

# 基于全基因组正选择基因揭示大狐蝠和小棕蝠功能分化分子机制

曾燕妮<sup>1,3</sup>, 沈永义<sup>2,\*</sup>, 张亚平<sup>3,4,\*</sup>

1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;
2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室, 云南 昆明 650223;
4. 云南大学 生物资源保护与利用实验室, 云南 昆明 650091

**摘要:** 小棕蝠 (*Myotis lucifugus*) 和大狐蝠 (*Pteropus vampyrus*) 在生理和行为上有诸多差异, 应被诉诸于分子水平并加以系统探讨。该研究对包括小棕蝠和大狐蝠在内的 7 个哺乳动物全基因组同源编码序列进行了高质量比对, 使用比对序列进行了分别以两个蝙蝠枝为前景枝的全基因组水平选择压力分析, 并对两种蝙蝠中的正选择基因进行了富集聚类分析。结果表明, 在小棕蝠枝受到正选择的基因数高于大狐蝠枝; 两种蝙蝠中独立受到正选择的基因富集于不同的功能类别; 且正选择基因的富集差异与小棕蝠和大狐蝠在免疫、运动协调、能量代谢和感觉器官发育等关键生物学功能方面的分化大体吻合。

**关键词:** 小棕蝠; 大狐蝠; 正选择; 适应性性进化; 基因组

中图分类号: Q959.833 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)03-0221-07

## Genome-wide scan reveals the molecular mechanisms of functional differentiation of *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus*

Yan-Ni ZENG<sup>1,3</sup>, Yong-Yi SHEN<sup>2,\*</sup>, Ya-Ping ZHANG<sup>3,4,\*</sup>

1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;
2. State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
3. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
4. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China

**Abstract:** The physiological and behavioral differences between *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus* should be attributed to molecular mechanisms and deserve intensive investigation. We conducted genome-wide scan for coding sequences from the orthologue genes of seven mammalian species. Selection analyses were carried out by setting the branches leading to *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus* as foreground branches, respectively. Enrichment analyses were conducted for positively selected genes. Our results indicated that more genes exhibited positive selection in *Myotis lucifugus* than that in *Pteropus vampyrus*. The positively selected genes of the two species were enriched in different functions. The differences between *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus* represented their differentiation in biological functions, especially the functions of immunity, motor ability, energetic metabolism and sensory organ development.

**Keywords:** *Myotis lucifugus*; *Pteropus vampyrus*; Positive selection; Adaptive evolution; Genome

小棕蝠隶属鼠耳蝠属 (*Myotis*), 是北美洲最常见的蝙蝠物种之一 (Fenton & Barclay, 1980)。具食虫性, 其常见食物包括飞蛾、胡蜂、蜜蜂及蚊子等

(Belwood & Fenton, 1976)。由于这些昆虫多邻水而居, 故小棕蝠栖息地也多近水 (Fenton & Bell, 1979)。小棕蝠的眼睛多已退化, 主要使用回声定位

收稿日期: 2013-03-21; 接受日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31172080, 91231202)

\*通信作者 (Corresponding authors), E-mail: shenyy@xmu.edu.cn; zhangyp@mail.kiz.ac.cn

系统来探测环境和捕食 (Schnitzler & Kalko, 1998; Schnitzler & Kalko, 2001), 发出的声音为持续 1~5 ms 的高强度 FM 调频信号 (frequency modulated), 扫描速率为 80~40 kHz, 且在不同的飞行和捕食状态下, 其发出声波的频率和扫描速率均不同。普通飞行状态下发声频率为~20 次/s, 而在追逐猎物时频率可提高到 200 次/s (Fenton & Barclay, 1980)。小棕蝠的基因组测序 (2X) 为哺乳动物基因组计划 Mammalian Genome Project 的一部分, 随后较高质量的基因组测序也已完成 (7X)。

大狐蝠隶属狐蝠属, 多分布于东南亚, 是世界上最大的蝙蝠物种之一 (Kunz & Jones, 2000; Simmons et al, 2005)。栖息于原始森林、红树林等, 为食植性, 常见食物为花、花蜜和果实 (Lekagul & McNeely, 1977; Payne et al, 1985)。与其他旧大陆蝙蝠一样, 大狐蝠缺乏回声定位能力, 主要依靠嗅觉和视觉来搜寻食物 (Acharya et al, 1998; Sánchez et al, 2006)。暗视觉 (scotopic vision) 是包括大狐蝠在内的多数旧大陆果蝠适应夜行性生活中探测环境和捕食需求的独特方式。使用暗视觉, 蝙蝠能在弱光环境下接收外来光信号。为了提高光吸收能力, 旧大陆果蝠的眼睛往往比使用回声定位的蝙蝠更大, 功能更强 (Phillips, 2000)。大狐蝠的基因组测序属于哺乳动物基因组计划的一部分, 2.63X 的基因组已被测序完成。

传统的适应性进化研究方法, 如正选择 (positive selection) 分析, 可以和基因组规模的数据比对结合, 从而发现与适应性性状相关的基因。比对这两个蝙蝠物种的基因组信息可帮助科学家阐明一些有关蝙蝠共同性状的生物学问题, 例如, 通过比对包括两种蝙蝠和海豚在内的全基因组, 研究者从分子角度揭示了海豚和蝙蝠祖先在新的运动方式进化过程中发生的能量代谢适应性进化现象 (Shen et al, 2012)。同理, 小棕蝠和大狐蝠的基因组数据也为我们研究以两者为代表的食果和食虫蝙蝠之间的功能分化提供了有利条件。全基因组范围的比对和选择压力分析, 使系统揭示两种蝙蝠间因食性及感觉系统等功能分化而产生的适应性进化机制成为了可能。本研究利用小棕蝠和大狐蝠的基因组数据, 使用基因编码序列进行了多个哺乳动物间的高质量全基因组比对, 在两种蝙蝠内进行了正选择信号探测, 并对两种蝙蝠中受到正选择的基因分别进行了功能注释和富集聚类, 以此研究两种蝙

蝠在适应性进化方向上的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据搜集和比对

由 ENSEMBL 数据库 (version 64) 下载小鼠 (*Mus musculus*)、人类 (*Homo sapiens*)、马 (*Equus caballus*)、牛 (*Bos taurus*)、海豚 (*Tursiops truncatus*)、大狐蝠 (*Pteropus vampyrus*) 和小棕蝠 (*Myotis lucifugus*) 等 7 个哺乳动物间的所有一对一同源 (one2one orthologues) 编码序列 (coding sequences)。使用软件 *prank* (<http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/prank/prank/>) 对每个基因在 7 个物种间进行多物种比对。在比对中, 若一个基因在某一物种中有多种转录形式, 则选用最长的一条。随后, 对比对后的序列进行序列相似度分析, 并基于此, 在不影响编码框的前提下删除比对质量差的区域。具体步骤如下: (1) 删除比对中的“gap”和“N”的区域; (2) 使用 15 bp 的滑动窗口按照一个密码子单位在每个比对序列中进行滑动, 对于每个滑动窗口, 计算两两物种间的序列相似度, 若最低两两相似度 < 7/15, 则删去整个滑动窗口, 继续滑动; (3) 经过删减窗口步骤后, 如果比对序列长度 < 100 bp, 则弃用整个比对序列。

### 1.2 正选择分析

使用 PAML4 软件的 *Codeml* 程序进行正选择检验, 引导树采用具有高支持度的系统发育树 (Murphy, 2001)。分支-位点模型 (branch-site model: test2: M2a VS M2 null. M2a: model=2, NSsites=2, fix\_omega=0) 被用来判断一个基因是否在某一个指定枝上受到正选择。通过计算卡方值来进行似然率检验, 得到 *P* 值后, 使用 FDR 方法进行多重校正 (Benjamini & Hochberg, 1995), 即, 从小到大排列所有基因 *P* 值, 得到每基因的序号, 最终计算得到多重校正后的 *P* 值 (FDR 值) (计算公式:  $P \times \text{总基因数} / \text{该基因序号}$ )。此外, 对于每个正选择基因, 如果某一氨基酸位点的 BEB 后验概率  $\geq 0.9$ , 则认为该位点在该基因的该枝上受到正选择。

### 1.3 功能注释和富集分析

以人类 ENSEMBL 基因号 (version 64) 作为每一组 orthologue 序列的标签, 进行下游注释。在线注释工具 DAVID 被用于功能注释和富集聚类。即, 每个 ENSEMBL 基因都被注释到不同的 Go-term (Go ontology) 和 KEGG 通路上。Fisher 精确检验被

用于判断属于某一注释类别的基因在给定的基因列表内是否显著富集 ( $P \leq 0.1$ )。两种蝙蝠正选择基因的富集聚类结果使用在线 Gene-Ontology 注释画图工具 REViGO 进行分别呈现 (Supek et al, 2011), 并在工具 WEGO 内进行种间比较 (Ye et al, 2006)。

## 2 结果

### 2.1 小棕蝠和大蝙蝠基因组中受到正选择的基因

对 11 267 个具有高质量 orthologue 比对序列的基因, 使用分支-位点模型, 分别以小棕蝠 (branch b) 和大蝙蝠 (branch a) 为前景枝进行全基因组正选择扫描, 引导树为系统发育树 (图 1)。在小棕蝠中, 共 835 个基因 (PSs) 受到正选择 ( $P \leq 0.05$ ), 其中, 625 个基因的 1 380 个位点 (PSSs) 显著受到正选择 ( $BEB \geq 0.9$ ), 多重校正后, 97 个基因在  $FDR = 0.05$  水平显著 [图 2, 附表 1 (本刊网站 Supporting

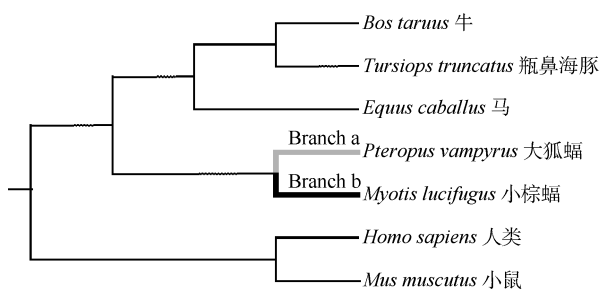


图 1 正选择计算中使用的系统发育树及前景枝

Figure 1 Phylogenetic trees and foreground branches used in positive selection analysis

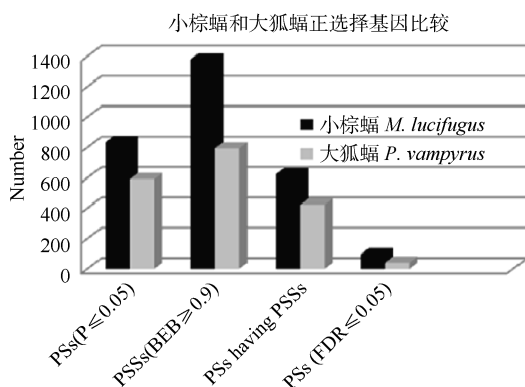


图 2 小棕蝠和大蝙蝠枝分别受到正选择的基因比较

Figure 2 Comparison of positively selected genes between *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus*

PSs ( $P \leq 0.05$ ): 正选择基因; PSSs ( $BEB \geq 0.9$ ): 正选择基因内的正选择位点; PSs with PSSs: 包含正选择位点的正选择基因; PSs ( $FDR \leq 0.05$ ): 多重校正后的正选择基因。

PSs ( $P \leq 0.05$ ): Positively selected genes; PSSs: Positively selected sites within PSs. PSs ( $FDR \leq 0.05$ ): Positively selected genes after multiple correction.

info) ]。在大蝙蝠中, 共 592 个基因受到正选择 ( $P \leq 0.05$ ), 其中, 424 个基因的 794 个位点显著 ( $BEB \geq 0.9$ ), 41 个基因在  $FDR = 0.05$  水平显著 (图 2, 附表 2 (本刊网站 Supporting info))。共 62 个基因在小棕蝠和大蝙蝠为前景枝时都受到正选择, 773 和 530 个基因分别在小棕蝠和大蝙蝠中独立受到正选择 (在另一蝙蝠种不受正选择)。

### 2.2 小棕蝠和大蝙蝠独立受到正选择的基因富集分析

富集分析结果显示, 小棕蝠中独立受到正选择的基因富集于以下 Go-terms: GO:0006954 (炎症反应 inflammatory response:  $P = 2.58E-04$ )、GO:0045087 (天生免疫应答 innate immune response:  $P = 0.03$ )、GO:0003774 (运动活性 motor activity:  $P = 0.01$ )、GO:0044456 (突触 synapse part:  $P = 0.057$ )、GO:0021680 (小脑蒲氏细胞层发育 cerebellar Purkinje cell layer development:  $P = 0.06$ )、GO:0031594 (神经肌肉接头 neuromuscular junction:  $P = 0.06$ )、GO:0060537 (肌肉组织发育 muscle tissue development:  $P = 0.08$ )、GO:0048840 (耳石发育 otolith development:  $P = 0.08$ )、GO:0048806 (生殖器发育 genitalia development:  $P = 0.07$ ) 和 GO:0060541 (呼吸系统发育 respiratory system development:  $P = 0.08$ ) 等, 以及 KEGG 通路: hsa04020 (钙离子 calcium signaling pathway:  $P = 0.008$ )、hsa04670 (白血球穿内皮层迁移 leukocyte transendothelial migration:  $P = 0.01$ ) 和 hsa05416 (病毒性心肌炎 viral myocarditis:  $P = 0.03$ ), hsa04360 (轴突导向 axon guidance:  $P = 0.05$ ) 等。其他富集显著类别见图 3a, 附表 3 (本刊网站 Supporting info)。

大蝙蝠中独立受到正选择的基因富集于以下 Go-terms: GO:0016042 (脂代谢 lipid catabolic process:  $P = 3.48E-04$ )、GO:0030182 (neuron differentiation:  $P = 5.71E-04$ )、GO:0048666 (neuron development:  $P = 0.001$ )、GO:0007584 (response to nutrient:  $P = 0.006$ )、GO:0032934 (sterol binding:  $P = 0.016$ )、GO:0009062 (脂肪酸代谢 fatty acid catabolic process:  $P = 0.017$ )、GO:0015918 (固醇运输 sterol transport:  $P = 0.019$ )、GO:0030301 (胆固醇运输 cholesterol transport:  $P = 0.019$ )、GO:0048593 (眼部形态发生 camera-type eye morphogenesis:  $P = 0.03$ )、GO:0016358 (树突发育 dendrite development:  $P = 0.07$ ) 和 GO:0043408 (MAPKKK 级

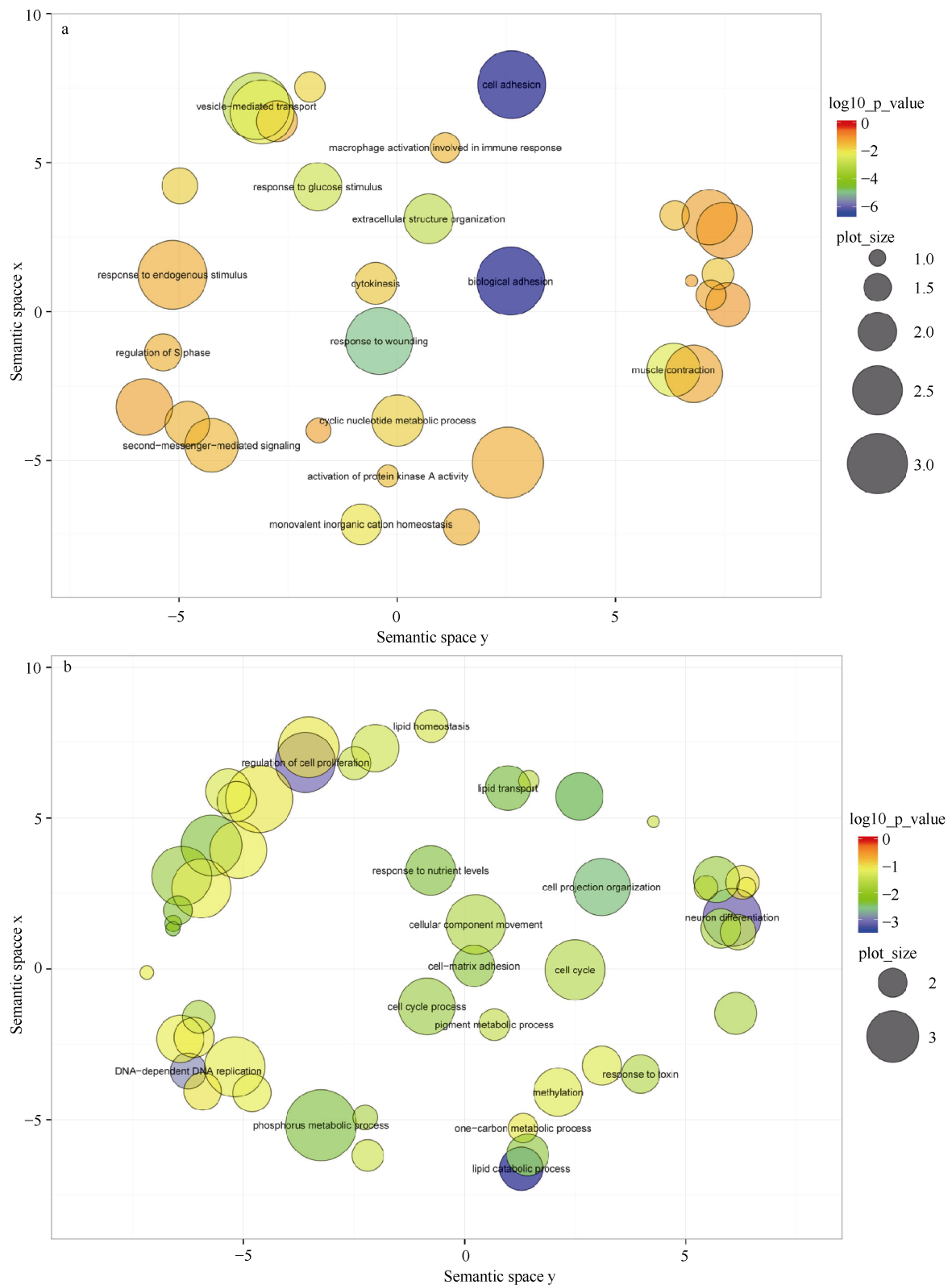


图 3 正选择基因 Go terms 聚类散点图

Figure 3 Scatterplots for enrichment and clustering analysis

语义越相近的 Go-term 在图中距离越近; 颜色和点的大小依  $\log_{10}P$  值的变化而变化; a:小棕蝠; b:大狐蝠。

More semantically similar GO terms were also closer in the plot; the color and size of the plot was dependent on the  $\log_{10}P$  value; a: *Myotis lucifugus*; b: *Pteropus vampyrus*.

联反应调节：regulation of MAPKKK cascade： $P=0.08$ )等，以及 KEGG 信号通路 hsa04666 (Fc gamma R 介导的细胞吞噬作用 Fc gamma

R-mediated phagocytosis:  $P=0.08$ )等。其他富集显著的类别见图 3b，附表 3（本刊网站 Supporting info）。两种蝙蝠不同富集类别的比较见图 4。

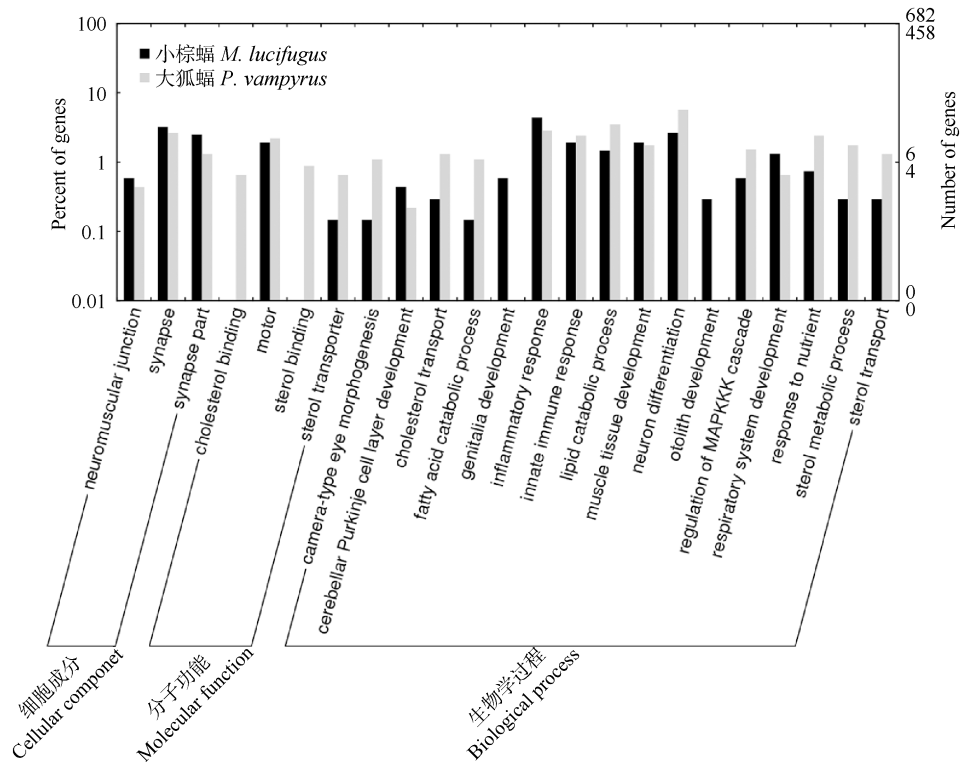


图 4 小棕蝠或大狐蝠正选择基因显著富集的部分 Go-terms

Figure 4 Significantly enriched Go-terms in *Myotis lucifugus* and *Pteropus vampyrus*

### 3 讨论

自然选择在宏观水平对动物施加影响，选择压力分析是研究动物适应性进化的有力手段。动物是否能够进化出新的功能或性状来适应环境压力，则取决于分子水平突变的产生和固定。在产生新功能的过程中，一些能够提高动物在某种特定环境相对适应系数的非同义替换突变被固定下来。带有这些有利突变的基因型要么获得了更高的作用活性，要么获得了新功能，以适应更加复杂的生物功能。由于选择压力分析计算非同义突变和同义突变率的比值，因此，非常适用于追踪物种间功能分化过程中留下的痕迹。我们使用分歧-位点模型，正是基于其所探测到的正选择信号在适应性进化中可能发挥的重要作用。本研究以小棕蝠为前景枝探测到的正选择基因数高于以大狐蝠为前景枝探测到的正选择基因数 (835: 592,  $P \leq 0.001$ , 卡方检验)。在两个蝙蝠物种受到正选择基因里，仅 62 个基因在

两个物种中都受到正选择，而绝大部分正选择基因仅在一个物种中出现。功能聚类结果也表明，这些独立出现的正选择基因，在两个物种中绝大部分分布于不同的功能类别，因此，对小棕蝠和大狐蝠全基因组选择压力的分析表明两种蝙蝠在适应性进化方向上发生了较大分化。

小棕蝠中，独立受到正选择的基因主要富集在与免疫功能 and 神经介导的运动相关的功能中。富集的免疫相关生物学过程包括炎症反应 (GO:0006954) 和天然免疫应答 (GO:0045087)，富集的免疫相关通路包括白血球穿内皮细胞层 (hsa04670)。以往的选择压力分析表明，免疫和生殖相关基因往往容易受到正选择，我们的分析也验证了这一点。蝙蝠的免疫功能特殊，它们是多达 80 种病毒的宿主，还有新的病毒在其体内被不断发现 (Calisher et al, 2006; Wong et al, 2007)，其中包括埃博拉病毒 (Ebola)、亨德拉病毒 (Hendra)、尼帕病毒 (Nipah) 和轮状病毒 (SARS-like coronaviruses)

等会对人类致死或造成严重损害, 而对蝙蝠无害 (Calisher et al, 2006)。因此, 蝙蝠和病毒长期的共同进化, 可能使得蝙蝠的免疫系统发生了适应性进化, 以面对不同病毒的侵袭。其相关机制, 有一种假说认为蝙蝠的天然免疫系统可以在病毒复制初期抑制复制。在小棕蝠正选择基因中富集于天然免疫系统和相关功能的基因, 可能与这些免疫机制有关。此外, 有研究表明蝙蝠的不同食性和筑巢行为对免疫功能有较大影响 (Allen et al, 2008), 且在一些与免疫有关的基因重复事件和病毒元件插入事件中, 食果蝠和食虫蝠基因组差异显著 (Zhang et al, 2012)。本研究中小棕蝠的正选择基因在免疫功能方面的显著富集 (而大狐蝠正选择基因在此功能富集不显著) 可能反映了两种蝙蝠免疫功能的差异。正选择基因所富集的神经介导运动功能的生物学过程包括: 肌肉组织发育 (GO:0060537)、运动活性 (GO:0003774)、突触 (GO:0044456)、神经肌肉接头 (GO:0031594)、小脑蒲式细胞层 (GO:0021680) 和耳石发育 (GO:0048840) 等。其中, 神经肌肉接头与肌肉接受神经冲动信号与发出动作有关, 小脑蒲式细胞层和耳石都与动物运动平衡有关 (Fries et al, 1993; Schiffmann et al, 1999)。回声定位的小棕蝠对神经-运动反馈效率和精度有较高要求。回声定位过程中, 蝙蝠要不断收集和分析回声信号, 运动系统则要随时根据分析结果作出实时快速反应。正选择基因的富集情况提示这些基因在该功能中可能起到的作用。

在大狐蝠中独立受到正选择的基因主要富集在营养物质代谢 (主要是脂类代谢, 固醇代谢)、神

经元和眼部形态发育功能中。富集的涉及营养代谢的生物学过程包括: 营养反应 (GO:0007584)、脂质代谢 (GO:0016042)、脂肪酸代谢 (GO:0009062)、固醇运输 (GO:0015918)、固醇平衡 (GO:0055092)、胆固醇平衡 (GO:0042632) 和脂肪酸氧化 (GO:0019395) 等。大狐蝠的主要食物是果实, 脂类含量极低。正选择基因在脂质代谢相关基因中的富集可能提示了狐蝠由于食物的原因对脂类代谢和合成有更高的选择压力。而正选择在眼部形态发育功能 (GO:0048593) 的富集, 则可能与大狐蝠的大眼睛和发达的暗视觉功能有关。

在一些功能中, 小棕蝠和大狐蝠的正选择功能富集情况有很大差异 (图 4)。例如和固醇代谢的许多基因集中, 大狐蝠中受到正选择的基因都高于小棕蝠, 特别是 sterol binding (包括 cholesterol binding) 这个功能中, 大狐蝠的正选择基因是 4 个, 而小棕蝠的正选择基因数为 0。而在耳石发育 (otolith development) 和生殖器发育 (genitalia development) 功能中, 小棕蝠的正选择基因数远高于大狐蝠 (分别为 4:0 及 2:0)。这些现象均表明, 小棕蝠和大狐蝠的食性、感觉系统以及其他行为学和生理学差异导致了其适应性进化方向发生分化。后续研究, 包括结合转录组和蛋白组数据来分析正选择基因在不同物种中的基因表达情况, 可以为这些预测提供更好的功能支持。

**致谢:** 感谢云南大学研究生陈星对论文撰写方面的帮助。

## 参考文献:

- Acharya KK, Roy A, Krishna A. 1998. Relative role of olfactory cues and certain non-olfactory factors in foraging of fruit-eating bats. *Behavioural Processes*, **44**(1): 59-64.
- Allen LC, Turmelle AS, Mendonça MT, Navara KJ, Kunz TH, McCracken GF. 2008. Roosting ecology and variation in adaptive and innate immune system function in the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *Journal of Comparative Physiology B*, **179**(3): 315-323.
- Belwood JJ, Fenton MB. 1976. Variation in the diet of *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Canadian Journal of Zoology*, **54**(10): 1674-1678.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)*, **57**(1): 289-300.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmesand KV, Schountz T. 2006. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**(3): 531-545.
- Fenton MB, Bell GP. 1979. Echolocation and feeding behaviour in four species of *Myotis* (Chiroptera). *Canadian Journal of Zoology*, **57**(6): 1271-1277.
- Fenton MB, Barclay RM. 1980. *Myotis lucifugus*. American Society of Mammalogists, Mammalian Species, (1980): 1-8.
- Fries W, Dieterich M, Brandt T. 1993. Otolith contributions to postural control in man: Short latency motor responses following sound stimulation in a case of otolithic Tullio phenomenon. *Gait & Posture*, **1**(3): 145-153.
- Kunz TH, Jones DP. 2000. *Pteropus Vampyrus*. Mammalian Species: 1-6.
- Lēkagul B, McNeely JA. 1977. Mammals of Thailand. Bangkok: Association for the Conservation of Wildlife.

- Murphy WJ. 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using bayesian phylogenetics. *Science*, **294**(5550): 2348-2351.
- Payne J, Francisand CM, Phillipps K. 1985. A Field Guide to the Mammals of Borneo. Kota Kinabalu: Sabah Society; Kuala Lumpur: World Wildlife Fund Malaysia.
- Phillips CJ. 2000. A theoretical consideration of dental morphology, ontogeny, and evolution in bats. In: Adams RA, Pedersen SC. *Ontogeny, Functional Ecology, and Evolution of Bats*. Cambridge: Cambridge University Press, 247-274.
- Sánchez F, Korine C, Steeghs M, Laarhoven LJ, Cristescu SM, Harren FJM, Dudleyand R, Pinshow B. 2006. Ethanol and methanol as possible odor cues for egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*). *Journal of Chemical Ecology*, **32**(6): 1289-1300.
- Schiffmann SN, Cheron G, Lohof A, d'Alcantara P, Meyer M, Parmentier M, Schurmans S. 1999. Impaired motor coordination and Purkinje cell excitability in mice lacking calretinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(9): 5257-5262.
- Schnitzler HU, Kalko EK. 1998. How echolocating bats search and find food. In: Kunz TH, Racey PA. *Bat biology and conservation*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 183-196.
- Schnitzler HU, Kalko EK. 2001. Echolocation by insect-eating bats. *Bioscience*, **51**(7): 557-569.
- Shen YY, Zhou WP, Zhou TC, Zeng YN, Li GM, Irwinand DM, Zhang YP. 2012. Genome-wide scan for bats and dolphin to detect their genetic basis for New Locomotive styles. *PLoS ONE*, **7**(11): e46455.
- Simmons NB, Wilson D, Reeder D. 2005. Order chiroptera. *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*, **1**: 312-529.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, **6**(7): e21800.
- Wong S, Lau S, Wooand P, Yuen KY. 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Reviews in Medical Virology*, **17**(2): 67-91.
- Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, Wang J, Li S, Liand R, Bolund L. 2006. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, **34** (suppl 2): W293-W297.
- Zhang GJ, Cowled C, Shi ZL, Huang ZY, Bishop-Lilly KA, Fang XD, Wynne JW, Xiong ZQ, Baker ML, Zhao W, Tachedjian M, Zhu YB, Zhou P, Jiang XT, Ng J, Yang L, Wu LJ, Xiao J, Feng Y, Chen YX, Sun XQ, Zhang Y, Marsh GA, Crameri G, Broder CC, Frey KG, Wang LF, Wang J. 2012. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science*, **339**(6118): 456-460.