

黄海伪虎鲸 mtDNA 控制区序列的测定和初步分析

张 婷^{1,2} 杨 光^{1,2 *} 周开亚^{1,2} 魏辅文³

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物资源技术重点实验室, 南京, 210097)

(2 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所, 南京, 210097)

(3 中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

摘要: 测定了黄海 7 头伪虎鲸 mtDNA 控制区 5' 端 533 bp 的序列, 共发现 54 个变异位点, 定义了 4 种单元型。最大似然法和邻接法的系统树均把单元型聚为 2 分支。两支之间没有共享单元型且无姊妹关系。分支间的核苷酸序列差异显著地超过了其它海豚类种间的序列差异水平, 提示传统意义上的伪虎鲸可能包括了具有显著遗传差别的不同物种, 迫切需要开展进一步的研究。

关键词: 伪虎鲸; 黄海水域; mtDNA 控制区; 物种分化

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 03 - 0219 - 05

An Initial Study on the Mitochondrial DNA Control Region Sequences of False Killer Whales (*Pseudorca crassidens*)

ZHANG Ting^{1,2} YANG Guang^{1,2 *} ZHOU Kaiya^{1,2} WEI Fuwen³

(1 Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097, China)

(2 Institute of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097, China)

(3 Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

Abstract: Five hundred and thirty three base pairs (bp) of the mitochondrial control region of seven false killer whales (*Pseudorca crassidens*) from the Yellow Sea in China were sequenced. Fifty-four variable sites were determined and four haplotypes were identified. Phylogenetic analyses using maximum likelihood and neighbor joining algorithms divided the haplotypes of false killer whales into two clades showing no sister relationship with each other. No shared haplotypes were found between the two clades. The average nucleotide divergence between the two clades is approximately 7.61 %, much higher than those between *Tursiops* species (5.58 %) and between *Delphinus* species (1.09 %), which suggested that the two clades represent respective species. Further study is urgently needed.

Key words: False killer whale (*Pseudorca crassidens*); MtDNA control region; Species differentiation; Yellow Sea

伪虎鲸 (*Pseudorca crassidens*) 是一种体型较大的海豚, 常见于热带至温暖带的近海水域, 在我国主要分布于渤海、黄海、东海、南海和台湾以东 (周开亚等, 2001)。该物种是最常发生集体搁浅的鲸类之一, 同时在其分布区的许多水域, 均受到渔业误捕或直接捕捞的影响 (Zhou and Wang, 1994)。

虽然伪虎鲸在世界范围内广泛分布, 但迄今关于该物种种内变异的研究很少。Kitchener 等 (1990) 发现来自澳大利亚、苏格兰和南非的伪虎鲸在头骨特征方面存在巨大的差异。Deraniyagala

(1945) 认为印太水域的伪虎鲸应属于 *P. c. meridionalis* 亚种, 但并没有为其宣称的鉴别特征提供证据。因此 Rice (1998) 认为, 要接受伪虎鲸的亚种划分尚为时过早。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 呈母系遗传, 无重组发生, 特别是其进化速度是基因组其它区段的 5 ~ 10 倍, 已成为动物种群遗传结构和微进化研究中的首选标记 (Hamilton *et al.*, 2001; Hoelzel *et al.*, 2002; 刘海等, 2003)。本文首次测定了采自黄海水域的 7 头伪虎鲸个体的 mtDNA 控制

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270212 和 300710116); 国家杰出青年科学基金资助项目 (30125006); 国家“211 工程”“十五”建设项目及江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人科研基金资助项目

作者简介: 张婷 (1980 -), 女, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

收稿日期: 2004 - 09 - 08; 修回日期: 2004 - 12 - 20

* 通讯作者, correspondence author, E-mail: gyang@njnu.edu.cn

区 5' 端序列, 初步分析了该物种的遗传变异和分化。

1 材料和方法

1.1 样品采集和总 DNA 提取

研究所用的 7 头伪虎鲸均来自黄海水域, 全为骨骼样品 (表 1)。

表 1 本研究使用的伪虎鲸样品

Table 1 Samples of false killer whale analyzed in the present study

编号 (No.)	采集地 Collection location	组织 Tissue
NJNU0069	江苏吕四 Lusi, Jiangsu Province	骨骼 Skeleton
NJNU0070	黄海 Yellow Sea	骨骼 Skeleton
NJNU0071	黄海 Yellow Sea	骨骼 Skeleton
NJNU0072	黄海 Yellow Sea	骨骼 Skeleton
NJNU0073	黄海 Yellow Sea	骨骼 Skeleton
NJNU0074	江苏如皋 Rugao, Jiangsu Province	骨骼 Skeleton
NJNU0075	江苏如皋 Rugao, Jiangsu Province	骨骼 Skeleton

NJNU: 南京师范大学 Nanjing Normal University

取约 1 g 骨块, 用 5% H_2O_2 浸泡 0.5 h, 以去除表面污物。烘干样品在紫外灯下交联 0.5 h, 以去除表面污染的外源 DNA。捣碎样品后转入 1.5 ml 离心管。用标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿的方法 (Sambrook *et al.*, 2001) 抽提基因组 DNA。为避免污染对实验结果的影响, 所有操作都设有阴性对照。

1.2 mtDNA 控制区扩增、测序和分析

用于扩增伪虎鲸 mtDNA 控制区 5' 端高变异区序列的引物是 Strobeck (5' - TAATATACTGGICT-TGTAAACC - 3') (Murray *et al.*, 1995) 和 H00034 (5' - TACCAAATGTATGAAACCTCAG - 3') (Rosel *et al.*, 1995)。扩增产物约 600 bp。

PCR 反应在 PTC - 200 型 DNA 扩增仪 (MJ Research Inc.) 上进行。反应体积 30 μ l, 其中包括模板 DNA (5 ~ 25 ng), 0.2 mmol/L dNTPs, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris - HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 两条引物各 10 pmol, 1 U Taq 酶 (Promega)。反应体系在 95 预变性 5 min, 然后进入如下循环: 95 变性 30 s, 50 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 循环 30 次。循环结束后在 72 补齐 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后用柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 纯化。纯化产物用作第 2 次 PCR 反应的模板。为了提高 PCR 反应的特异性, 第 2 次 PCR 反应的退火温度在第 1 次 PCR 反应的基础上提高 2 $^{\circ}$ 。第 2 次 PCR 反应的产物用胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 纯化。纯化产物送往上海联众基因

科技研究院进行直接测序。为了对所得序列进行验证, 所有样品均进行重复提取模板、PCR 扩增和测序, 其中 NJNU0069、0073 和 0075 各重复 3 次, 其余个体各重复了 2 次。

1.3 序列结果分析

序列结果用 Clustal X 软件 (Jeanmougin *et al.*, 1998) 进行对位比对, 确定变异位点及单元型。用 DnaSP 软件 (Rozas and Rozas, 1999) 计算单元型多样性、核苷酸多样性。用 MINSPEENT 软件 (Excoffier and Smouse, 1994) 绘制出单元型的最小跨度网络图 (minimum spanning network, MSN)。把本研究所得伪虎鲸序列与虎鲸 *O. orca* (GenBank 查询号: M60409)、条纹原海豚 *S. coeruleoalba* (GenBank 查询号: AY046549)、短鳍领航鲸 *G. macrorhynchus* (GenBank 查询号: AY168599)、瓜头鲸 *P. electra* (GenBank 查询号: AY046904) 和灰海豚 *G. griseus* (GenBank 查询号: AB018584) 的序列合并, 用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 和邻接法 (Neighbor joining, NJ) 构建系统发生树。ML 分析用 PHYLIP 软件 (Felsenstein, 1995) 进行, 转换颠换权重比为 1:2, 通过自引导获得系统树分支的置信度 (重复次数为 1 000 次)。NJ 分析则用 MEGA 软件 (Kumar *et al.*, 2001) 进行, 选取基于 gamma 遗传距离的 Jukes-Cantor 模型 ($\gamma = 0.99$), 自引导的重复次数为 1 000。构树时选取江豚 (*N. phocaenoides*) 的同源序列 (Yang *et al.*, 2002) (GenBank 查询号: AF289335) 为外类群。

2 结果

共获得 7 头伪虎鲸 mtDNA 控制区 5' 端 533 bp 的序列 (GenBank 登录号: AF729039 ~ AF729045)。共发现 54 个变异位点, 包括 37 个转换, 5 个颠换, 12 个插入缺失。这些变异位点共定义了 4 种单元型 (表 2), 其中单元型 F1 在 4 个个体中检出, 而其它 3 种单元型均只在 1 个个体中检出。

ML 法和 NJ 法构建的系统发生树基本一致, 均把 4 种单元型聚为 2 个分支 (图 1, ML 树未给出)。单元型 F1 和 DNA-Surveillance 网站 (www.dna-surveillance.auckland.ac.nz) 上的伪虎鲸 mtDNA 序列组成分支 1 (把此序列单元型定义为 F5, F5 与 F1 之间的遗传距离仅为 0.5%), 单元型 F2、F3、F4 聚为分支 2。分支 1 (F1) 和分支 2 (F2, F3 和 F4) 之间有 12 个位点的插入和缺失, 其中分支 1 缺失的位点 10 个 (位点 1、2、102、103、104、105、

106、107、108 和 109)，分支 2 缺失的位点 2 个（位点 15 和 307）。分支间的核苷酸歧异度为 7.61%，显著大于分支内的核苷酸多样性（分支 1 为 0.5%，分支 2 为 0.51%）。分支间的净核苷酸

歧异度为 7.36%。从单元型的最小跨度网络图（图 2）来看，分支 2 的单元型 F2、F3 和 F4 之间都只有 2~3 个颠换，没有转换，而分支 1 和分支 2 之间则有 2 个颠换和多达 36 个转换。

表 2 伪虎鲸控制区序列的变异位点及单元型
Table 2 Variable sites and haplotypes of mtDNA control region of false killer whales

单元型 Haplotype	变异位点 Variable sites																				个体数 (N) Individual number (N)
	11111111 1111111111 1111222222 2233333444 5 5 5 5																				
	1346668 9900000000 0111223344 4557455778 9900039789 0 0 0 0																				
	1235344576 0102345678 9057030617 9060801233 0357884692 2 3 5 6																				
	***** *																				
F1	--	GTCTTATG	ATT-----	-CACCC	TACC	TGATATCAAC	GTTGCTCTGA	A	C	T	A										4
F2	GAA-	TCGGCA	GCCGACACAC	ATGTTTCGTT	CAGGGCTGTT	ACC-C.	CC.	G	G	T	C	G									1
F3	GAA-	TCGGCA	GCCGACACAC	ATGTTTCGTT	CAG.	GCTGTT	ACC-CGCC.	G	G	T	C	G									1
F4	GAA-	TC.	GCA	GCCGACACAC	ATGTTTCGTT	CAG.	GCTGTT	ACC-C.	CCCG	G	T	C	G								1

表左边表示单元型名称，上方数字表示单元型 F1 相应碱基的位置；N：单元型的个体数，圆点表示与第一种单元型有相同的碱基组成，横线表示缺失，星号表示鉴别位点

Haplotype names are shown on the left. Above numbers correspond to base positions in haplotype F1. N: Individual number of each haplotype. A dot indicates identity and a dash indicates a deletion relative to the top sequence F1. Asterisks indicate diagnostic sites between F1 and other three haplotypes

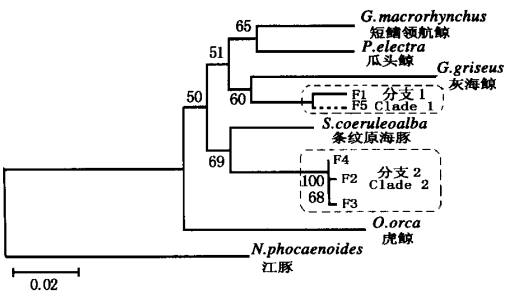


图 1 伪虎鲸 mtDNA 控制区单元型之间的系统发生关系
树枝处的数字为自引导值，重复次数为 1 000；单元型的编号（除 F5 外）与表 2 一致；单元型 F5 的位置是基于它与 F1 之间明显较高的序列相似性确定的；虚线框示本研究发现的 2 个分支。
Fig. 1 Phylogenetic relationship of false killer whale mtDNA control region haplotypes. Numbers at branch indicate the statistical support obtained from 1 000 bootstrap replicates; Haplotype codes except for F5 correspond to the codes in Table 2; Position of haplotype F5 was tentatively determined based upon its very high sequence similarity with haplotype F1; Two clades of false killer whale revealed in the present study were indicated by the frames with broken line.

3 讨论

Rosel 等 (1994) 在研究真海豚 (*Delphinus* sp.) mtDNA 控制区序列变异时发现，传统意义上的真海

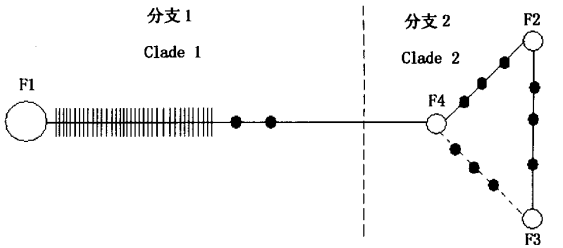


图 2 伪虎鲸 4 种 mtDNA 控制区单元型的最小跨度网络图
圆圈附近单元型编号 F1 - F4 与表 2 中单元型编号对应。圈的直径代表此单元型的频率；划线代表转换；黑点代表颠换；F4 和 F3 之间的虚线表示两者之间可能的连接。
Fig. 2 Minimum spanning network for four mtDNA control region haplotypes of false killer whale. Haplotype codes F1 - F4 correspond to the codes in Table 2. The diameter of the circle is proportional to the number of individuals bearing that haplotype. Nucleotide transitions and transversions are indicated by dashes and dark dots respectively. The broken line between F3 and F4 indicate the alternative links between these two haplotypes.

豚 (*D. delphis*) 实际上至少包括了两个种：长喙真海豚 (*D. capensis*) 和短喙真海豚 (*D. delphis*)。两者之间在 mtDNA 控制区存在 1 个鉴别位点并具有 1.09% 的核苷酸序列歧异度。两个物种之间显著的遗传差别还得到了形态学研究结果的支持 (Heyning and Perrin, 1994)。Wang 等 (1999) 和季国庆等 (2002) 在对 中国 水域 瓶鼻海豚 (*Tursiops* sp.) 的两个形态型进行 mtDNA 控制区序列测定和

分析时也发现, *truncatus* 型和 *aduncus* 型之间存在显著的核苷酸序列差异, 其歧异度为 5.58%, 远大于真海豚种间的歧异水平, 从而提出把两个形态型划分为两个独立的种, 即瓶鼻海豚 *T. truncatus* 和南瓶鼻海豚 *T. aduncus*。通过 mtDNA 标记进行的真海豚和瓶鼻海豚物种分化的研究得到鲸类生物学的广泛认可, 并验证了 mtDNA 标记在解决鲸类种内和种间分化中的有效性。

本研究在 7 个伪虎鲸个体中发现了 4 种 mtDNA 控制区单元型。基于 ML 法和 NJ 法的系统发生分析均把单元型区分为没有直接亲缘关系(姊妹关系)的两个分支。两个分支之间无共享单元型并且分支间的核苷酸歧异度(7.61%)显著高于分支内的核苷酸多样性(约 0.5%)。伪虎鲸两个分支间的核苷酸歧异度是真海豚两个种间核苷酸歧异度(1.09%) (Rosel *et al.*, 1994) 的 7 倍, 也高于瓶鼻海豚两个种间的核苷酸歧异度(4.4%; 5.58%) (Wang *et al.*, 1999; 季国庆等, 2002)。依据鲸类中 mtDNA 控制区每百万年 0.5% (Höelzel *et al.*, 1991) 至 1% (Baker *et al.*, 1993) 的进化速度及两个分支间的净核苷酸歧异度(7.36%), 推测出两个分支大约在 700~1400 万年以前出现了分化。两个分支之间如此显著的遗传差别和较早的分化时间, 提示它们可能代表了不同的物种。也就是说, 传统上认为单一物种的伪虎鲸实际上可能包括了分化显著的不同物种。特别需要指出的是, 本研究的样本全部来自黄海水域, 但却存在两个遗传差异明显的分支, 对两个分支的形成和隔离机制还有待于进一步研究。

本研究是首次报道有关伪虎鲸 mtDNA 控制区序列的测定和分析。由于样本较少, 关于伪虎鲸物种分化的结论迫切需要今后增加标本后进行进一步的验证。此外, 还需要通过骨骼和外部形态特征的比较研究, 为不同物种的分化提供形态学方面的可靠证据。

参考文献:

- Baker C S, Perry A, Bannister J L, Weinrich M T, Abernethy R B, Carlambokidis J, Lien J, Lambertsen R H, Urban Ramirez J, Vasquez O, Clapham P J, Alling A, O'Brien S J, Palumbi S R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *PNAS*, **90**: 8239 - 8243.
- Deraniyagala P E P. 1945. Some Odontoceti from Ceylon. *Spolia Zeylanica*, **24** (2): 113 - 120.
- Excoffier L, Smouse P E. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, **136**: 343 - 359.
- Felsenstein J. 1995. PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), Version 3.5c. University of Washington, Seattle.
- Hamilton H, Caballero S, Collins A G, Brownell Jr R L. 2001. Evolution of river dolphins. *Proc R Soc Lond B*, **268**: 549 - 558.
- Heyning J E, Perrin W F. 1994. Evidence for two species of common dolphin (genus *Delphinus*) from the eastern North Pacific. Natural History Museum of Los Angeles County. *Contributions in Science*, **442**: 1 - 35.
- Höelzel R A, Hancock J M, Dover G A. 1991. Evolution of the cetacean mitochondrial DNA D-loop region. *Mol Biol Evol*, **8**: 475 - 493.
- Höelzel R A, Natoli A, Dahlheim M E, Olavarria C, Baird R W, Black N A. 2002. Low worldwide genetic diversity in the killer whale (*Orcinus orca*): implications for demographic history. *Proc R Soc Lond B*, **269**: 1467 - 1473.
- Kitchener D J, Ross G J B, Caputi N. 1990. Variation in skull and external morphology in the false killer whale, *Pseudorca crassidens*, from Australia, Scotland and South Africa. *Mammalia*, **54**: 119 - 135.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, Nei M. 2001. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis Software, Ver 2.0. *Bioinformatics*, **17** (12): 1244 - 1245.
- Jeanmougin F, Thompson J D, Guay M, Higgins D G, Gibson T J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, **23**: 403 - 405.
- Murray B W, McClymont R A, Strobeck C. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR amplified mitochondrial DNA. *Journal of Forensic Sciences*, **40**: 943 - 951.
- Rice D W. 1998. Marine Mammals of the World: Systematics and Distribution. Special publication No. 4. The Society for Marine Mammalogy. Lawrence KS.
- Rosel P E, Dizon A E, Heyning J E. 1994. Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Mar Biol*, **119**: 159 - 167.
- Rosel P E, Haygood M G, Perrin W F. 1995. Phylogenetic relationship among the true porpoise (Cetacean: *Phocoenidae*). *Mol Phylog Evol*, **4** (4): 463 - 474.
- Rozas J, Rozas R. 1999. DnaSP version 3; an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, **15**: 174 - 175.
- Sambrook J, Fitch F, Maniatis T. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition). USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1659.
- Wang J Y, Chou L S, White B N. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphin (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Mol Evol*, **8**: 1603 - 1612.
- Yang G, Zhou K Y, Ren W H, Liu S, Ji G Q, Yan J, Wang L. 2002. Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters, inferred from mitochondrial control region sequences. *Marine Mammal Science*, **18** (2): 336 - 347.
- Zhou K Y, Wang X Y. 1994. Brief review of passive fishing gear and incidental catches of small cetaceans in Chinese waters. *Rep Int Whal Comm*

mn. (Special Issue 15). International Whaling Commission. Cambridge, 347 - 354.

刘海, 杨光, 魏辅文, 李明, 胡锦涛. 2003. 中国大陆梅花鹿 mtDNA 控制区序列变异及种群遗传结构分析. 动物学报, 49 (1): 53 - 60.

周开亚, 解斐生, 黎德伟, 王丕烈, 王丁, 周莲香. 2001. 中国的海兽. 联合国粮食及农业组织, 98 - 100.

季国庆, 杨光, 刘珊, 周开亚. 2002. 中国水域瓶鼻海豚的 mtDNA 控制区序列变异性分析. 动物学报, 48 (4): 487 - 493.

会议消息

3rd International Conference on Rodent Biology and Management August 28 - 1 September 2006 Hanoi, Vietnam

PRELIMINARY FLYER

Venue & Date:

The 3rd International Conference on Rodent Biology and Management (ICRBM) will be held at Thang Loi Hotel, Hanoi, Vietnam, from Monday 28 August to Friday 1, September 2006.

Further details:

Conference website: <http://ICRBM2006.ioz.ac.cn>

Accommodation website: www.thangloitourhtl.com.vn

Hanoi, Vietnam

Hanoi, a city of around 3, 5 million people, lies along the west bank of the Red River. Hanoi is one of the oldest capital in Southeast Asia. The city center can be roughly divided into two parts. The administrative, business, and tourist heart of Hanoi is in the neighborhoods stretching from northwest to south in a roughly one-mile radius around Hoan Kiem Lake. Most of the city's major hotels, best restaurants, and good shopping are found here, along with the seat of government and most foreign embassies. With the history of more than 1000 years, Hanoi has a lot of interesting things to see. Besides the hundreds of pagodas and temples in the city, there are more than 35 ancient streets blooming with the same lotus flowers that have existed here for centuries.

In the soul of any Vietnamese citizen, Hanoi has always been a symbol of culture and a source of pride throughout the history.

The temperature in Hanoi in late August is 35 maximum during the day and 22 °C minimum at night. On average there are 27 days of rainfall in August.

Noi Bai International Airport lies north of Hanoi, about 30 minutes by car from town.

Conference Organising Committee

Prof Charles Krebs (Honorary Chairman UBC, Canada)

Prof Zhibin Zhang (Chairman, IOZ, Chinese Academy of Science, PR China)

Prof Nguyen Van Tuat (Chairman, NIPP, Hanoi, Vietnam)

Mr Nguyen Phu Tuan (NIPP, Vietnam); Dr Grant Singleton; Dr Lyn Hinds; Mr Peter Brown (CSIRO, Australia); Drs Sudarmaji (IIRR, Indonesia); Dr Steven Belmain (NRI, UK); Dr Herwig Leirs (Uni Antwerp, Belgium); Dr Mauricio Lima (Pontificia Uni Católica de Chile); Prof Nils Stenseth (Uni Oslo, Norway); Dr Robert Machang'u (Rodent Control Centre, Tanzania); Dr Dale Nolte (NWRC, USA); Dr Vera Voznessenskaya (Institute of Ecology & Evolution, Russia); Dr Hannu Ylönen (Uni Jyväskylä, Finland); Dr Jens Jacob (Inst. for Nematology and Vertebrate Research, Germany); Dr Wendy Ruscoe (LandCare Research,

search, New Zealand); Dr Maria Busch (Uni Buenos Aires, Argentina); Takashi Saitoh (Field Science Center Hokkaido University, Japan); Dr Nico Avenant (National Museum, South Africa); Dr Ara Monadjem (University of Swaziland); Dr Mohd Idris (Central Arid Zone Research Institute, India)

Secretary General

Dr. Jianxu Zhang, for scientific program, IOZ, Chinese Academy of Sciences, P. R. China)

All correspondence related to scientific program should go to: ICRBM2006, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beishuaxilu 25 #, Beijing 100080, China;

Fax: 86 - 10 - 52565689; E-mail: ICRBM2006@ioz.ac.cn

For hotel reservation, sight seeing tours and airport pick up, visa etc. Please contact directly with our official tourist company to serve our conference.

DINH ANH INTERNATIONAL TRAVEL

Tel: 844 7714792 Fax: 844 7714790

Email: dinhanh@vietnam-mice.com

Attn.: Mr. Hoang Dinh Anh - Director

Please complete (IN BLOCKLETTERS) and email to Jian Xu Zhang (ICRBM2006@ioz.ac.cn) before 15 December 2005

NAME and TITLE: _____

AFFILIATION: _____

EMAIL ADDRESS: _____

POSTAL ADDRESS: _____

Telephone: _____

Fax: _____

I am interested in attending the conference and wish to receive the next announcement YES/NO

I intend to organize a symposium. An indicative title is:

I intend to submit a paper. An indicative title is:

I intend to submit a poster. An indicative title is:

I am interested in providing a trade display YES/NO

I am interested in providing sponsorship for the conference YES/NO