence of chilo iridescent virus between the genome coordinates 0. 101 and 0. 391: similarities in coding strategy between insect and vertebrate iridoviruses [J]. *Virus genes*, 1997, **15**: 235—245
- [35] Schnitzler P, Sonntag K C, Muller M, *et al.* Insect iridescent virus type 6 encodes a polypeptide related to the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II [J]. *J Gen Virol*, 1994, **75**: 1557—1567
- [36] Muller M, Schnitzler P, Koonin E V, *et al.* Identification and properties of the largest subunit of the DNA-dependent RNA polymerase of fish lymphocystis disease virus: dramatic difference in the domain organization in the family *Iridoviridae* [J]. *J Gen Virol*, 1995, **76**: 1099—1107
- [37] Sonntag K C, Schnitzler P, Koonin E V, *et al.* Chilo iridescent virus encodes a putative helicase belonging to a distinct family within the “DEAD/H” superfamily: Implications for the evolution of large DNA viruses [J]. *Virus Genes*, 1994, **8**: 151—158
- [38] Tidona C A, Darai G. Iridovirus homologues of cellular genes: implications for the molecular evolution of large DNA viruses [J]. *Virus Genes*, 2000, **21**: 77—81
- [39] Knopf C W. Evolution of viral DNA-dependent DNA polymerases[J]. *Virus Genes*, 1998, **16**: 47—58
- [40] Stasiak K, Demattei M V, Federici B A, *et al.* Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double stranded DNA genomes [J]. *J Gen Virol* 2000, **81**: 2095—2072
- [41] Daszak P, Berger L, Cunningham A A, *et al.* Emerging infectious diseases and amphibian population decline[J]. *Emerg Infect Dis* 1999, **5**: 735—748