

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第31卷 第6期 Vol.31 No.6 2011

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENTAI XUEBAO)

第31卷 第6期 2011年3月 (半月刊)

目 次

- 臭氧胁迫对水稻生长以及C、N、S元素分配的影响 郑飞翔,王效科,侯培强,等 (1479)
高含氮稻田深层土壤的氨氧化古菌和厌氧氨氧化菌共存及对氮循环的影响 王雨,祝贵兵,王朝旭,等 (1487)
气候年际变率对全球植被平均分布的影响 邵璞,曾晓东 (1494)
模拟升温和放牧对高寒草甸土壤有机碳组分和微生物生物量的影响 王蓓,孙庚,罗鹏,等 (1506)
广州城区生态安全岛典型植物群落结构及物种多样性 莫丹,管东生,黄康有,等 (1515)
中亚热带湿地松人工林生长过程 马泽清,刘琪璟,王辉民,等 (1525)
潜流人工湿地中植物对氮磷净化的影响 刘树元,阎百兴,王莉霞 (1538)
模拟氮沉降对两种竹林不同凋落物组分分解过程养分释放的影响 涂利华,胡庭兴,张健,等 (1547)
苔藓植物对贵州丹寨汞矿区汞污染的生态监测 刘荣相,王智慧,张朝晖 (1558)
三峡库区泥、沙沉降对低位狗牙根种群的影响 李强,丁武泉,朱启红,等 (1567)
上海崇明东滩互花米草种子产量及其萌发对温度的响应 祝振昌,张利权,肖德荣 (1574)
栲-木荷林凋落叶混合分解对土壤有机碳的影响 张晓鹏,潘开文,王进闻,等 (1582)
荒漠化对毛乌素沙地土壤呼吸及生态系统碳固持的影响 丁金枝,来利明,赵学春,等 (1594)
黄土丘陵沟壑区小流域土壤有机碳空间分布及其影响因素 孙文义,郭胜利 (1604)
种间互作和施氮对蚕豆/玉米间作生态系统地上部和地下部生长的影响 李玉英,胡汉升,程序,等 (1617)
测墒补灌对冬小麦氮素积累与转运及籽粒产量的影响 韩占江,于振文,王东,等 (1631)
植被生化组分光谱模型抗土壤背景的能力 孙林,程丽娟 (1641)
北方两省农牧交错带沙棘根围AM真菌与球囊霉素空间分布 贺学礼,陈程,何博 (1653)
基于水源涵养的流域适宜森林覆盖率研究——以平通河流域(平武段)为例 朱志芳,龚固堂,陈俊华,等 (1662)
黑龙江大兴安岭呼中林区火烧点格局分析及影响因素 刘志华,杨健,贺红士,等 (1669)
大兴安岭小尺度草甸火燃烧效率 王明玉,舒立福,宋光辉,等 (1678)
长江口中华鲟自然保护区底层鱼类的群落结构特征 张涛,庄平,章龙珍,等 (1687)
骨顶鸡等游禽对不同人为干扰的行为响应 张微微,马建章,李金波 (1695)
光周期对白头鹎体重、器官重量和能量代谢的影响 倪小英,林琳,周菲菲,等 (1703)
应用稳定同位素技术分析华北部分地区第三代棉铃虫虫源性质 叶乐夫,付雪,谢宝瑜,等 (1714)
西花蓟马对蔬菜寄主的选择性 袁成明,郅军锐,曹宇,等 (1720)
基于Cyt b基因序列分析的松毛虫种群遗传结构研究 高宝嘉,张学卫,周国娜,等 (1727)
沼液的定价方法及其应用效果 张昌爱,刘英,曹曼,等 (1735)
垃圾堆肥基质对不同草坪植物生态及质量特征的影响 赵树兰,廉菲,多立安 (1742)
五氯酚在稻田中的降解动态及生物有效性 王诗生,李德鹏 (1749)
专论与综述
景观遗传学:概念与方法 薛亚东,李丽,吴巩胜,等 (1756)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 284 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 31 * 2011-03



封面图说:美丽优雅的新疆夏尔西里森林草地原始景观。夏尔西里国家级自然保护区建立在新疆博乐北部山区无人干扰的中哈边境上,图中雪地云杉为当地的优势树种。

彩图提供:国家林业局陈建伟教授 E-mail: cites.chenjw@163.com

基于 Cyt b 基因序列分析的松毛虫种群遗传结构研究

高宝嘉^{1,2,*}, 张学卫¹, 周国娜¹, 刘军侠¹

(1. 河北农业大学林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北北方学院, 河北 张家口 075000)

摘要:为了揭示松毛虫种群的遗传结构,采用DNA序列测定的方法测定了松毛虫不同种群的线粒体细胞色素b(Cyt b)基因的部分序列,并利用分子生物学软件分析其核苷酸组成、转换和颠换、氨基酸组成、遗传距离及亲缘关系。结果显示:在获得的Cyt b基因387bp的序列中碱基A,T,C,G平均含量分别为40.1%、33.5%、9.5%、16.9%,A+T含量明显高于G+C含量表现出强烈的A,T偏向性,密码子第3位点的A+T含量高达86.5%,这种偏向性在种群间无明显差异。碱基替换主要发生在密码子第三位,转换大于颠换,且种群内替换高于种群间。该序列片段中共有39个核苷酸位点发生变异,遗传距离为0.000—0.100,显示出较小的遗传变异。蛋白质氨基酸由除谷氨酸以外的19种氨基酸组成。聚类分析结果表明马尾松毛虫和油松毛虫亚种遗传距离较近,种群间的遗传分化与生态环境有关。

关键词:松毛虫; Cytb 基因; 遗传结构

Genetic structure of Pine caterpillars (*Dendrolimus*) populations based on the analysis of Cyt b gene sequences

GAO Baojia^{1,2,*}, ZHANG Xuewei¹, ZHOU Guona¹, LIU Junxia¹

1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China

2. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: As the major forest pest in China, *Dendrolimus* includes *Dendrolimus punctatus* Walker, *D. tabulaeformis* Tsai et Liu, *D. spectabilis* Butler, *D. superans* Butler, *D. houi* Lajonquiere and *D. kikuchii* Matsumura. During sequential outbreaks, economic damage was serious and the forest appeared to be burned. So a large number of studies were carried out at different levels but the research concerning the genetic variation and differentiation of populations based on a single specific gene mutation has not been reported. In order to clarify the genetic structure of the populations of *Dendrolimus*, and provide the scientific basis for prevention and treatment of *Dendrolimus*, a fragment with 387 bp of the mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene sequence in different populations of *D. punctatus* Walker, *D. spectabilis* Butler and *D. tabulaeformis* Tsai et Liu was amplified and sequenced. Nucleotide composition, transitions and transversions, amino acid composition, genetic distance, and the phylogenetic relationship were analyzed with molecular biology software. The results indicated that the average contents of A, T, C and G were 40.1%, 33.5%, 9.5% and 16.9%, respectively, and the contents of A+T 73.6% were obviously higher than that of C+G 26.4%. Cyt b exhibits an A/T bias across all sites which was the most prominent at the third position of codon with the highest content of 86.5% but only 1.1% of C at the same position. There was no significant difference for A/T bias in the populations. Nucleotide substitution occurred mostly at the third position. Transitions were greater than transversions, while substitutions of intraspecific populations were higher than interspecific populations. Thirty nine nucleotide sites and eleven amino acids showed mutation in this sequence fragment and the variability were 10.1% and 8.5%. Nucleotide sequences and amino acid sequences in genetic distance were 0.000—0.100 and 0.000—0.086, indicating a low genetic variation. The amino acid sequences were believed to be more accurate than nucleotide sequences in genetic distance. Polypeptide is composed of nineteen amino acids except for glutamic

基金项目:国家自然科学基金(30771739)

收稿日期:2010-01-24; 修订日期:2011-01-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: baojiagao@163.com

acid and amino acid differences have little to do with populations. The most common amino acids and codons are lysine [AAA] and asparagine [AAU]. The average content of AAA and AAU is 15.00% and 10.63%, respectively. Cluster analysis showed that the genetic distance between *D. punctatus* Walker and *D. tabulaeformis* is relatively close, while genetic differentiation exists between *D. punctatus* Walker and *D. spectabilis* Butler. The population genetic differentiation was related to ecological environment. These results provided a basic molecular biology clue to the studies on population genetics and ecological control of *Dendrolimus*.

Key Words: Pine caterpillars (*Dendrolimus*) ; Cytochrome b gene; genetic structure

近年来,学者们应用同工酶、RAPD、AFLP、SSR、ISSR 及线粒体 DNA 等技术,对昆虫种群的遗传多样性与遗传分化进行了大量研究,研究结果表明,昆虫种群种内遗传变异大于种间;专食性物种遗传变异低,杂食性物种遗传变异高;群体间遗传分化取决于地理隔离作用和生境异质性,距离越远分化越明显,生境异质性越高遗传分化程度越高。

线粒体 DNA (mtDNA) 属于核外 DNA,具有分子结构简单,序列组成保守,不易发生突变,进化速度快,不同区域进化速度存在差异的特点。mtDNA 的较短的一个基因片段内就能包含种下水平乃至科水平的相关信息,更适合于从种级甚至更高阶元水平上进行研究。从 mtDNA 水平来研究昆虫种群的遗传和变异,将着眼点集中于核外 DNA 的具体的某个基因或基因片段,以期通过单个基因的变异来进一步反应群体的变异特点,进而反应群体间的遗传分化。该技术已逐渐成为研究昆虫种群遗传结构的重要的新型分子标记,利用 mtDNA 作为标记进行的研究在过去的几十年中发展很快^[1-9],目前已广泛应用于直翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅目、同翅目、半翅目、原尾目等部分昆虫类群的系统发育、种群遗传变异和分化研究。

松毛虫是我国危害最严重的森林害虫之一。其中南方以马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus punctatus* Walker) 分布最广,危害最重。北方以油松毛虫 (*D. punctatus tabulaeformis* Tsai et Liu),赤松毛虫 (*D. punctatus spectabilis* Butler) 和落叶松毛虫 (*D. superans* Butler) 等连年成灾、危害最重。不少学者相继运用分子杂交、同工酶分析、RAPD、AFLP、SSR 等多种手段对其亲缘关系和遗传结构与分化进行了大量的研究^[10-15],研究表明前三者为同一个物种的不同亚种^[14]。但这些研究多是以总 DNA 为基础进行的而非通过单个的具体基因的变异来反应种群的遗传变异和分化,且所用方法比较陈旧有些方法的稳定性差,结果可信度偏低。因此本文将选用昆虫线粒体 DNA 13 个编码蛋白质的基因中结构及功能研究最为清楚的 Cyt b 基因部分编码区为目的基因,运用测序这一新型分析技术对松毛虫的不同种群的遗传结构进行研究,以期通过分析特定基因片段的变异来探讨其遗传结构及影响因素,为松毛虫虫害的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试虫材料

实验以松毛虫的 5 个种群(包括马尾松毛虫、赤松毛虫各 1 个种群和油松毛虫亚种的 3 个种群)作为实验材料,各种群供试样本数、种群信息及采集地信息见表 1。

表 1 松毛虫种群的采集地信息

Table 1 Origin of the tested *Dendrolimus* materials

种群 Populations	种群代码 Code	采集地点 Site	地理位置 Location		样本数 Samples
			E	N	
马尾松毛虫 <i>D. punctatus punctatus</i> Walker	GYM	湖南桂阳县	E112°29'	N25°55'	3
赤松毛虫(亚种) <i>D. punctatus spectabilis</i> Butler	SYC	辽宁沈阳	E119°23'	N41°11'	2
油松毛虫(亚种) <i>D. punctatus tabulaeformis</i> Tsai et Liu	HTLZYC	河北平泉县黄土梁子油松纯林	E118°46'	N41°27'	9
	PQYC	河北平泉县油松纯林	E118°63'	N41°11'	4
	HTLZYH	河北平泉县黄土梁子油松混交林	E118°45'	N41°14'	5

1.1.2 实验仪器

仪器:灭菌锅、水浴锅、离心机、电泳仪、PCR 仪、摇床、洁净工作台。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

本研究中所用的松毛虫样品均为室内羽化后直接冷冻的单头松毛虫成虫,取中后胸肌肉(去掉表皮约后为 0.1 g)置于提前预冷的研钵中,加入适量液氮迅速研磨成粉末置于 1.5 mL Eppendorf 管中参考 SDS-蛋白酶 K 消化法提取总 DNA。

DNA 提取结束后取 4 μL 所得基因组 DNA 用 0.8% 的琼脂糖检测,剩余的基因组 DNA-20℃ 保存备用。

1.2.2 线粒体 DNA 细胞色素 b 片段 PCR 扩增

PCR 扩增的目标片段为线粒体 DNA 细胞色素 b (Cyt b) 基因编码区中一段 DNA 序列,引物设计参考 Simon 等^[16]。引物序列为:

CB-1 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3'

CB-2 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3'

每一样品的扩增体积为 50 μL,内含 50ngDNA 模板溶液模板、引物 0.20 μmol/L、dNTP 0.3 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.0U、Mg²⁺ 2.5 mmol/L, PCR buffer 5 μL, 加 ddH₂O 补足至终体积 50 μL。扩增条件为:94℃ 预变性 3 min, 35 个循环, 包括 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 60 s, 最后在 72℃ 充分延伸 5 min, 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物回收、测序

由于所选目的片段较短采用单向测序即可获得满意结果,所以将扩增效果良好且足量的样品委托三博远志生物有限公司进行测序。序列分析仪为 ABI 公司 377 型全自动序列分析仪。

1.2.4 DNA 序列数据的处理

测序所得的每条序列利用 DNASTar 软件包中的 SeqMen 软件进行校对,舍弃两端低信号序列,对序列内部每一微安再进行人工校对,以保证测序结构的准确性。确定序列后,在 NCBI 中用 BLAST 进行相似性搜索,确定所得序列是否为目标基因片段。最后将这些序列用 Clustal W 软件对该基因序列及氨基酸序列进行比对。用分子遗传分析软件 Mega 4.1 计算不同序列间的可变位点、简约信息位点、转换颠换比值、遗传距离及各碱基含量。采用邻接法(neighbor-joining method, NJ)、最简约法(maximum parsimony, MP) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取与基因测序

提取出的 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 SDS-蛋白酶 K 法提取的 DNA 带型整齐一致,结构完整,几乎无降解现象(图 1)。

以总 DNA 为模板,利用引物对 CB-1\CB-2 扩增,所有样品均得到一条特异 PCR 产物(图 2)约 500bp,且 3 次重复试验结果一致。由此可以确定所得到的序列为 mtDNA Cyt b 基因序列,而非核中线粒体假基因,并对扩增产物进行测序。

2.2 Cyt b 基因序列组成及变异

所得序列截去引物及低信号序列全部对准后共获得 389bp 的序列。氨基酸翻译分析表明所测定的序列的第一个碱基为前一氨基酸密码子的第 2 位,为了便于分析,从第三位开始分析,因此序列共有长度 387bp,共编码 129 个氨基酸。

将对准的 387bp 的序列采用 Mega 4.1 软件进行碱基组成的分析,在已测定的松毛虫的细胞色素 b 基因的序列中共有 387bp,不变位点的数目 348 个,变异位点数 39 个,简约信息位点 27 个,自裔位点 12 个,序列变异性为 10.1%。A, T, C, G 平均含量分别为 40.1%、33.5%、9.5%、16.9%, A+T 含量为 73.6% (湖南桂阳种群 73%、辽宁沈阳种群 73.8%、河北种群 73.6%, 种群间差异较小), 而 G+C 含量为 26.4%, A+T 含量明显高

于G+C含量,这与昆虫一般的核苷酸频率相一致。在密码子的不同位点,碱基组成表现出很大的差异。不同密码子位点的核苷酸频率及A+T含量见表2。

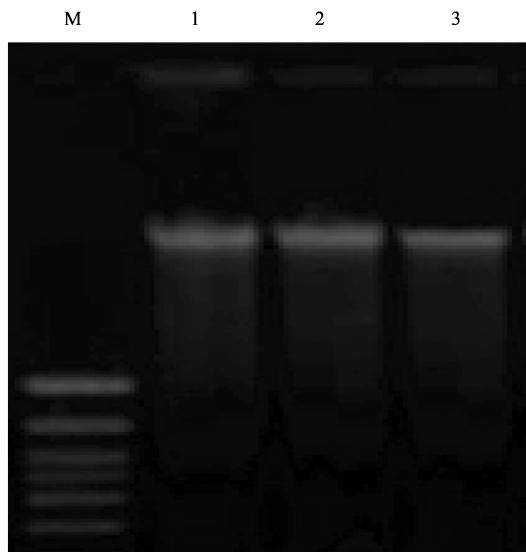


图1 SDS-蛋白酶K法提取的DNA电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis photograph of DNA extracted by SDS-protein K method

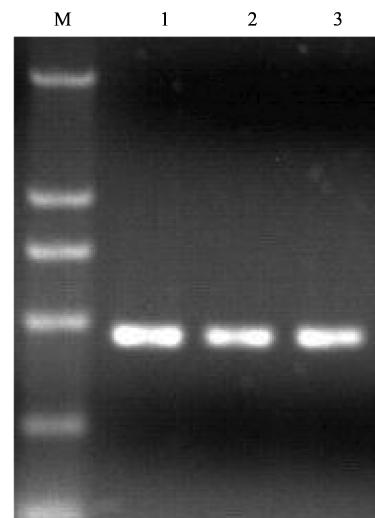


图2 PCR扩增检测结果

Fig.2 Results of PCR amplification

M:标准DNA分子量1、2、3 PCR扩增产物

表2 密码子不同位点碱基频率及碱基替换

Table 2 Nucleotide Frequency and Substitution of Codon in Vary Site

密码子位点 Codon sites	T	C	A	G	A+T	Ts	Tv	Ts/Tv
第一位 First	23	10.0	46.9	20.0	69.9	0	1	0
第二位 Second	31	17.5	34.0	17.8	65	1	1	1.33
第三位 Third	47	1.1	39.5	12.8	86.5	6	2	3.04
总的碱基频率 total	33.5	9.5	40.1	16.9	73.6	6	4	1.45

从表2可看出:在密码子的第三位点,A+T含量远高于G+C含量的偏向更加明显,而且在所有种群中,C的含量特别少,只有1.1%,且在种群间差异较小(0.9%—1.2%),河北混交林种群密码子第三位点C的含量为0.9%,湖南桂阳种群密码子第三位点C的含量为1.0%,辽宁沈阳种群和河北的两个纯林种群含量为1.2%,T的使用特别频繁达到47%。反映出Cyt b基因在密码子使用上具有偏向性。

运用Mega4.1软件统计两两序列之间核苷酸转换(Ts)和颠换(Tv)数及其R值(Ts/Tv)的结果见表3。从表中可以看出松毛虫Cyt b序列的转换数多于颠换数,不同密码子位点的核苷酸替换也表现出了很大差异,特别是在密码子第三位点,转换与颠换发生的频率均明显高于第一、二位点,转换占所有转换总数的85.7%,颠换占总颠换的50%,转换多于颠换。湖南的桂阳种群、辽宁的沈阳种群间无明显差异,但在河北的

表3 核苷酸不同位点的碱基频率及碱基替换

Table 3 The base frequency and substitution of nucleotide codes each sites

密码子位点 Codon sites	ii	Ts	Tv	R	TT	TC	TA	TG	CC	CA	CG	AA	AG	GG
平均 Avg	380	6	4	1.45	139	1	3	0	37	1	0	152	5	63
第一位 First	130	0	1	0	30	0	1	0	13	0	0	61	0	26
第二位 Second	129	1	1	1.33	39	0	0	0	23	0	0	44	0	13
第三位 Third	122	6	2	3.04	59	1	2	0	1	0	0	48	5	14

ii:一致位点;Ts:转换数;Tv:颠换数;R:Ts/Tv

3个种群间密码子替换数差异较大:河北混交林种群有5个碱基发生替换,其中4个转换1个颠换,而两个纯林种群均只有一个碱基发生替换且表现为转换,没有颠换发生,说明种群内不同群体间碱基变异大于种群间。总体转换颠换之比为1.45,说明松毛虫种群该序列的碱基替换已达到饱和状态^[17],序列差异数较少遗传结构稳定。

2.3 遗传距离分析

利用Mega4.1软件,基于Kimura 2-parameters模型计算了两两序列间核苷酸的遗传距离,基于p-distance模型计算了氨基酸的遗传距离(表4)。由表4可知核苷酸遗传距离在0.000—0.100之间,氨基酸遗传距离范围在0.000—0.086之间,两组数据一致显示湖南桂阳种群和沈阳种群遗传距离最大,说明这两个种群间出现了遗传分化。

表4 Cyt b 基因遗传距离成对比较(核苷酸,左下;氨基酸,右上)

Table 4 Pairwise distance of Cyt b gene sequence (nucleotides, lower triangle; amino acid, up triangle)

种群代码 Code	GYM	SYC	HTLZYC	PQYC	HTLZYH
GYM		0.086	0.016	0.016	0.016
SYC	0.100		0.070	0.070	0.070
HTLZYC	0.013	0.094		0.000	0.000
PQYC	0.013	0.094	0.000		0.000
HTLZYH	0.010	0.091	0.003	0.003	

2.4 遗传密码和密码子的使用

用Mega4.1软件统计松毛虫种群mtDNA Cyt b编码区的氨基酸组成(表5)。由表5可知所测基因序列共编码129个氨基酸,其中有11个发生变异,占总数的8.5%。密码子以A结尾频率高,而第三位是C的密码子使用较少,反映出Cyt b基因在密码子的使用上具有偏向性。在密码子应用上,第一位为A的氨基酸(赖氨酸lysine[AAA]、天冬酰胺asparagine[AAU])使用频率较高,这两种氨基酸占整个蛋白质氨基酸的25.63%(Lys15.00%,Asn10.63%)。在5个种群中,谷氨酸(Glu)的含量很少,仅在沈阳种群(0.78%)中有少量存在,而在其它种群中则完全没有Glu的存在,说明各种群mtDNA Cyt b编码区的蛋白质氨基酸主要由除Glu以外的19种氨基酸组成,在氨基酸组成上具有一定偏向性。除Glu以外的19种氨基酸在各种内的分布稳定差异小,反映出种群间在氨基酸组成上的遗传差异较小。

表5 cyt b 蛋白质序列氨基酸组成

Table 5 amino acid composition of cyt b protein sequences

种群代码 Code	Ala	Gys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu
GYM	3.91	1.56	0.78	0.00	1.56	8.59	0.78	7.81	15.63	7.81
SYC	3.91	1.56	0.78	0.78	2.34	7.81	0.78	8.59	14.84	7.03
HTLZYC	3.91	1.56	0.78	0.00	1.56	8.59	0.78	7.81	14.84	7.81
PQYC	3.91	1.56	0.78	0.00	1.56	8.59	0.78	7.81	14.84	7.81
HTLZYH	3.91	1.56	0.78	0.00	1.56	8.59	0.78	7.81	14.84	7.81
Avg	3.91	1.56	0.78	0.16	1.72	8.44	0.78	7.97	15.00	7.66

种群代码 Code	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
GYM	6.25	9.38	5.47	2.34	0.78	8.59	3.91	7.03	3.91	3.91
SYC	5.47	10.94	5.47	1.56	0.78	7.81	3.13	7.03	4.69	4.69
HTLZYC	6.25	10.94	5.47	2.34	0.78	7.81	3.91	7.03	3.91	3.91
PQYC	6.25	10.94	5.47	2.34	0.78	7.81	3.91	7.03	3.91	3.91
HTLZYH	6.25	10.94	5.47	2.34	0.78	7.81	3.91	7.03	3.91	3.91
Avg	6.09	10.63	5.47	2.19	0.78	7.97	3.75	7.03	4.06	4.06

2.5 松毛虫不同种群的遗传距离聚类分析

采用Mega4.1软件包的NJ法和MP法根据遗传距离进行聚类分析(图3、4)。可以看出用NJ法和MP法两种方法所作聚类分析结果完全一致,能够反映出各种群间的关系。总体上看,大致可分为3支:首先在河北两个纯林种群形成1对姊妹群后再与混交林种群聚为1支,之后与湖南的桂阳种群聚为第2支,最后与辽宁的沈阳种群聚为第3支。这一结果表明松毛虫不同种群间主要按照所处生态环境形成了一定的遗传分化。

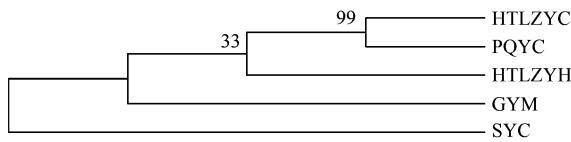


图3 最简约法构建松毛虫 *Cyt b* 基因的聚类图

Fig. 3 MP dendograms based on the *Cyt b* gene sequence of *Dendrolimus*

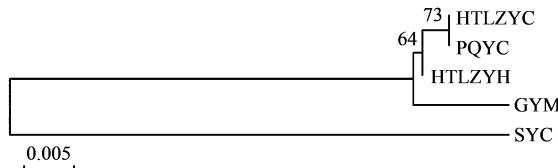


图4 邻接法构建的松毛虫 *Cyt b* 基因的聚类图

Fig. 4 NJ dendograms based on the *Cyt b* gene sequence of *Dendrolimus*

3 讨论

本研究基于对mtDNA *Cyt b* 基因部分序列的测定和分析,探讨了松毛虫不同种群间的遗传关系,结果表明种群间的遗传差异比较小(理论依据是由于遗传距离在0—0.1之间)。通过对所测得的 *Cyt b* 基因部分序列进行分析,结果表明松毛虫 *Cyt b* 序列的A+T平均含量为73.6%,明显高于G+C含量(26.4%),与其它昆虫相比较低^[1,3],但仍高于昆虫A+T的平均值(64%)。与其它文献报道的昆虫线粒体序列的结果较为一致^[18-19]。在密码子第三位点的A+T含量高达86.5%,较绢蝶(93.4%)、意大利蜜蜂(95.2%)以及果蝇(93.8%)在该位点上的A+T含量低^[20-22]。表明 *Cyt b* 基因在碱基组成上具有明显的偏好性。这种偏好性是由于第三位点的突变大多属于同义突变,受到的自然选择压力较小,突变后易固定;第一、第二位点则相反^[23]。

从碱基替换的结果看序列间转换多于颠换,符合在动物线粒体基因进化中,碱基的替换主要以转换为主的结论^[24],同有关研究的结论相一致^[25-27]。转换颠换之比的平均值为1.45,Knight等认为,转换颠换之比的值若小于2.0,则此基因序列突变已达到饱和状态^[17]。说明所测序列的碱基替换已达到饱和状态。从总体上看碱基替换主要发生在密码子的第三位点,占变异总数的85.7%,高于蝽亚科昆虫(73.5%)、漠甲(74.6%)、低于家蚕、野家蚕(89.74%)^[25,27-28],表现出极高的替换频率。转换多发生在A-G间,颠换主要发生在A-T间,与戴金霞、李爱玲等人发现转换的发生主要以C-T为主的研究结果不一致^[25,28]。密码子以A,T结尾频率高,这与果蝇相同^[29],笔者推测可能是因为序列A+T含量高所致。第一位为A的氨基酸使用频率较高,同潘兴丽的研究结果一致,谷氨酸仅存在于辽宁沈阳种群,表明在这些种类中, *Cyt b* 编码的这一部分的氨基酸序列是由19种氨基酸组成。除谷氨酸以外的19种氨基酸在种内分布都比较稳定,因此认为氨基酸的差异同种群的关系不大。

基于Kimura 2-parameters模型和p-distance模型计算了5个种群松毛虫两两序列间核苷酸及氨基酸的遗传距离得知两组数据一致显示湖南桂阳种群和沈阳种群遗传距离最大。比较核酸的遗传差异和氨基酸遗传差异的数值特点,从某种程度上反映出氨基酸序列要比核苷酸序列更保守更准确。

聚类分析结果(图3,图4)与王兴红用AFLP方法所作的研究的聚类结果相似,笔者认为各种群间主要按照所处生态环境而非地理距离形成了一定的遗传分化。通过分析,河北的纯林种群和混交林种群首先聚为一支这主要是因为它们同为油松毛虫亚种且采集地同为承德平泉,在地理距离上相聚较近、所处生态环境条件相似度高所致。但是之后先与桂阳种群聚为第二支之后才与沈阳种群聚为第三支,说明所处生态环境应该是导致松毛虫不同种群间产生遗传分化的主要原因,因为就采集地的实际情况而言湖南桂阳和承德平泉的地理距离较之辽宁沈阳更远,而与承德平泉的生态环境条件的相似度比辽宁沈阳更高,所以推断遗传分化的产

生主要取决于所处生态环境。

本研究所选取的是 Cyt b 基因的部分片段,所测得的 Cyt b 基因片段中所含有信息量有限,部分分支聚类的置信值偏低,部分类群供试样品数量相对较少,因而建议在后续研究中,应加大供试样品数量并采用基因全序列或多个基因序列的联合数据进行分析,以防止由部分序列变异的不均衡性而产生错误信息,以便得出更准确的结论。

4 结论

(1) 所获得序列中仅有 39 个核苷酸发生变异,变异较小,松毛虫种群间的遗传距离小,在 0—0.1 之间,种间的遗传差异比较小。

(2) 松毛虫种群序列的碱基组成具有强烈的 A、T 偏向性(73.6%),在密码子的第三位点,这种偏向更加明显(86.5%),A、T 偏向性在种群间无明显差异。碱基替换主要发生在密码子的第三位点且以转换为主,种群内碱基替换高于种群间。

(3) 松毛虫种群 mtDNA Cyt b 编码区密码子的使用也具有偏向性,该部分的蛋白质氨基酸主要由除谷氨酸以外的 19 种氨基酸组成,氨基酸组成在种群间无明显差异。

(4) 松毛虫种群的遗传分化与所处生态环境条件有关。

References:

- [1] Chen Y J, Zhang Y P, Shen F R, Zhang Y W, Yang D R, Niu L, Yang Y X. The phylogeny of 5 Chinese peculiar *parnassius* butterflies using noninvasive sampling mtDNA sequences. *Journal of Genetics and Genomics*, 1999, 26(3):203-207.
- [2] Huang Y C, Li W F, Lu W, Chen Y J, Zhang Y P. Mitochondrial DNA ND4 sequence variation and phylogeny of five species of Bostrichidae (Coleoptera). *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44(4):494-500.
- [3] Ren Z M, Ma E B, Guo Y P. The studies of the phylogeny of Acridoidea based on mtDNA sequences. *Journal of Genetics and Genomics*, 2002, 29(4):314-321.
- [4] Ren Z M, Ma E B, Guo Y P. Genetic relationships among *Oxya agavisa* and other relative species revealed by cyt b sequences. *Journal of Genetics and Genomics*, 2002, 29(6):507-513.
- [5] Ren Z M, Ma E B, Guo Y P. Mitochondrial DNA sequences and interrelationships of *Oxya intricata* individuals from different parts of China. *Acta Entomologica Sinica*, 2003, 46(1):51-57.
- [6] Luo C, Yao Y, Wang R J, Yan F M, Hu D X, Zhang Z L. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt CO I) gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(6):759-763.
- [7] Chen F S, Wei Z J, Li Q B, Bao X X, Wang T C. Molecular characterization of the Cytochrome Oxidase subunit II gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm *Samia cynthia ricini*. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30(1):38-43.
- [8] Wang R J, Wan H, Long Y, Lei G C, Li S W. Phylogenetic analysis of *Polyura* in China inferred from mitochondrial COII sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(2):243-247.
- [9] Chen N, Zhu G P, Hao J S, Zhang X P, Su C Y, Pan H C, Wu D X. Molecular phylogenetic analysis of the main lineages of Nymphalidae (Lepidoptera, Rhopalocera) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(1):106-115.
- [10] Zhang A B, Kong X B, Li D M, Liu Y Q. DNA fingerprinting evidence for the phylogenetic relationship of eight species and subspecies of *Dendrolimus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(2):236-242.
- [11] Gao B J, Gao L J, Hou J H, Shang J J, You L Q. Genetic diversity of *Dendrolimus* (Lepidoptera) population from different geographic area. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(2):842-848.
- [12] Yuan Y Y, Gao B J, Li M, Yuan S L, Zhou G N. The genetic diversity of *Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu in forests of different stand types. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(5):2099-2106.
- [13] Nangong Z Y, Gao B J, Liu J X, Yang J. Genetic diversity of geographical populations of four *Dendrolimus* species (Lepidoptera: Lasiocampidae) in China based on allozyme analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(4):417-423.
- [14] Zhao Q S, Wu W B, Lu G P, Chen T F, Lin Q Y. Study on cross heredity of pine caterpillars, *Dendrolimus* spp. *Scientia Silvae Sinicae*, 1999, 35(4):45-50.
- [15] Ji Y J, Hua Y P, Liu Y D, Liu H T, Shi C M, Li D M, Zhang D X. Ten polymorphic microsatellite markers developed in the mason pine moth *Dendrolimus punctatus* Walker (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(4):911-913.
- [16] Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87(6):651-701.
- [17] Knight A, Mindell D P. Mindell. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper. *Systems*

- Biology, 1993, 42(1): 18-31.
- [18] Brower A V Z, DeSalle R. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. Insect Molecular Biology, 1998, 7(1):73-82.
- [19] DeSalle R, Freedman T, Prager E M, Wilson A X. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of *Hawaiian Drosophila*. Journal of Molecular Evolution, 1987, 26(1/2):157-164.
- [20] Sun Q X, Zhang Y L. Analyses of DNA sequence polymorphism in the mitochondrial 16S rRNA gene of Pentatominae (Hemiptera: Pentatomidae). Entomotaxonomia, 2004, 26(2):107-113.
- [21] Crozier R H, Crozier Y C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics, 1993, 133(1):97-117.
- [22] Jermiin L S, Crozier R H. The cytochrome *b* region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufonigra*: Sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. Journal of Molecular Evolution, 1994, 38(3):282-294.
- [23] Zhou J L, Zhang Y P, Huang M H, Chen Y J, Chen X Q, Yao G D. Phylogenetic relationships among Crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(4):361-366.
- [24] Irwin D M, Koehler T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. Journal of Molecular Evolution, 1991, 32(2): 128-144.
- [25] Dai J X, Zhen Z M. Phylogenetic relationships of eleven species of Pentatominae based on sequences of cytochrome *b* gene. Chinese Bulletin of Entomology, 2005, 42(4):395-399.
- [26] Zeng W M, Jiang G F, Zhang D Y, Hong F. Evolutionary relationships among six Chinese grasshoppers of two genera of Catantopidae (Orthoptera: Acridoidea) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. Acta Entomologica Sinica, 2004, 47(2): 282-252.
- [27] Dai J X, Zhang D Z. Phylogenetic analysis of eight species of Pimeliinae based on CO II and Cyt *b* gene sequences. Chinese Bulletin of Entomology, 2008, 45(4):554-558.
- [28] Li A L, Xu A Y, Shen X J, Tang S M, Zhang Z F, Pan S Y. Analysis of segment sequences and molecular evolution between *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* using mitochondrial Cyt *b* gene. Acta Sericologica Sinica, 2004, 30(1): 80-84.
- [29] Flook P K, Rowell C H F, Gellissen G. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41(6):928-941.

参考文献:

- [1] 陈永久,张亚平,沈发荣,张云武,杨大荣,聂龙,杨跃雄.中国5种珍稀绢蝶非损伤性取样的mtDNA序列及系统进化.遗传学报,1999,26(3):203-207.
- [2] 黄永成,李伟丰,陆温,陈永久,张亚平.长蠹科几种检疫性害虫的ND4基因序列及系统进化.昆虫学报,2001,44(4):494-500.
- [3] 任竹梅,马恩波,郭亚平.蝗总科部分种类Cyt *b*基因序列及系统进化研究.遗传学报,2002,29(4):314-321.
- [4] 任竹梅,马恩波,郭亚平.山稻蝗及相关物种Cyt *b*基因序列及其遗传关系.遗传学报,2002,29(6):507-513.
- [5] 任竹梅,马恩波,郭亚平.不同地域小稻蝗mtDNA部分序列及其相互关系.昆虫学报,2003,46(1):51-57.
- [6] 罗晨,姚远,王戎疆,阎凤鸣,胡敦孝,张芝利.利用mtDNA CO I基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型.昆虫学报,2002,45(6):759-763.
- [7] 陈复生,魏兆军,李庆宝,鲍先巡,汪泰初.蓖麻蚕线粒体cox2基因的克隆、序列测定和分子系统学分析.蚕业科学,2004,30(1): 38-43.
- [8] 王戎疆,万宏,龙玉,雷光春,李绍文.利用线粒体CO II基因序列对中国尾蛱蝶属系统分化的研究(鳞翅目:蛱蝶科).昆虫学报,2004,47(2): 243-247.
- [9] 陈娜,朱国萍,郝家胜,张小平,苏成勇,潘鸿春,吴冬霞.基于线粒体16S rDNA序列探讨蛱蝶科(鳞翅目,蝶亚目)主要分类群的系统发生关系.动物学报,2007, 53(1): 106-115.
- [10] 张爱兵,孔祥波,李典漠,刘友樵.中国松毛虫属八个种和亚种亲缘关系的DNA指纹证据.昆虫学报,2004, 47(2):236-242.
- [11] 高宝嘉,高立杰,侯建华,商金杰,尤立权.三种松毛虫不同地理种群遗传多样性.生态学报,2008,28(2):842-848.
- [12] 袁一杨,高宝嘉,李明,袁胜亮,周国娜.不同林分类型下油松毛虫(*Dendrolimus tabulaeformis* Tsai et Liu)种群遗传多样性研究.生态学报,2008,28(5):2099-2106.
- [13] 南宫自艳,高宝嘉,刘军侠,杨君.四种松毛虫不同地理种群遗传多样性的等位酶分析.昆虫学报,2008,51(4):417-423.
- [14] 赵清山,邬文波,吕国平,陈泰峰,林庆源.松毛虫种间杂交及其遗传规律的研究.林业科学,1999,35(4):45-50.
- [20] 孙钦霞,张雅林.七种蝽mtDNA-16S rRNA基因序列多态性的研究(半翅目:蝽科).昆虫分类学报,2004,26(2):107-113.
- [23] 周继亮,张亚平,黄美华,陈永久,陈小青,姚耿东.蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育.动物学报,2001,47(4): 361-366.
- [25] 代金霞,郑哲民.基于Cyt *b*基因序列探讨蝽亚科11种昆虫的系统发育关系.昆虫知识,2005,42(4):395-399.
- [26] 曾维铭,蒋国芳,张大羽,洪芳.用12S rRNA基因序列研究斑腿蝗科二属六种的进化关系.昆虫学报,2004,47(2): 282-252.
- [27] 代金霞,张大治.基于线粒体CO II和Cyt *b*基因序列的8种漠甲系统发育关系.昆虫知识,2008, 45(4):554-558.
- [28] 李爱玲,徐安英,沈兴家,唐顺明,张志芳,潘沈元.家蚕、野桑蚕线粒体Cyt *b*基因片段序列分析及分子进化研究.蚕业科学,2004,30(1): 80-84.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 31 ,No. 6 March ,2011(Semimonthly)
CONTENTS

Influences of elevated ozone on growth and C, N, S allocations of rice	ZHENG Feixiang, WANG Xiaoke, HOU Peiqiang, et al (1479)
Coexistence, biodiversity and roles of ammonia-oxidizing archaea and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in deep soil layer of high nitrogen loaded paddy field	WANG Yu, ZHU Guibing, WANG Chaoxu, et al (1487)
The impact of interannual climate variability on the mean global vegetation distribution	SHAO Pu, ZENG Xiaodong (1494)
Labile and recalcitrant carbon and nitrogen pools of an alpine meadow soil from the eastern Qinghai-Tibetan Plateau subjected to experimental warming and grazing	WANG Bei, SUN Geng, LUO Peng, et al (1506)
The structure and species diversity of plant communities in ecological safety islands of urban Guangzhou	MO Dan, GUAN Dongsheng, HUANG Kangyou, et al (1515)
The growth pattern of <i>Pinus elliottii</i> Plantation in central subtropical China	MA Zeqing, LIU Qijing, WANG Huimin, et al (1525)
The effect of two wetland plants on nitrogen and phosphorus removal from the simulated paddy field runoff in two small-scale Subsurface Flow Constructed Wetlands	LIU Shuyuan, YAN Baixing, WANG Lixia (1538)
Effect of simulated nitrogen deposition on nutrient release in decomposition of several litter fractions of two bamboo species	TU Lihua, HU Tingxing, ZHANG Jian, et al (1547)
Ecological monitoring of bryophytes for mercury pollution in Danzhai Mercury Mine Area, Guizhou Province, China	LIU Rongxiang, WANG Zhihui, ZHANG Zhaohui (1558)
Influence of silt deposition and sand deposition on <i>Cynodon dactylon</i> population in low-water-level-fluctuating zone of the Three Gorges Reservoir	LI Qiang, DING Wuquan, ZHU Qihong, et al (1567)
Seed production of <i>Spartina alterniflora</i> and its response of germination to temperature at Chongming Dongtan, Shanghai	ZHU Zhenchang, ZHANG Liqian, XIAO Derong (1574)
Effects of decomposition of mixed leaf litters of the <i>Castanopsis platyacantha-Schima sinensis</i> forest on soil organic carbon	ZHANG Xiaopeng, PAN Kaiwen, WANG Jinchuang, et al (1582)
Effects of desertification on soil respiration and ecosystem carbon fixation in Mu Us sandy land	DING Jinzhi, LAI Liming, ZHAO Xuechun, et al (1594)
The spatial distribution of soil organic carbon and it's influencing factors in hilly region of the Loess Plateau	SUN Wenyi, GUO Shengli (1604)
Effects of interspecific interactions and nitrogen fertilization rates on above- and below- growth in faba bean/mazie intercropping system	LI Yuying, HU Hansheng, CHENG Xu, et al (1617)
Effects of supplemental irrigation based on measured soil moisture on nitrogen accumulation, distribution and grain yield in winter wheat	HAN Zhanjiang, YU Zhenwen, WANG Dong, et al (1631)
Anti-soil background capacity with vegetation biochemical component spectral model	SUN Lin, CHENG Lijuan (1641)
Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin of <i>Hippophae rhamnoides</i> L in farming-pastoral zone from the two northern provinces of China	HE Xueli, CHEN Cheng, HE Bo (1653)
Study on optimum forest coverage for water conservation: a case study in Pingtonghe watershed (Pingwu section)	ZHU Zhifang, GONG Gutang, CHEN Junhua, et al (1662)
Spatial point analysis of fire occurrence and its influence factor in Huzhong forest area of the Great Xing'an Mountains in Heilongjiang Province, China	LIU Zhihua, YANG Jian, HE Hongshi, et al (1669)
Combustion efficiency of small-scale meadow fire in Daxinganling Mountains	WANG Mingyu, SHU Lifu, SONG Guanghui, et al (1678)
Community structure of demersal fish in Nature Reserve of <i>Acipenser sinensis</i> in Yangtze River estuary	ZHANG Tao, ZHUANG Ping, ZHANG Longzhen, et al (1687)
Behavioral responses of the Common Coots (<i>Fulica atra</i>) and other swimming birds to human disturbances	ZHANG Weiwei, MA Jianzhang, LI Jinbo (1695)
Effects of photoperiod on body mass, organ masses and energy metabolism in Chinese bulbul (<i>Pycnonotus sinensis</i>)	NI Xiaoying, LIN Lin, ZHOU Feifei, et al (1703)
Larval host types for the 3 rd <i>Helicoverpa armigera</i> in Bt cotton field from North China determined by $\delta^{13}\text{C}$	YE Lefu, FU Xue, XIE Baoyu, et al (1714)
Selectivity of <i>Frankliniella occidentalis</i> to vegetable hosts	YUAN Chengming, ZHI Junrui, CAO Yu, et al (1720)
Genetic structure of <i>Pine caterpillars (Dendrolimus)</i> populations based on the analysis of Cyt b gene sequences	GAO Baojia, ZHANG Xuewei, ZHOU Guona, et al (1727)
Pricing method and application effects of biogas slurry	ZHANG Changai, LIU Ying, CAO Man, WANG Yanqin, et al (1735)
Effects of compost from municipal solid waste on ecological characteristics and the quality of different turfgrass cultivars	ZHAO Shulan, LIAN Fei, DUO Li'an (1742)
Degradation kinetics and bioavailability of pentachlorophenol in paddy soil-rice plant ecosystem	WANG Shisheng, LI Depeng (1749)
Review and Monograph	
Concepts and techniques of landscape genetics	XUE Yadong, LI Li, WU Gongsheng, ZHOU Yue (1756)

2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊*

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	11764	1	生态学报	1.812
2	应用生态学报	9430	2	植物生态学报	1.771
3	植物生态学报	4384	3	应用生态学报	1.733
4	西北植物学报	4177	4	生物多样性	1.553
5	生态学杂志	4048	5	生态学杂志	1.396
6	植物生理学通讯	3362	6	西北植物学报	0.986
7	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3327	7	兽类学报	0.894
8	MOLECULAR PLANT	1788	8	CELL RESEARCH	0.873
9	水生生物学报	1773	9	植物学报	0.841
10	遗传学报	1667	10	植物研究	0.809

*《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次, 全国排名第 1; 影响因子 1.812, 全国排名第 14; 第 1—9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊; 中国精品科技期刊

编辑部主任: 孔红梅

执行编辑: 刘天星 段 端

生态学报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 31 卷 第 6 期 (2011 年 3 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA

(Semimonthly, Started in 1981)

Vol. 31 No. 6 2011

编 辑 《生态学报》编辑部
地址: 北京海淀区双清路 18 号
邮政编码: 100085
电话: (010) 62941099
www. ecologica. cn
shengtaixuebao@ rcees. ac. cn

Edited by Editorial board of
ACTA ECOLOGICA SINICA
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
Tel: (010) 62941099
www. ecologica. cn
Shengtaixuebao@ rcees. ac. cn

主 编 冯宗炜
主 管 中国科学技术协会
主 办 中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
地址: 北京海淀区双清路 18 号
邮政编码: 100085

Editor-in-chief FENG Zong-Wei
Supervised by China Association for Science and Technology
Sponsored by Ecological Society of China
Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS
Add: 18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China

出 版 科 学 出 版 社
地址: 北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717

Published by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North Street,
Beijing 100717, China

印 刷 北京北林印刷厂
行 科 学 出 版 社
地址: 东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717
电话: (010) 64034563
E-mail: journal@ cspg. net

Printed by Beijing Bei Lin Printing House,
Beijing 100083, China
Distributed by Science Press
Add: 16 Donghuangchenggen North
Street, Beijing 100717, China
Tel: (010) 64034563
E-mail: journal@ cspg. net

订 购 全国各地邮局
国外发行 中国国际图书贸易总公司
地址: 北京 399 信箱
邮政编码: 100044

Domestic All Local Post Offices in China
Foreign China International Book Trading
Corporation
Add: P. O. Box 399 Beijing 100044, China

广告经营
许 可 证 京海工商广字第 8013 号

