

转大麻哈鱼生长激素基因鲤生态安全性检测与分析

耿 波^{1 2} ,梁利群¹ ,关云涛³ ,孙效文¹ ,雷清泉⁴ ,欧阳红生²
(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 ,黑龙江哈尔滨 150070 2. 吉林大学 ,吉林长春 130062 ;
3. 中国农业科学研究院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室 ,黑龙江哈尔滨 150001 4. 哈尔滨理工大学 ,黑龙江哈尔滨 150080)

摘要 :评价了转大麻哈鱼 (*Oncorhynchus Suckley*) 生长激素基因鲤生态安全性问题及研究转基因鱼对天然野生鲤群体遗传污染程度。通过 RAPD 和 SSLP 方法 ,用 265 个 RAPD 标记和 35 对鲤的微卫星标记对受杂交鲤污染的哈尔滨江段黑龙江鲤群体、未受污染的抚远江段黑龙江鲤群体及模拟转基因鲤占普通鲤群体的 1% 和 10% 比例获得繁殖子代等实验群体的 DNA 样本进行全基因组扫描统计分析得出结论 ,即转基因鲤占普通鲤群体 1% 时对普通群体的基因污染程度是微乎其微的 ,远远低于杂交鲤对野生群体基因污染 ,转基因鲤占普通鲤群体 10% 时对普通鲤遗传背景的影响稍有升高 ,但仍然远远低于杂交鲤对野生群体基因污染程度。总之 ,在现有的检测技术条件及有效的监控条件下 ,与杂交鲤相比转基因鲤对鲤野生群体的遗传背景的影响是微弱的 ,而外来种和杂交种则对生态环境有严重威胁。

关键词 :大麻哈鱼生长激素基因 ;鲤 ;生态安全 ;基因污染

文章编号 :1000-0933 (2007) 03-1139-06 中图分类号 :S965.116 文献标识码 :A

Ecological safety assessment of the transgenic carp containing a growth hormone gene using genetic markers

GENG Bo^{1 2} , LIANG Li-Qun¹ , GUAN Yun-Tao³ , SUN Xiao-Wen¹ , LEI Qing-Quan⁴ , OUYANG Hong-Sheng²
1 Heilongjiang Fishery Research Institute , Chinese Academic of Fishery Sciences , Harbin 150070 , China
2 Jilin University , Changchun 130062 , China
3 National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001 , China
4 China Harbin University of Science and Technology , Harbin 150080 , China
Acta Ecologica Sinica 2007 27 (3) 1139 ~ 1144.

Abstract : Transgenic organism contains modified genes , including genes from other species. The escape or introduction of transgenic organisms into a natural environment poses a major ecological concern. Purdue University researchers Willian and Richard have found that introduction of a transgenic fish to the wild could damage native populations , even to the point of extinction. Such environmental risk should be evaluated before releasing every transgenic animal into a wild environment. Here we report a risk assessment of releasing the transgenic carp bearing the brevoort growth hormone gene into a natural population using a panel of 265 RAPD markers and 35 microsatellite markers. This risk assessment was based on detecting population genetic background changes and comparing these changes with the hybrid carps that may also present a latent threat to native wildlife. In this study , we have chosen seven experimental groups that are Heilong River carps inside Harbin section , Heilong River carps inside Fuyuan section , Heilong River carps inside Songhua River , two fry groups that

基金项目 :国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2001AA201103)
收稿日期 :2005-12-07 ; 修订日期 :2006-09-07
作者简介 :耿波 (1975 ~) ,女 ,黑龙江人 ,博士 ,从事鱼类分子生物学研究. E-mail :ppgeng @ sohu. com
通讯作者 :Corresponding author. E-mail :Liq-1019@ 163. com
Foundation item : The project was financially supported by National High Technology Development Project (863) Item (No. 2001AA201103)
Received date 2005-12-07 ; **Accepted date** 2006-09-07
Biography : GENG Bo , Ph. D candidate , mainly engaged in fish molecular biology. E-mail :ppgeng@ sohu. com

one or ten percent transgenic carps were mixed with common carps respectively , and two equivalent fry groups as controls. All groups were bred under similar environment to minimize other variables. The transgenic carps were produced by inserting a gene construct of salmon growth hormone driven under the salmon growth hormone promoter into genomes of common carps. Heilong River carps inside Harbin section represented a population polluted by hybrid carps. The group of Heilong River carps inside Fuyuan section served as a natural group as it is away from cities and artificial nurseries , and grows mostly in the wild. Through genome wide scanning of every experimental group and statistical analysis , we found the frequency of correlation between transgene and heterozygosity is 0.02. P value of heterozygosity of Heilongjiang carps inside Harbin is 0.08 which is significant. Based on these results , we concluded that the exogene pollution in both groups in which one or ten percent transgenic carps were mixed is significantly lower than that of the hybrid carps to the natural carps. These data suggested that the ecological risk of growth-hormone transgenic carps is less than the hybrid carps. The transgenic carps could not cause serious gene pollution to the natural carps unless a large number of transgenic carps escaped or released to the natural environment. Although we must try our best not to release any non-natural organism especially transgenic organism to the wild , it is necessary to analyze the risk of accidental releases. In this study , our data suggested that the hazard of transgenic organisms to wildlife is not greater than exotic and hybrid species. The natural world seemed not as rigid as we had thought , and complex genetic resources could neutralize the influence of a transgene.

Key Words : brevoort growth hormone gene ; common carp ; ecological safety ; gene pollution

生态安全 (Ecological safety) 是指一个生态系统的机构是否受到破坏 , 功能是否受到损害 , 一方面指生态系统自身是否安全 , 另一方面是生态系统对人类是否安全^[1]。转基因产品的生态安全问题倍受世人瞩目 , 成为转基因技术及其产品能否获得足够的研究空间和良好开发市场的关键所在^[2,3]。转基因鱼^[4~6]较其它基因改造过的产品更加倍受关注 , 到目前为止还没有转基因鱼类通过生物安全检查进行商业化生产 , 其根本原因就是鱼类生活在一个开放的水体环境中 , 加之繁殖量很大 (一尾鲤的繁殖量在十几至几十万之间) , 不仅标志困难 , 而且很难追踪观察 , 一旦发生转基因个体逃逸导致发生基因污染后果将不堪设想^[7,8]。因此各国政府都采取了谨慎的态度 , 对其食用和生态安全进行全面细致的研究 , 力求使其负面影响降到最低。自 20 世纪 80 年代开始我室构建了转大麻哈鱼生长激素基因鲤 , 从食用和生态安全方面进行了多年的研究 , 从研究结果看转基因鲤的食用是安全的^[9]。但目前没有一个确切的可操作的方法从基因组 DNA 本身对转基因鱼生态安全进行评价 , 为此 , 依据本课题组在鲤基因组方面的研究工作积累结合杂交鲤对江河中野生鲤群体遗传背景的污染程度 , 开展了基因工程鲤生态安全评价研究 , 以评价转基因鲤成为入侵种的可能性及危害 , 建立模型分析逃逸和扩散后对野生鲤群体的遗传污染程度。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

PCR 仪为 PE 公司的 Gene Amp PCR System 9700 和 Gene Amp PCR System 9600 ; 离心机为 BECKMAN CS-15R Centrifuge ; 凝胶成像系统为 UVP LIFE SCIENCES ULTRA VIOLET products ; RAPD 引物从北京北方同正公司购买 , SSLP 引物由上海生物工程公司合成 , Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自上海 Promega 公司。

1.2 鲤实验群体

转基因鲤实验群体由黑龙江水产研究所 “863 ” 课题组自行繁殖提供。为了模拟转基因鲤以不同比例逃逸到野生鲤群体时对野生鲤群体基因组的污染情况 , 设计两组实验其中转基因鲤占普通鲤 1% 和 10% 比例繁殖子代及对照子代 (不含转基因鱼的普通鲤群体) , 同时选用哈尔滨江段黑龙江鲤群体作为受杂交鲤污染的鲤对照群体 , 选用松花江段黑龙江鲤群体及抚远江段黑龙江鲤群体作为野生鲤群体对照。即 , 实验群体包括以下组合 : 10% 鱼苗对照组 , 10% 鱼苗实验组 , 1% 对照组 , 1% 实验组 , 1% 非转基因鱼 , 哈尔滨江段黑龙江鲤群体 , 松花江段黑龙江鲤群体 , 抚远江段黑龙江鲤群体。

1.3 鲤 DNA 的提取^[1]

剪取新鲜的鲤尾鳍条 5mg 加入 0.5ml 裂解液 (0.5% 的十二烷基酸钠 ,200μg/ml 蛋白酶 K ,0.01mol/L EDTA)于 50℃ 的恒温培养箱中消化 1 ~ 2h ,并不时轻轻摇动至组织完全消化 ,加入等体积酚氯仿 (苯酚: 氯仿: 异戊醇 = 25:24:1)抽提两次 12000 r/min 4℃ 5min 离心 ,轻轻吸出上清 ,加入 1ml 无水乙醇沉淀 ,12000r/min 4℃ 20min 离心。去上清 ,沉淀用冷 70% 乙醇洗涤两次 ,室温干燥后 ,加入 100μl 1/10 TE 溶解 ,于 -20℃ 保存备用。将各个群体的个体 DNA 等比例混合成 DNA 池。

1.4 RAPD 分子标记扫描基因组遗传背景

使用北京北方同正公司的 OPA ~ OPZ 系列随机引物对鲤实验群体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增 ,反应体系 25μl ,其中包括 DNA 模板 1μl (25ng/μl) ,18μl PCR 缓冲液 (含适量的 dNTP) ,1μl (0.1μg/μl)随机引物 ,1μl TaqDNA 聚合酶 (1U/μl) 4μl ddH₂O。其中 ,DNA 模板来自实验群体混合 DNA 池。

反应条件 94℃3min 93℃1min 36℃1min 72℃2min 45 个循环 ,72℃5min。反应产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳及紫外凝胶成像系统观察并记录 PCR 产物情况。

1.5 SSLP 标记扫描基因组遗传背景

使用上海生物工程公司合成的 MFW 系列鲤微卫星引物对鲤实验群体的基因组 DNA 进行 PCR 扩增 ,反应体系 25μl ,其中包括 DNA 模板 1μl (25ng/μl) ,18μl PCR 缓冲液 (含适量的 dNTP) ,引物各 1μl (0.1μg/μl) ,1μlTaq DNA 聚合酶 (1U/μl) 3μl ddH₂O。

反应条件 94℃3min 93℃30s 60℃30s 72℃30s 45 个循环 ,72℃5min。反应产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳及紫外凝胶成像系统观察并记录 PCR 产物情况。

2 结果

使用 265 个 RAPD 标记和 35 个鲤微卫星标记对受杂交鲤污染的哈尔滨江段黑龙江鲤群体、未受污染的松花江段黑龙江鲤群体及模拟转基因鲤占普通鲤群体的 1% 和 10% 比例获得繁殖子代等实验群体的 DNA 样本 ,进行全基因组扫描统计分析 ,结果转基因鱼占普通鲤群体 1% 时对普通群体的基因污染程度是微乎其微的 ,远远低于杂交鲤对野生群体基因污染 ,转基因鲤占普通鲤群体 10% 时对普通鲤遗传背景的影响稍有升高 ,但仍然远远低于杂交鲤对野生群体基因污染程度。

2.1 RAPD 检测

本研究使用检测引物共 265 个 ,其中有 94 个引物未扩增出明显条带 ,有 171 个引物扩增出清晰条带 ,其中有 49 个引物在不同样品之间可扩增出特异性条带具有多态性。见图 1 表 1。结果发现哈尔滨江段黑龙江鲤群体 DNA 多态性较高 ,出现了许多其它鲤群体中不具有的 DNA 分子标记 ;其次是转基因鲤占普通鲤 10% 实验群体和未受污染的松花江段黑龙江鲤群体 ,抚远江段黑龙江鲤群体多态性和 1% 的实验群体多态性比上述群体低。

2.2 SSLP 检测

本实验中共使用微卫星检测引物 35 对 ,7 对未扩增出明显条带 ,28 对引物扩增出明显条带 ,其中 15 对引物在不同样品之间可扩增出特异性条带具有多态性。见图 2、表 2。检测结果与 RAPD 检测结果一致 ,即哈尔滨江段黑龙江鲤群体的多态性是最高的。

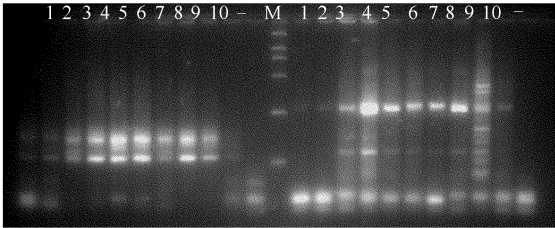


图 1 RAPD 标记 OPP4 和 OPP5 检测

Fig.1 Detection with RAPD primers OPP4 and OPP5

样品顺序 1 ~ 10 依次为 10% 鱼苗对照组 ,10% 鱼苗实验组 ,10% 亲本转基因鱼 ,10% 亲本正常鲤 ,1% 对照组 ,1% 实验组 ,1% 非转基因鱼 黑龙江鲤哈尔滨江段群体样品 ,黑龙江鲤松花江段群体样品 ,黑龙江鲤抚远江段群体样品 ;- 为不加模板引物阴性对照 ,M 为 DL2000 分子量标准 The samples order is control group of 10 % fries ,experimental group of 10 % transgenic fries ,10 % parental transgenic carps ,10 % parental common carps ,control group of 1 % fries ,experimental group of 1 % transgenic fries ,1% common carps ,Heilong River carps coming from Heilong River inside Harbin ,Heilong River carps coming from Songhua River ,Heilong River carps coming from Heilong River inside Fuyuan ; - means negative control without DNA template ; M means DNA DL2000marker ,下同 the same below

2.3 统计分析

通过一元二项式分布 (Binomdist)对杂合基因出现概率和相关性进行统计分析 ,结果见表 3。 *T* 检验相关性 (Chitest)分析 转基因群体与杂合基因出现概率相关系数为 0.020960。根据一元二项式分布统计结果可看出 黑龙江哈尔滨江段群体杂合基因出现频率为 26 ,*P* 值为 0.08 明显大于 0.05 差异显著说明其 DNA 多态性是较高的。转基因群体的杂合基因出现概率远远低于 0.05 ,亦远远低于哈尔滨江段黑龙江鲤群体。另外 ,通过相关性分析可知 转基因鲤群体与杂合基因出现概率相关系数为 0.02 小于 0.05 ,说明相关性不显著 ,转基因与杂合基因不十分相关。

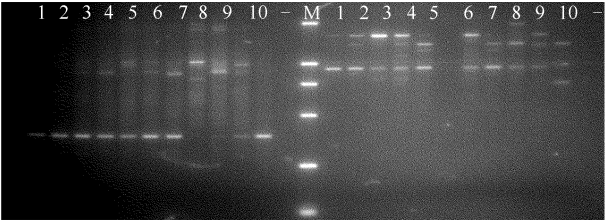


图2 SSLP 标记 MFW4 和 MFW21 检测
Fig. 2 Detection with SSLP primers MFW4 and MFW21

表 1 多态性的 RAPD 引物
Table 1 The polymorphic RAPD primers

引物 Primer	序列 5'→3' Sequence	引物 Primer	序列 5'→3' Sequence	引物 Primer	序列 5'→3' Sequence 5'→3'
OPA1	CAGGCCCTTC	OPF20	GGTCTAGAGG	OPM4	GGCGGTTGTC
OPA8	GTGACGTAGG	OPG3	GAGCCCTCCA	OPM5	GGAACGTGT
OPA11	CAATCGCCGT	OPG5	CTGAGACGGA	OPM13	GGTGCTCAAG
OPA12	CGGCGATAG	OPG6	GTGCCTAACC	OPM20	AGGTCTTGGG
OPA18	AGGTGACCGT	OPG19	GTCAGGGCAA	OPN9	TGCCGGCTTG
OPB1	GTTTCGCTCC	OPH1	GGTCGGAGAA	OPN16	AAGCGACCTG
OPB2	TGATCCCTGG	OPH2	TCGGACGTGA	OPN18	GGTGAGGTCA
OPB3	CATCCCCCTG	OPH3	AGACGTCCAC	OPN19	GTCCGTA CTG
OPB5	TGCGCCCTTC	OPH14	ACCAGGTTGG	OPN20	GGTGCTCCGT
OPB10	CTGCTGGGAC	OPH16	TCTCAGCTGG	OPP4	GTGTCTCAGG
OPB11	GTAGACCCGT	OP11	ACCTGGACAC	OPP5	CCCCGGTAAC
OPB12	CCTTGACGCA	OP16	AAGCGGCAG	OPP9	GTGGTCCGCA
OPB15	GGAGGGTGTT	OPK4	CCGCCCAAAC	OPP10	TCCCGCCTAC
OPB17	AGGGAACGAG	OPK6	CACCTTTCCC	OPP11	AACGCGTCGG
OPC1	TTCGAGCCAG	OPK7	AGCGAGCAAG	OPP15	GGAAGCCAAC
OPC2	GTGAGGCGTC	OPK9	CCCTACCGAC	OPP16	CCAAGCTGCC
OPF16	GGAGTACTGG				

3 讨论

本研究利用 RAPD 和 SSLP 方法对未受污染的黑龙江鲤及模拟转基因鲤占野生鲤群体的 1% 和 10% 比例获得繁殖子代等实验群体的 DNA 样本 ,进行全基因组扫描 ,以研究转基因鲤对天然野生鲤群体的遗传污染程度以及天然群体在混有一定比例转基因鱼时遗传背景的变化。其中设计的 10% 和 1% 实验组分别模拟高比例和低比例的转基因鲤逃逸到天然群体中时产生的后代 ,同时设两组对照 10% 对照和 1% 对照只含有正常鲤鱼苗 ,这两组对照群体与实验组来自同一父母本 ,以去除或减少由于个体间差异造成的遗传多样性。在松花江哈尔滨江段水域中含有许多从人工池塘养殖逃逸的杂交鲤及放养的外来鱼种 ,对该水域中原有的鲤群体基因组造成了一定程度上的遗传污染 ,因此选用该江段的鲤群体作为模拟转基因鲤对野生鲤群体的遗传污染的阳性参考指标。同时 ,松花江段及抚远江段黑龙江鲤群体由于没有受到人工池塘养殖的杂交鲤的污染较好的保持了原有的野生基因组资源 ,可以作为模拟实验的阴性参考指标。

由于松花江段水域鲤种群受到了人工养殖种群、杂交种以及外来种群的污染,基因杂合度明显偏高,因此在检测过程中,出现了许多特异的条带与其它鲤群体不同。另外,松花江段鲤群体及抚远江段黑龙江鲤群体由于远离外来种群的入侵及杂交鲤的污染,较好的保持了野生形态,基因组内保存了许多野生型基因,所以基因杂合性稍高。混有 10% 转基因鱼的鱼苗实验组基因杂合度高于 1% 鱼苗子代,但远远低于转基因鱼的杂合度,且在基因变化频率的允许范围内,说明转基因鲤对鲤种群的基因污染程度远远低于杂交鲤对野生型鲤基因型的污染。另外,10% 亲本转基因鱼的基因变化频率很低,出现的特异基因并没有遗传到下一代(中试 10% 鱼苗实验组),说明转基因鱼体内的外源基因并不会改变鲤原有的基因型。另外,中试 10% 鱼苗实验组出现的稍高的基因变化频率极有可能是鲤个体之间的差异造成的,同时也说明混有高比例的转基因鲤对鲤群体遗传背景的影响会增高,但仍然低于杂交鲤对野生鲤群体的遗传背景的污染。

表 2 检测具有多态性的 SSLP 引物

Table 2 The polymorphic SSLP primers		
引物 Primer	5 序列 5 sequence	3 序列 3 sequence
MFW1	gtccagactgtcatcaggag	gaggggtacactgagtcacgc
MFW4	tccaagtgcagtttaacaccg	ggggaagcgttgacaacaagc
MFW5	gagatgcctggggaagtac	aaagagagcggggtaaaggag
MFW11	gcatttgccttgatggtgtg	tcgtctggttagagtgctgc
MFW12	tttattagaataaattaaagca	gatagaagtcgatggaagtcc
MFW14	cagaagcttctgaaatctgag	gcgagaagattgatgacaac
MFW15	ctctctgtttgtttgtgaaa	gttcacaaggctatttcacgc
MFW18	gtccctggtagtgagtgagt	gcgttgactgttttatactag
MFW20	cagtgagacgattaccctgg	gtgagcagcccacattgaac
MFW21	caataacatgcagcagctgtg	caaggaagaccaatagcactg
MFW24	gtccagattgcacattatag	ctacacacacgcagagcctttc
MFW25	attgtgaagcatcggtaatgc	tacttgatttgctattggac
MFW26	ccctgagatagaaaccactg	caccatgctggatgcaaaag
MFW27	gatctaaaatatgggtgtg	cataatgcctctcattaatc
MFW30	ggtcaacaagtagttgtgcag	ccatctctgcatgcaacag

表 3 转基因生态安全检测杂合基因频率及 P 值统计结果

Table 3 The statistics result of the occurring frequency of heterotic gene and P value of the ecological safety detection of transgenic carp		
实验群体 Experimental group	杂合基因出现频率 The occurring frequency of heterotic gene	一元二项式分布 P 值 Binomdist P value
10% 鱼苗对照组 control group of 10 % fry	12	0.00208
10% 鱼苗实验组 experimental group of 10 % transgenic fry	21	0.00407
1% 对照子代 Control group of 1 % fry	18	0.00031
1% 实验子代 Experimental group of 1 % transgenic fry	14	0.0080
黑龙江鲤哈尔滨江段群体 Heilong River carps inside Harbin section	26	0.08432
黑龙江鲤松花江段群体 Heilong River carps inside Songhua River	18	0.00031
黑龙江鲤抚远江段群体 Heilong River carps inside Fuyuan section	15	0.00674

任何外来基因或物种都会对野生种群产生或多或少的影 响。在有效的监控下,可以将转基因鱼对自然生态环境的影响降到最低,同时由于天然野生鲤鱼群体拥有的复杂巨大的遗传资源背景,也可以减轻或稀释转基因的影响^[11]。而外来种和杂交种则对生态环境有严重威胁。随着科技的发展,外来种的入侵以及新品种的出现等原因导致天然野生生物群体基因产生巨大的变化,这种变化在短期内是检测不出对物种及环境 和人的影响,但必须经长期的观察监测以减轻其负面影响,并尽量保持物种的野生状态。在美国、欧洲、俄罗斯等国家和地区,均强调保护野生动物,开发养殖资源,有些湖泊河流不许捕捞以破坏生态环境。目前为止,转基因生物与外来生物入侵相比造成的危害并不明显,但由于人口的增长及资源的匮乏,高产、优质的转基因产品的商品化势在必行,怎样最大程度地发挥其优势减少或降低其负面作用,还需长期深入的研究,也需要政府的正确调控指导^[12,13]。

References :

[1] Guo C Y ,Wang Z S ,Fang Y M. Exotic species invasion and ecological safety. Journal of Nanjing Forestry University (Natrual Sciences Edition), 2003 27 (2) : 73 — 78.

[2] Cheng Y P , Zhuang B C. Biosafety of transgenic products and their resolving strategies. *Hereditas* 2001 23 (6):577 — 579.

[3] Xia D Q , Wu T T , Yang H. The status , existed problems and its settled way on research of transgenic fish. *Journal of Agricultural Biotechnology* , 2000 8 (3) 205 — 210.

[4] Wei Y Z , Xie Y F , Li G H *et al.* The situation and expectation of fish genetic engineering. *Journal of Quality biology* ,1992 ,16 (1) 71 — 78.

[5] Sun X W , Liang L Q , Shen J B. Constructed the “ whole fish ” genetic engineering fish. *Hitech Report* ,19933 (9) 23 — 26.

[6] Hu Z. Growth hormone gene and the transgenic fish. *Agricultural Biotechnology*. Beijing : China Science and Technology Press ,1992. 106 — 116.

[7] Xu R M , Ye W H. The theory and practice of exon-organism invade. Beijing : Science Press ,2003. 119 — 137.

[8] Liu Q , Zhu D Q. Biosafety. Beijing : Science Press ,2001.

[9] Sun X W , Liang L Q , Yan X C. Research on transgenic fish as food. *Hitech Report* ,1998 3 45 — 49.

[10] Sun X W , Liang L Q. Identification of the genetic polymorphism between the 2 strains of carp using zebrafish SSLP markers. *Journal of Fishery Science of China* ,2001 8 (2) 5 — 6.

[11] William M M , Richard D H. Assessment of possible ecological risks and hazards of transgenic fish with implications for other sexually reproducing organisms. *Transgenic Research* ,2002 ,11 :101 — 114.

[12] Hedrick P W. Invasion of transgenes from salmon or other genetically modified organisms into natural populations. *Can J Fish Aquat Sci* 2001 ,58 : 841 — 844.

[13] Sundstrom L F , Devlin R H , Johnsson J I , Biagi C A. Vertical position reflects feeding motivation in growth hormone transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ethology* 2003 ,109 :701 — 712.

参考文献：

[1] 郭传友 ,王中生 ,方炎明. 外来种入侵与生态安全. *南京林业大学学报 (自然科学版)* 2003 27 (2) 73 ~ 78.

[2] 程焉平 ,庄炳昌. 转基因产品的安全性及其对应策略. *遗传* 2001 23 (6) 577 ~ 579.

[3] 夏德全 ,吴婷婷 ,杨弘. 鱼类转基因研究现状和存在的问题及解决办法. *农业生物技术学报* 2000 8 (3) 205 ~ 210.

[4] 魏彦章 ,谢岳峰 ,李国华 ,等. 鱼类基因工程研究的现状和展望. *水生生物学报* ,1992 ,16 (1) :71 ~ 78.

[5] 孙效文 ,梁利群 ,沈俊宝. 全鱼基因工程鱼的构建. *高技术通讯* ,1993 ,3 (9) 23 ~ 26.

[7] 徐汝梅 ,叶万辉. 生物入侵理论与实践. 北京 :科学出版社 2003. 119 ~ 137.

[8] 刘谦 ,朱鑫泉. 生物安全. 北京 :科学出版社 2001.

[9] 孙效文 ,梁利群 ,闫学春 ,等. 转基因鲤作为食物的研究. *高技术通讯* ,1998 8 (3) 45 ~ 49.

[10] 孙效文 ,梁利群. 斑马鱼 SSLP 标记检测鲤种间的遗传多样性. *中国水产科学* 2001 8 (2) 5 ~ 6.