

张莉, 沈文静, 方志翔, 等. 转基因玉米 ZMZ030 对大型蚤(*Daphnia magna*)生长和繁殖的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(9): 2074–2079.
ZHANG Li, SHEN Wen-jing, FANG Zhi-xiang, et al. Effect of transgenic maize ZMZ030 on growth and reproduction of *Daphnia magna*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(9): 2074–2079.

转基因玉米 ZMZ030 对大型蚤(*Daphnia magna*) 生长和繁殖的影响

张莉, 沈文静, 方志翔, 刘标*

(生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要:为探讨抗虫耐除草剂转基因玉米 ZMZ030 对水生生物的安全性, 以浮游动物大型蚤(*Daphnia magna*)为研究对象, 使用转基因玉米 ZMZ030 及其非转基因对照亲本玉米样 249(X249)饲喂大型蚤 28 d, 检测转基因玉米 ZMZ030 对大型蚤生长和繁殖的影响。28 d 测试结果显示, 与亲本 X249 组大型蚤相比, ZMZ030 玉米组大型蚤在存活率、体长、首次抱卵时间、首次产幼蚤时间、首次产幼蚤数、新生幼蚤总数等参数上没有显著性差异。28 d 饲喂结果表明抗虫耐除草剂玉米 ZMZ030 与 X249 非转基因亲本玉米对大型蚤具有同样的安全性。

关键词:转基因玉米; 大型蚤; 饲喂试验; 生态风险评价

中图分类号: X820.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)09-2074-06 doi:10.11654/jaes.2019-0094

Effect of transgenic maize ZMZ030 on growth and reproduction of *Daphnia magna*

ZHANG Li, SHEN Wen-jing, FANG Zhi-xiang, LIU Biao*

(Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Nanjing 210042, China)

Abstract: To assess the potential risk that transgenic maize poses to aquatic organisms, the effects of the genetically modified (GM) maize ZMZ030 were examined on the water flea *Daphnia magna*, as a model species for ecotoxicological studies. In a 28-day study, *D. magna* were experimentally fed a basal diet of ground flour from ZMZ030 or its parental maize X249 at 1.5 g·L⁻¹ per individual per day. Overall, *D. magna* fed ZMZ030 and X249 showed comparable survival, body size, maturity time, first brood time, first brood size, and total number of offspring, with no significant differences observed for any of the above parameters. This study suggests that the GM maize ZMZ030 is a safe food source for *D. magna* with substantial equivalence to its parental non-GM maize.

Keywords: transgenic maize; *Daphnia magna*; feeding study; ecological risk assessment

玉米害虫和田间杂草是影响玉米产量的重要因素, 因此, 增强玉米对害虫和杂草的抵抗力一直是玉米品种改良的重要内容^[1], 利用转基因技术将外源抗虫基因和耐除草剂基因同时转入玉米基因组中, 培育

出抗虫/耐除草剂双抗转基因玉米新品种, 这一技术的成功应用不仅显著降低虫害和草害对玉米产量的影响, 增加农民收入, 而且还避免了大量使用化学农药带来的环境污染、害虫产生抗药性等各种弊端, 在

收稿日期: 2019-01-22 录用日期: 2019-05-05

作者简介: 张莉(1987—), 女, 甘肃白银人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事转基因生物安全方面的研究。E-mail: feinia08897@126.com

*通信作者: 刘标 E-mail: liubiao@nies.org

基金项目: 国家科技重大专项(2016ZX08012-005)

Project supported: The National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (2016ZX08012-005)

农业生产上具有重要意义。

与传统育种技术不同,转基因技术在创造优良种质资源和培育植物新品种的同时,转基因作物对环境对人类健康可能存在的风险也不能忽视^[2]。转基因作物培育过程中,外源基因的随机插入,可能会影响转基因作物本身内源基因的表达,进而产生非预期效应,如改变作物中的营养元素、抗营养因子或固有植物毒素的表达水平等^[3-5],如果转基因作物发生了这些改变,可能会对一些生物的健康产生潜在影响。现有的转基因作物及产品安全性评价研究,实验动物主要为大型禽畜^[6-8]、小型啮齿动物^[9-11],对水生生物的研究以某些鱼类为主^[12-15],而对于可直接或间接接触到转基因作物及其产品的小型水生动物的研究主要集中于毛翅目石蛾幼虫^[16-18]以及双翅目蚊子幼虫^[18]。

转基因作物种植区及周边沟渠、池塘等自然水域,是许多无脊椎浮游动物的栖息地,转基因作物在栽培和生长过程中,其碎屑物、花粉等可能会借助风力、水流、动物携带等方式进入周边水体,从而使周边水体中的水生生物接触到转基因成分。由于转基因作物及相关成分进入水体是一种有机物质的输入,可能会对无脊椎动物群落结构、数量以及摄食行为等产生影响^[19],因此评价转基因作物对环境某些代表性水生无脊椎物种的潜在毒性效应,对农田及周边水生生态系统生物多样性保护具有重要意义。大型蚤(*Daphnia magna*)为浮游动物的重要类群,是水中细菌、单细胞藻类、有机物碎屑的主要消费者,也是鱼类等水生生物的天然饵料。由于大型蚤对5~50 μm 粒径的食物没有自主选择^[20-22],其在滤食过程中,可能会取食到含有转基因成分的碎屑物^[22];另外,大型蚤作为水生模式动物,生活周期短、室内培养简易、对污染物反应灵敏^[23-24],已具备成熟的环境物质监测评价方法,因此本研究以大型蚤为研究对象,运用亚慢性毒理学原理,在实验室条件下模拟转基因玉米ZZM030对水生代表性物种的影响,以期对转基因玉米的生态环境安全提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所使用的抗虫耐除草剂转基因玉米ZZM030(ZZM030)为中国种子集团有限公司自主研发品系,是以亲本对照玉米祥249(X249)为受体材料,插入外源 *cryIAb/c* 基因以及 *epsps* 基因,同时具有抗虫特性和对草甘膦和草丁膦除草剂的抗性。

将ZZM030籽粒和X249籽粒剔除霉变粒、秸秆等杂物后,使用TGQ20流化床超音速气流粉碎分级机低温($<10\text{ }^{\circ}\text{C}$)粉碎至粒径 $<10\text{ }\mu\text{m}$,粉碎后的玉米粉 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存储备用,使用时用大型蚤水生四号培养液^[25]配制成 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的米粉液。为避免样品间的交叉污染,首先对亲本玉米进行籽粒粉碎。

1.2 试验动物

试验动物大型蚤(*Daphnia magna*)为本实验室培养3代以上、具有相同遗传背景的孤雌生殖幼蚤,蚤龄小于24 h。试验蚤在测试前,依据大型蚤毒性试验敏感性要求,测定 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时重铬酸钾(Sigma,美国)24 h半数效应浓度(24 h- EC_{50})。测定结果显示,重铬酸钾24 h- EC_{50} 为 $1.127\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,符合实验要求^[26]。

1.3 试验方法

试验分小球藻(*Chlorella vulgaris*)组、X249玉米粉组和ZZM030玉米粉组3个处理,每处理3个重复,每个重复10只大型蚤。实验容器为50 mL烧杯,并盛放40 mL大型蚤培养液^[25],每个烧杯随机放置1只蚤。试验过程中,各处理组大型蚤每日饲喂1次,其中小球藻组饲喂浓缩后的小球藻藻液,密度约为 $5\times 10^5\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$,X249玉米粉组和ZZM030玉米粉组分别饲喂浓度为 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的玉米粉1 mL,本研究实验设计参照了文献[22, 27]的方法。实验过程中,每日定时观察和记录各处理组大型蚤存活和繁殖情况,大型蚤开始繁殖后,记录各处理组蚤繁殖情况,并将新生幼蚤移出。实验过程中,每隔2 d更新1次培养液。试验初始、第7、14、21 d和第28 d时,使用显微镜(LEICAM125)测定大型蚤体长。试验在培养箱(Binder-KBF720,德国)中进行,温度 $(22\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光暗比16 h:8 h,光强 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$,共持续28 d。

1.4 数据处理与分析

采用Excel 2003统计分析软件进行数据录入和整理,用IBM SPSS 17.0软件ANOVA程序中的单因素方差分析及Tukey's test多重比较进行数据显著性差异分析,以 $P=0.05$ 作为统计学上检验的显著性水准。

2 结果与分析

2.1 存活率

图1显示的是饲喂小球藻、亲本玉米X249和抗虫耐除草剂玉米ZZM030的实验蚤28 d存活率变化情况。如图1所示,小球藻组大型蚤在测试期内存活率缓慢下降,虽然个别试验蚤在幼龄期及成龄早期($<7\text{ d}$)存在死亡现象,但7 d后实验蚤存活率缓慢下

降,至28 d试验结束时,小球藻组存活率达46%。与对照小球藻组相比,饲喂X249和ZZM030玉米粉均使大型蚤死亡率增加,在试验期内,两个玉米粉组试验蚤随实验天数的增加均有一定的死亡,方差分析显示ZZM030组大型蚤和亲本X249组大型蚤存活率没有显著差异($P>0.05$)。

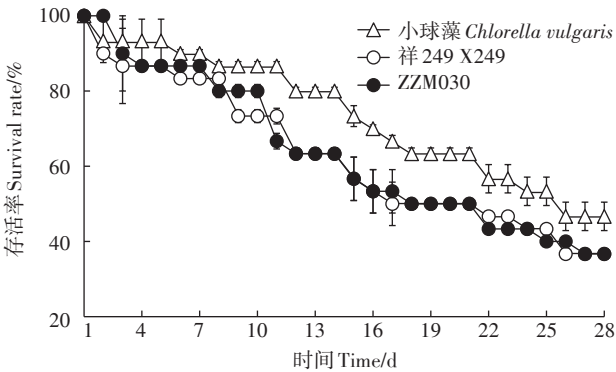


图1 不同处理组大型蚤存活率变化

Figure 1 Survival rate of *Daphnia magna* fed with *Chlorella vulgaris*, X249 maize and ZZM030 transgenic maize

2.2 体长

研究测定了不同食物饲喂条件下试验蚤初始、第7、14、21 d及第28 d体长。研究发现,不同食物饲喂条件下大型蚤的体长不同(图2)。小球藻组试验蚤体长在试验初期增长较快,14 d后,体长缓慢增长。而两个玉米粉组试验蚤体长试验期内呈现缓慢增长趋势,从试验初始至第28 d,饲喂抗虫耐除草剂玉米ZZM030的大型蚤体长与亲本X249组试验蚤体长相当,两者之间没有显著差异。至28 d实验结束时,小球藻组、X249组和ZZM030组大型蚤平均体长分别为(3.82±0.25) mm、(2.54±0.14) mm和(2.64±0.22) mm,两个玉米粉组实验蚤最终体长与小球藻组实验蚤最终体长达到显著差异水平($P<0.05$),但X249和ZZM030玉米粉组大型蚤间没有显著差异($P>0.05$)。

2.3 繁殖

不同饲喂处理条件下大型蚤的繁殖参数见表1。饲喂亲本玉米X249和抗虫耐除草剂玉米ZZM030的大型蚤在首次抱卵时间、首次产幼蚤时间、新生幼蚤总数上与小球藻组实验蚤均有显著差异($P<0.05$)。对于X249组和ZZM030组大型蚤,统计分析表明,抗虫耐除草剂玉米ZZM030和亲本玉米X249组大型蚤在上述参数上均无显著性差异($P>0.05$),28 d试验期内,各处理组试验蚤均未出现卵鞍。

3 讨论

地上水域和邻近陆地环境密切相关^[28],转基因作物在生长过程中,风力可使作物花粉漂移到110 m远的地方^[29],雨水也可以使花粉脱落并随水流转运,作物收获后,滞留在农田内的作物残体可被风或水流运送到周围水体,这些转基因作物副产品一旦进入水域,可能会被微生物分解、水生动物消耗、沉积或漂流至下游水域,并成为农业灌溉水渠中碎屑物的组分之一^[16]。转基因作物开发和应用过程中,含有外源蛋白的作物碎屑物进入水体后,是否会对食碎屑类生物产

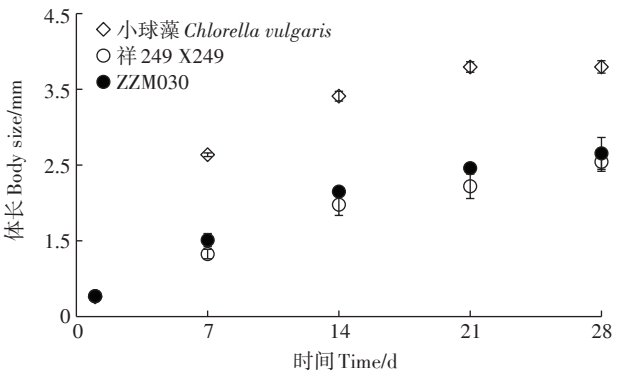


图2 不同处理组大型蚤的体长变化

Figure 2 Body size of *Daphnia magna* fed with *Chlorella vulgaris*, X249 maize and ZZM030 transgenic maize

表1 不同处理组大型蚤繁殖参数

Table 1 Fecundity of *Daphnia magna* fed with *Chlorella vulgaris*, X249 maize and ZZM030 transgenic maize

项目 Items	小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i>	样 249 X249	ZZM030
首次抱卵时间 Mature time/d	5.17±0.82b	9.27±0.42a	8.62±0.89a
首次产幼蚤时间 Age of first brood/d	8.26±0.28b	13.06±0.54a	11.89±0.61a
首次产幼蚤数 Number of first brood/ind.	14.64±2.42a	8.11±1.55ab	6.73±0.64b
累积幼蚤总数 Total number of offspring/ind.	137.67±19.22a	72.00±16.70b	78.67±9.29b
卵鞍数量 Number of ephippia/ind.	0	0	0

注:表内数据以“平均值±标准差”表示,同一行内具有相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著(Tukey's test, $P<0.05$)。
Note: Data presented are Means ± SD, means with different superscripts in the same line are significantly different(Tukey's test, $P<0.05$).

生不利影响? 基于转基因作物对水生生物可能存有生态安全风险,本研究以抗虫耐除草剂转基因玉米ZZM030及其亲本非转基因玉米祥249为研究材料,以水生生物大型蚤为研究对象,使大型蚤的食物来源全部为转基因玉米碎屑物,室内可控条件下研究转基因作物材料对特定非靶标水生生物的影响。

在28 d测试期内,以抗虫耐除草剂玉米ZZM030饲喂大型蚤,通过大型蚤存活率、体长、首次抱卵时间、首次产幼蚤时间和新生幼蚤总数等参数,评价ZZM030对大型蚤的安全性。实验结果表明,与饲喂X249亲本玉米粉的大型蚤相比,ZZM030玉米粉组大型蚤的生长指标存活率和体长,以及首次抱卵时间等繁殖指标(表1)与亲本玉米没有显著差异,实验期间未出现有性生殖的卵鞍,这些结果说明ZZM030转基因玉米并没有对大型蚤产生不良影响。Mendelson等^[30]使用 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的转 $cryIAb$ 花粉和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 转 $cryIF$ 基因玉米花粉饲喂大型蚤48 h,测试期间大型蚤没有出现不良反应。张莉等^[27]使用转 $cryIAb$ 和 $epsps$ 基因玉米C0030.3.5饲喂大型蚤28 d也得到了相似的结论。与我们的研究结果不同的是,Bøhn等^[22,31]使用转 $cryIAb$ 基因玉米饲喂大型蚤42 d,发现与对照组相比Bt玉米组的大型蚤适合度下降,使用转基因玉米饲喂的大型蚤死亡率增加、实验蚤性成熟时间延长、新生幼蚤总数下降,其他一些转基因作物对大型蚤的室内评价研究也有相似结论^[32-33]。现有以大型蚤为试验动物进行转基因作物的安全性评价研究,通常采用不同的评价时间、不同的剂量水平和评价参数来达到评价目的,而转基因作物的品种、饲喂剂量、暴露时间等参数的不同^[34],都可能会对大型蚤受试物毒性评价的结果产生影响,上述结果的不一致性可能与下列因素有关:(1)转基因作物品种差异。上述研究者使用的转基因玉米材料在目标基因上明显不同,受体材料和转育过程也不尽相同,这些遗传背景上的差异可能产生的非预期效应的类型和程度,以及不同材料组成成分上的差异都会在一定程度上影响大型蚤评价结果;(2)暴露时间不同。大型蚤在受试物中的暴露时间不同,对大型蚤产生的影响也会不同^[25]。研究者用大型蚤进行饲喂试验时,暴露时间在48 h~42 d不等,本研究采用28 d,0~28 d这一时间段涵盖了大型蚤幼龄期及成龄期,此时大型蚤生长和繁殖已经趋于稳定^[35],能够得出稳定可靠的评价结果。而Bøhn等^[22,31]选用42 d,暴露时间的延长虽然可能将一些不良效应或微小变化所产生的影响表

现出来,但此时大型蚤已趋于衰老,衰老过程中抗氧化防御体系的损坏以及抗逆性变化等不可控因素可能会干扰评价结果^[36-37]。

目前转基因作物对大型蚤生态安全性评价研究中,研究者多参照经典毒理学评价方法,与化学品组明确和结构明晰不同,转基因作物在营养成分、潜在致敏性、代谢产物等方面可能存在一些不确定因素,这在一定程度上突出了转基因作物安全性评价的复杂性,因此评价过程中,尽可能使实验条件标准规范化、选择合理的响应参数,这将有助于得到可靠的实验数据和评价结果。在使用转基因作物对大型蚤进行生态安全性评价研究中,研究者多以作物种子或果实、花粉、叶片等作为测试材料,这些材料以微粒形式进入大型蚤培养液时,若饲喂剂量较低,则不能满足大型蚤的生存需求;若饲喂剂量过高,富余的受试材料微粒悬浮在培养液中,这部分受试物微粒容易黏附于大型蚤的触角、壳刺等部位,使大型蚤浮游能力下降,还易引起培养液水质恶化,进而间接增加培养液的更新频率,由此也可能增加大型蚤机械性损伤。因此,使用不同转基因作物材料进行研究时,尽可能选择合理的受试材料浓度,并加强培养液水体环境变化检测,这将有助于降低环境条件引起的可能误差。另外,本研究在评估转基因玉米ZZM030对大型蚤生长和繁殖的影响评价时,优先选择大型蚤存活率、体长、新生幼蚤总数3个最常用的监测指标,而其他一些可以量化的指标,如受试蚤首次繁殖时间、首次新生幼蚤数、产幼蚤次数、试验期间是否有卵鞍出现等指标能够提供一些亚毒性效应信息,这些参数作为辅助检测指标能够更好地说明转基因玉米ZZM030是否对大型蚤产生某些不利影响。

4 结论

本研究以抗虫耐除草剂转基因玉米ZZM030(ZZM030)及其亲本非转基因玉米祥249(X249)为研究材料,以ZZM030和X249玉米粉为食物来源对大型蚤进行28 d饲喂实验,未发现转基因玉米材料ZZM030对大型蚤生长和繁殖产生不良影响,28 d饲喂结果表明抗虫耐除草剂玉米ZZM030与X249亲本玉米对大型蚤具有同样的安全性。

参考文献:

- [1] 王睿, 胡贻椿, 李敏, 等. 转DBN9978基因抗虫抗除草剂玉米对大鼠的亚慢性毒性研究[J]. 中国食物与营养, 2017, 23(6): 12-17.

- WANG Rui, HU Yi-chun, LI Min, et al. Subchronic toxicity test of genetic modified corn with *DBN9978* gene in rats[J]. *Food and Nutrition in China*, 2017, 23(6):12-17.
- [2] 王立平, 王东, 龚熠欣, 等. 国内外转基因农产品食用安全性研究进展与生产现状[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(3):94-103.
- WANG Li-ping, WANG Dong, GONG Yi-xin, et al. Research progress and production status of domestic and overseas transgenic agriculture products and GM food safety[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2018, 20(3):94-103.
- [3] Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(7):1089-1125.
- [4] Somers D A, Makarevitch I. Transgene integration in plants: Poking or patching holes in promiscuous genomes? [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(2):126-131.
- [5] 董姗姗, 章嫡妮, 张振华, 等. 转基因作物对鱼类的生态毒理效应研究综述[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(5):26-34.
- DONG Shan-shan, ZHANG Di-ni, ZHANG Zhen-hua, et al. Overview of ecotoxicological effects of genetically modified crops on fish[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(5):26-34.
- [6] Steinke K, Guertler P, Paul V, et al. Effects of long-term feeding of genetically modified corn (event MON810) on the performance of lactating dairy cows[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2010, 94(5):e185-e193.
- [7] Walsh M C, Buzoianu S G, Rea M C, et al. Effects of feeding Bt-MON810 maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the *cry1Ab* gene and truncated Bt toxin[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e36141.
- [8] Maga E A, Desai P T, Weimer B C, et al. Consumption of lysozyme-rich milk can alter microbial fecal populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(17):6153-6160.
- [9] Liu P, He X, Chen D, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(9):3215-3221.
- [10] Fang J, Feng Y Q, Zhi Y, et al. A 90-day toxicity study of GmTMT transgenic maize in Sprague-Dawley rats[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2017, 85:48-54.
- [11] Yalcin E, Acar A, Seven B, et al. Effects of feeding genetically modified (GM) maize on oxidative stress parameters in New Zealand rabbit [J]. *Global Nest International Journal*, 2018, 20(1):173-176.
- [12] Chainark P, Satoh S, Hino T, et al. Availability of genetically modified soybean meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets[J]. *Fisheries Science*, 2006, 72(5):1072-1078.
- [13] Gu J, Bakke AM, Valen EC, et al. Bt-maize (MON810) and non-GM soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) juveniles—impact on survival, growth performance, development, digestive function, and transcriptional expression of intestinal immune and stress responses[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99932.
- [14] Sissener N H, Johannessen L E, Hevry E M, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating the safety of GM feed ingredients (soya and maize): Performance, stress response and uptake of dietary DNA sequences[J]. *British Journal of Nutrition*, 2010, 103(1):3-15.
- [15] Sanden M, Ornsrud R, Sissener N H, et al. Cross-generational feeding of Bt (*Bacillus thuringiensis*)—maize to zebrafish (*Danio rerio*) showed no adverse effects on the parental or offspring generations[J]. *British Journal of Nutrition*, 2013, 110(12):2222-2233.
- [16] Rosi-Marshall E J, Tank J L, Royer T V, et al. Toxins in transgenic crop by products may affect headwater stream ecosystems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(41):16204-16208.
- [17] Chambers C P, Whiles M R, Rosi-Marshall E J, et al. Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2010, 20(7):1949-1960.
- [18] Jensen P D, Dively G P, Swan C M, et al. Exposure and nontarget effects of transgenic Bt corn debris in streams[J]. *Environmental Entomology*, 2010, 39(2):707-714.
- [19] 陈秀萍, 王加美, 朱昊俊, 等. 转 Bt 基因作物对水生生态系统的影响研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(4):569-574.
- CHEN Xiu-ping, WANG Jia-mei, ZHU Hao-jun, et al. Progress in effects of transgenic Bt crops on the aquatic ecosystem[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(4):569-574.
- [20] Walter G, Helga M. The filtration apparatus of cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity[J]. *Oecologia*, 1981, 49(3):316-321.
- [21] Moshe G, Walter G. Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*[J]. *Oecologia*, 1984, 64(3):408-412.
- [22] Bøhn T, Primicerio R D, Traaavik T. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55(4):584-592.
- [23] Sturm A, Hansen P D. Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, 42(1):1-15.
- [24] Rosa E, Barata C, Damásio J, et al. Aquatic ecotoxicity of a pheromonal antagonist in *Daphnia magna* and *Desmodesmus subspicatus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(3):296-303.
- [25] Organisation for Economic Co-Operation and Development. OECD guideline for the testing of chemicals, *Daphnia magna* reproduction test: OECD 211[S]. Paris: OECD Publishing, 2012.
- [26] 国家环境保护总局. 水质物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法: GB/T 13266—1991[R]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- National Environmental Protection Agency. Water quality—determination of the acute toxicity of substance to *Daphnia* (*Daphnia magna*—traus): GB/T 13266—1991[S]. Beijing: China Standards Press, 1991.
- [27] 张莉, 韩娟, 刘标. 转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因玉米 C0030.3.5 对大型蚤 (*Daphnia magna*) 的生态毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3):122-128.
- ZHANG Li, HAN Juan, LIU Biao. Ecotoxicological effects of genetically modified maize C0030.3.5 with *cry1Ab* and *epsps* gene on *Daphnia magna*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(3):122-128.

- [28] Wallace J B, Eggert S L, Meyer J L E, et al. Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs[J]. *Science*, 1997, 277 (5322):102–104.
- [29] Song Z, Lu B R, Chen J. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2004, 13 (3):579–590.
- [30] Mendelson M, Kough J, Vaituzis Z, et al. Are Bt crops safe?[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(9):1003–1009.
- [31] Bøhn T, Traavik T, Primicerio R D. Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic *Bt*-maize[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(2):419–430.
- [32] Cuhra M, Traavik T, Bøhn T. Life cycle fitness differences in *Daphnia magna* fed Roundup-Ready soybean or conventional soybean or organic soybean[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(5):702–713.
- [33] Holderbaum D F, Cuhra M, Wickson F, et al. Chronic responses of *Daphnia magna* under dietary exposure to leaves of a transgenic (event MON810) *Bt*-Maize hybrid and its conventional near-isoline [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2015, 78 (15):993–1007.
- [34] Li Z, Guo R Q, Fang Z X, et al. Genetically modified rice Bt-Shanyou63 expressing Cry1Ab/c protein does not harm *Daphnia magna*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 132:196–201.
- [35] Glazier, Douglas S. Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*[J]. *Ecology*, 1992, 73 (3):910–926.
- [36] Barata C, Navarro J C, Varo I. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 140(1):81–90.
- [37] Bychek E A, Gushchina I A. Age-dependent changes of lipid composition in *Daphnia magna*[J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 1999, 64(5):543–545.