

综述

doi: 10.7541/2016.167

基于化感物质释放特性的沉水植物抑藻作用模式研究进展

高云霓^{1,2} 董静¹ 何燕^{2,3} 葛芳杰² 刘碧云² 吴振斌²

(1. 河南师范大学水产学院, 新乡 453007; 2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 3. 四川农业大学环境学院, 成都 611130)

摘要: 沉水植物对藻类的化感抑制作用, 是沉水植物获取竞争优势和维持清水稳态的重要机制之一。化感物质是由植物产生并释放到水环境中的次生代谢产物, 化感物质的有效释放和作用是实现沉水植物化感抑藻作用的关键环节。因此, 在化感物质释放水平阐明沉水植物化感抑藻的作用模式、过程和机制具有重要意义。通过比较沉水植物化感物质释放到水环境中的种类、含量和常规急性毒性测试中化感物质的抑藻效果, 发现沉水植物化感物质在释放水平上的作用模式不同于常规急性毒性试验中的单次作用。为了回答沉水植物化感物质在释放水平如何高效抑藻的问题, 结合化感物质的释放特性, 重点从化感物质的联合作用和持续作用等角度探讨沉水植物化感抑藻的作用模式, 提出沉水植物可能通过多种化感物质低剂量持续释放的方式, 实现对目标藻类的持续协同控制。今后有必要进一步结合沉水植物与目标藻类的共存系统与原位实验, 借助分析化学、植物化学、细胞和分子生物学的技术手段, 从生态学水平加强沉水植物化感抑藻作用机制研究。

关键词: 化感物质; 释放含量; 有效抑藻剂量; 联合作用; 持续作用

中图分类号: Q142 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)06-1287-08

化感作用广泛存在于自然界中, 涵盖了植物、藻类、细菌和病毒等产生的次生代谢产物影响生态系统中生物生长和发展的任何过程^[1]。化感作用在影响农业和森林生态系统的生物群落中已显示其重要作用, 研究成果已广泛应用于农作物增产、病虫害防治和森林生态平衡的维持等方面^[2-4]。为了与同样生活在水下的藻类等初级生产者在营养、光照和空间等方面形成有效竞争, 沉水植物可以通过释放化感物质抑制藻类的生长^[5]。野外观察和室内模拟实验证实, 常见的小二仙草科(Haloragidaceae)、金鱼藻科(Ceratophyllaceae)、眼子菜科(Potamogetonaceae)和水鳖科(Hydrocharitaceae)的多种沉水植物都具有化感抑藻效应^[6-8]。在水生态恢复工程实践中沉水植被的成功重建, 也与沉水植物对藻类的化感抑制作用有关^[9-13]。相比于绿藻等其他藻类,

沉水植物释放的化感物质对水华蓝藻能选择性抑制, 部分化感物质对浮游动物和鱼类没有毒性, 自然条件下易降解, 不会在生态系统中积累^[14], 这些特征表明沉水植物化感物质在调控藻类群落结构及防控富营养化水体藻华污染等方面具有潜在应用价值^[15-18]。

Willis^[19]从方法学角度提出证明一个完整化感作用必须满足的6个条件, 大量研究和综述已证实沉水植物对藻类的化感抑制现象, 并从沉水植物体内及其种植水中分离鉴定出多类化感抑藻物质, 如酚酸类、脂肪酸类、生物碱类、萜类和黄酮类物质^[20-24]; 化感物质对藻细胞生理生化过程的作用研究初步揭示了沉水植物化感作用对藻细胞膜、光合系统、呼吸系统结构功能的影响机制, 沉水植物化感物质可以通过对目标藻细胞的光合抑制、氧

收稿日期: 2015-09-21; 修订日期: 2016-03-10

基金项目: 国家自然科学基金(31500380); 河南省重点科技攻关项目(152102210289); 河南省高等学校重点科研项目(15A240001); 河南师范大学青年科学基金(2014QK25); 河南师范大学博士启动课题(qd14179)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31500380); Key Scientific and Technological Project of Henan Province (152102210289); Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (15A240001); Youth Science Foundation of Henan Normal University (2014QK25); Doctoral Scientific Research Start-up Foundation of Henan Normal University (qd14179)]

作者简介: 高云霓(1982—), 女, 土家族, 湖北宜昌人; 博士; 主要研究方向为水环境化学生态学。E-mail: gaoyun@htu.cn

通信作者: 刘碧云(1971—), 女, 湖北武穴人; 博士; 主要从事水生态净化与恢复方面的科研工作。E-mail: liuby@ihb.ac.cn

化胁迫和DNA损伤或诱导藻细胞程序性死亡等途径抑制藻类的生长繁殖^[25-29]。然而,迄今为止,还鲜有关于沉水植物化感抑藻作用化学生态机制方面的综述见刊,对于自然水体中沉水植物通过释放化感物质抑制藻类生长的模式、过程和机制少有阐述。因此,本文围绕沉水植物化感物质从释放到发挥抑藻作用这一过程,综述了国内外学者的相关研究,以期结合化感物质释放特性提出沉水植物化感抑藻的可能作用模式。

1 沉水植物化感抑藻物质的释放种类和含量

化感物质是化感作用的物质基础,就沉水植物对浮游藻类的化感作用而言,水环境是化感物质转运和作用的媒介,沉水植物体内的抑藻活性物质必须先释放到水环境中,再通过水的转运才能到达并作用于目标藻体。植物化感物质的确定,必须经历两个过程:一是从植物体内提取出抑藻活性物质;二是从植物分泌物中检测到这些物质。迄今为止已从穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)、马来眼子菜(*Potamogeton malaianus*)、金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)、伊乐藻(*Elodea nuttallii*)和苦草(*Vallisneria spiralis*)等多种沉水植物体内分离鉴定出多种具有抑藻活性的化感物质,主要属于酚酸、脂肪酸、生物碱、萜类和黄酮等类别^[22, 30-33]。

然而,从沉水植物分泌物中检测到的化感抑藻物质主要为酚酸和脂肪酸类物质。穗花狐尾藻作为一种具有强化感抑藻效应的沉水植物,是化感作用研究最多的物种之一。Gross等^[34]通过固相萃取和反相高效液相色谱分析发现,穗花狐尾藻释放到水中的化感物质主要为特里马素II和鞣花酸。Nakai等^[20, 21]通过液液萃取和超滤分离纯化检测到穗花狐尾藻释放到水中的鞣花酸、没食子酸、焦性没食子酸和右旋儿茶素等酚酸以及壬酸、油酸等脂肪酸。水鳖科沉水植物伊乐藻、轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)和苦草也可以释放多种酚酸和脂肪酸化感物质到水环境中^[35-37],另外还检测到N-苯基-1/2-萘胺,这两种物质也是凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)释放到水中的主要抑藻活性物质^[38]。

沉水植物释放到水中的化感物质含量低,均在 $\mu\text{g/L}$ 的水平。以10 g FW/L培养3d后伊乐藻、轮叶黑藻和苦草释放到水中的总酚含量分别为 (73.32 ± 1.18) 、 (33.02 ± 1.20) 和 (74.15 ± 1.06) $\mu\text{g/L}$,仅为各自植物体内总酚含量的0.8%、0.3%和1.0%^[35]。同样的现象在穗花狐尾藻化感物质研究中也发现,培

养两周后的穗花狐尾藻释放到水中的总酚也只占其植物体内含量的1.0%^[30]。具体到单个物质,以10 g FW/L的密度培养3d后,伊乐藻、轮叶黑藻和苦草3种植物释放到水中的各种酚酸含量大都低于10 $\mu\text{g/L}$ 。苦草释放到水中的阿魏酸含量仅有0.92 $\mu\text{g/L}$,在轮叶黑藻体内含量很高的咖啡酸释放到水中的含量只有29.73 $\mu\text{g/L}$,仅占其体内含量的0.25%^[39]。在不同密度下,植物释放到水中的酚酸量也不同,随着种植密度的增大,伊乐藻释放到水中的酚酸含量逐渐增加。就4种酚酸总量来看,10 g FW/L种植密度下伊乐藻种植水中4种酚酸总量为12.46 $\mu\text{g/L}$,50和100 g FW/L时分别为34.40和72.21 $\mu\text{g/L}$ ^[40]。100 g FW/L密度下的穗花狐尾藻释放到水中的没食子酸、焦性没食子酸、儿茶素和鞣花酸的含量分别为62.8、5.2、16.6和76.6 $\mu\text{g/L}$ ^[20]。200 g FW/L密度下轮叶黑藻渗滤液中单种酚酸含量不超过100 $\mu\text{g/L}$ ^[41]。

2 沉水植物化感物质的有效抑藻剂量

瓶养法和孔板法等经典的急性毒性测试方法是研究沉水植物化感物质抑藻活性的常用方法^[42]。其抑藻活性呈现显著的剂量-效应关系,低浓度时促进藻类生长,高浓度时才对藻类起到抑制作用。不同化感物质的有效抑藻浓度存在显著差异。从浮叶眼子菜(*Potamogeton natans*)体内分离鉴定到的6种内酯二萜类物质对羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)的生物测试结果显示,活性最高的物质对一株羊角月牙藻的半抑制浓度(EC_{50})为28.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[43]。比较C14-C18脂肪酸对羊角月牙藻的急性毒性,发现油酸抑藻毒性最高, EC_{50} 达到0.47 mg/L ^[44]。在穗花狐尾藻释放的脂肪酸中,壬酸对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的抑制作用最高, EC_{50} 达到 (0.5 ± 0.3) mg/L ,不饱和的油酸和顺式-6-十八烯酸也具有很强的抑藻效果^[21]。在C12-C22的多种饱和和不饱和脂肪酸中,油酸、亚麻酸和 α -亚麻酸对绿藻有较强抑制作用^[45]。迄今为止发现的抑藻效果最好的几种物质如壬酸和焦性没食子酸抑制铜绿微囊藻的 EC_{50} 分别为0.5和0.65 mg/L ^[20, 21],大部分化感物质则在浓度高于5 mg/L 时才有效抑制藻类生长^[46, 47]。

对于沉水植物化感抑藻机理的研究,也主要采用急性毒性试验的暴露方式。调查焦酚对铜绿微囊藻的化感抑制机理时,*prx*和*fabZ*基因在焦酚浓度低至1 mg/L 时表达量明显上调,说明铜绿微囊藻细胞暴露在1 mg/L 的焦酚中会受到氧化胁迫^[48]。穗花狐尾藻释放的4种酚酸中,没食子酸对铜绿微囊

藻光合系统 II (PS II) 的非光化学猝灭 (NPQ) 和实际量子产量 (Yield) 半抑制浓度最低, 分别为 (1.15 ± 0.23) 和 (1.49 ± 0.11) mg/L^[27]。暴露在 0.5 mg/L 壬酸中的铜绿微囊藻的氧释放受到显著抑制^[49]。阿魏酸对铜绿微囊藻的抑制作用机理研究显示, 比光合作用和细胞生长更灵敏的参数为膜电位和酯酶活性, 其 96h EC_{50} 值分别为 (0.39 ± 0.03) 和 (0.57 ± 0.15) mmol/L^[46]。

3 沉水植物化感物质释放水平下抑藻的作用模式

以上分析显示, 沉水植物释放到水中的化感物质含量在 $\mu\text{g/L}$ 的水平, 而常规毒性试验得到沉水植物化感物质抑藻的有效浓度却在 mg/L 水平。化感物质在释放水平对藻类的抑制模式应该不同于常规急性毒性试验中的一次作用。根据化感物质的释放特性, 联合作用和持续作用可能是沉水植物化感抑藻的主要模式。

3.1 联合作用

Inderjit 等^[50]认为几乎所有的化感作用都是由两种或两种以上化感物质的共同作用, 这种联合作用可以提高化感作用效果。化感物质联合作用研究主要借鉴环境毒理学中的急性毒性测试方法, 通过比较各物质单独和混合时的有效作用浓度, 可将联合作用效果分为相加、协同、拮抗或独立作用等类型。其中相加和协同作用指的是两种或两种以上物质对生物机体产生的生物学效应强度等于或大于它们分别单独作用时的生物学效应^[51]。评价方法的选择对联合作用类型的划分影响较大。现有评价方法主要基于浓度相加和独立作用两种概念^[52]。浓度相加概念主要是基于化学物质对目标生物的作用性质或方式相似的假设, 派生出的评价方法包括联合作用系数 (K) 法^[53]、毒性单元总数法 (S/TI)^[54-56]、等效线法^[57, 58]、TU 模型法^[59]。其中后两种为图示法, 且只适用于定性分析两种物质的联合作用效果。独立作用概念是建立在混合物中各物质对目标生物表现出不同作用模式的假设上^[60], 但是各物质混合作用时的半抑制浓度值需要在 SAS 等专业统计分析软件中通过递次求近法计算^[61]。在沉水植物化感物质抑藻作用研究中, 主要采用基于浓度相加概念的评价方法。

已有一些研究初步证实化学结构相似的化感物质间存在协同抑藻作用, 如穗花狐尾藻释放的四种酚酸以其释放浓度之比混合对铜绿微囊藻的生长和光合抑制表现出协同效应^[20, 27]。焦性没食子酸、没食子酸和儿茶酸三种物质以不同比例二维

和三维混合, 对铜绿微囊藻生长和光合作用的联合抑制表现为协同或相加效应^[62]。邻苯三酚和咖啡酸对铜绿微囊藻的联合抑制作用介于独立作用和相加作用之间^[63]。阿魏酸和对羟基苯甲酸联合作用时具有协同抑藻效应^[64]。多种苯甲酸的羟基衍生物混合后表现出对铜绿微囊藻的协同抑制作用^[65]。0.04 mg/L 亚油酸、0.03 mg/L α -亚麻酸和 0.70 mg/L 油酸等脂肪酸对产毒铜绿微囊藻的联合作用表现出显著的协同抑制效应, 作用第 5 天受试藻细胞全部死亡^[66]。壬酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸等 9 种脂肪酸对羊角月牙藻和铜绿微囊藻的多维联合毒性也表现出明显的协同作用, 证明饱和脂肪酸之间, 不同饱和度的同一碳链的脂肪酸, 以及不同碳链饱和、不饱和脂肪酸联合时, 均存在着协同抑藻作用^[71]。但酚酸或脂肪酸类化感物质的联合作用不仅与混合物种数有关, 还受到混合物中各物质本身的性质、混合比例等其他因素的影响。

不同类别化感物质间的联合对藻类的抑制效果也有增强。棕榈酸、苯甲酸和乳酸以毒性效应比例二维或三维混合, 对铜绿微囊藻的抑制作用表现出相加效应^[72]。邻苯二酚和亚油酸以等毒性单位比混合对铜绿微囊藻的抑制为协同效应。高云霓等选择咖啡酸、壬酸和 N-苯基-1-萘胺, 比较不同混合维数、不同物质、不同混合比例对联合抑藻作用效果的影响。结果显示, 12 个混合组分的联合抑藻作用大多表现为加和作用, 可以 2 倍或 3 倍地降低单个化感物质的有效抑藻剂量。混合比例对 3 种物质的联合抑藻效果影响最大, 其中抑藻效果最高的混合比例为等浓度比例。联合抑藻效果的强弱与组分中单个物质的抑藻活性有关, 抑藻活性相对最弱的咖啡酸在混合组分中所占比例越大, 联合抑藻效果越弱。上述 3 种化感物质和 7-甲基喹啉以等浓度比例二维或三维混合, 保持总暴露量 2.5 mg/L 进行亚急性抑藻测试, 发现 72h 抑藻测试低估了化感物质的联合抑藻效果, 8 种组合中 N-苯基-1-萘胺和壬酸混合组抑藻效果最好, 咖啡酸和 7-甲基喹啉的加入均减弱了混合组分的抑藻效果^[73]。

由此可见, 不论是沉水植物释放的酚酸或脂肪酸等同类化感物质之间, 还是不同类别化感物质之间, 都可以通过联合作用在降低单个物质作用剂量的同时表现出更好的抑藻效果。化感物质的联合抑藻作用视物质种类、数量、混合比例和受试生物的不同, 表现出不同的联合作用效应。这些研究有可能揭示自然水生态系统中当沉水植物存在时藻类数量明显减少的机理: 即通过多种化感物质的

联合作用在低浓度下达到控制藻类的效果。

3.2 持续作用

沉水植物化感抑藻作用效应的评价主要采用植物与藻类的共培养系统、植物种植水和植物浸提液的抑藻测试等方法,而不同方法得到的抑藻效果却有明显差别。例如,在研究小茨藻、马来眼子菜和菹草对铜绿微囊藻、斜生栅藻和汉氏菱形藻的抑藻效应时发现,化感物质可持续释放的草藻共培养系统中植物的抑藻效果强于植物种植水单次添加系统^[7, 74]。与单次添加相比,每天向藻液中添加一定量的穗花狐尾藻种植水,其抑藻效果明显提高,在相当于65 g FW/L的密度时可有效抑制铜绿微囊藻的生长,而草藻共培养系统中1 g FW/L的穗花狐尾藻就能抑制铜绿微囊藻的生长^[6]。粉绿狐尾藻种植水连续添加对铜绿微囊藻生长的抑制也显著强于一次添加的处理^[75]。显然,草藻共培养系统中沉水植物可以实时释放化感物质到水中去影响藻类,种植水的连续添加过程,半模拟了化感物质的多次释放和作用,两种方法测得沉水植物化感抑藻效果均显著强于单次添加种植水,由此推测,沉水植物化感物质的释放和作用应该是一个持续过程。

但是,从化感物质水平探讨持续抑藻作用过程的研究并不多。Nakai等^[76]先后检测了穗花狐尾藻5种酚酸和3种脂肪酸化感物质释放量的日变化动态,发现这些化感物可以长期在水中保持一定的剂量范围,脂肪酸化感物质的含量还会随着时间增加。这是首次直接从释放动态证明化感物质的释放是一个持续过程。笔者所在课题组进一步通过改变暴露方式,证明化感物质多次低剂量暴露比单次高剂量暴露抑藻效果好。壬酸、N-苯基-1-萘胺和咖啡酸的多次暴露组对铜绿微囊藻的抑制率是单次暴露组的1.8、1.1和1.6倍。3种化感物质以1h间隔10次暴露的壬酸和N-苯基-1-萘胺,抑制率随着单次添加量的减少而降低,但在单次暴露剂量低至0.1 mg/L时两种物质仍能显著抑制铜绿微囊藻的生长,第7天N-苯基-1-萘胺的平均生长抑制率仍可以达到50.25%。壬酸和N-苯基-1-萘胺在铜绿微囊藻生长的黑暗阶段多次暴露比在光照阶段的抑藻效果好,第3天的平均抑制率分别是光照阶段的2.2和1.3倍^[77]。在日暴露量达到0.5 mg/L的情况下,焦性没食子酸连续6d持续暴露可显著抑制铜绿微囊藻和羊角月牙藻的生长,并影响其形态特征和代谢过程^[78]。通过多次添加化感物质没食子酸到室外微宇宙系统中,蓝藻生长和多种酶的活性受到显著抑制,鱼、虾等非目标生物无影响^[79]。

4 展望

沉水植物对藻类的化感作用是由其释放的化感物质实现的。而最可能的作用模式就是沉水植物通过多种化感物质低剂量持续释放的方式,弥补其易于降解的性质,从而维持其一定的环境浓度,实现对目标藻类的持续有效胁迫。因此,化感物质低剂量联合作用和持续作用效应方面的研究亟待加强。另一方面,沉水植物化感物质释放到水中后,不可避免地受到水中生物和非生物因子的影响,比如光照、营养水平、微生物等,化感物质的结构和活性都有可能在到达目标藻类之前发生改变,同时也会影响到其所处微环境中的微生物群落等,从而间接调控藻类的群落结构。因此,结合生态因子开展化感物质的释放和作用模式研究,同样非常重要。

为此,今后有必要结合化感物质的来源、释放特征、活性等,在优化联合作用测试和评价方法的基础上加强持续低剂量水平下化感物质的联合作用研究;同时,进一步结合沉水植物与目标藻类的共存系统与原位实验,探讨不同生态环境条件下沉水植物化感物质的动态变化,以及目标藻体在细胞和分子等多个水平上的响应,以期全面揭示沉水植物化感抑藻的作用机制。

参考文献:

- [1] Inderjit, Wardle D A, Karban R, *et al.* The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 2011, **26**(12): 655—662
- [2] Farooq M, Jabran K, Cheema Z A, *et al.* The role of allelopathy in agricultural pest management [J]. *Pest Management Science*, 2011, **67**(5): 493—506
- [3] Schulz M, Marocco A, Tabaglio V, *et al.* Benzoxazinoids in rye allelopathy—from discovery to application in sustainable weed control and organic farming [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, **39**(2): 154—174
- [4] Blanco J A. The representation of allelopathy in ecosystem-level forest models [J]. *Ecological Modeling*, 2007, **209**(2): 65—77
- [5] Hilt S, Gross E M. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes [J]. *Basic and Applied Ecology*, 2008, **9**(4): 422—432
- [6] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes [J]. *Water Science and Technology*, 1999, **39**(8): 47—53
- [7] Wu Z B, Deng P, Wu X H, *et al.* Allelopathic effects of the submerged macrophyte *Potamogeton malaiianus* on *Scenedesmus obliquus* [J]. *Hydrobiologia*, 2007, **592**(1): 465—474

- [8] Mulderij G, Mooij W M, Smolders A J P, *et al.* Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides* [J]. *Aquatic Botany*, 2005, **82**(4): 284—296
- [9] Vanderstukken M, Declerck S A J, Decaestecker E, *et al.* Long-term allelopathic control of phytoplankton by the submerged macrophyte *Elodea nuttallii* [J]. *Freshwater Biology*, 2014, **59**(5): 930—941
- [10] Švanys A, Paškauskas R, Hilt S. Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: a mesocosm study [J]. *Hydrobiologia*, 2014, **737**(1): 57—66
- [11] Yao Y, He F, Hu S H, *et al.* Effects of allelopathy of submerged macrophytes on the phytoplankton community collected from the west part of the West Lake wetland in Hangzhou, China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, **36**(4): 1—8 [姚远, 贺锋, 胡胜华, 等. 沉水植物化感作用对西湖湿地浮游植物群落的影响. 生态学报, 2016, **36**(4): 1—8]
- [12] Deng P, Ma J M, Wu X H, *et al.* Dynamics of phytoplankton in the process of the aquatic macrophyte rehabilitation in Lake Yuehu, Wuhan [J]. *Journal of Lake Science*, 2007, **19**(5): 552—557 [邓平, 马剑敏, 吴晓辉, 等. 武汉月湖水生植被重建过程中浮游植物的动态变化. 湖泊科学, 2007, **19**(5): 552—557]
- [13] Rojo C, Segura M, Rodrigo M A. The allelopathic capacity of submerged macrophytes shapes the microalgal assemblages from a recently restored coastal wetland [J]. *Ecological Engineering*, 2013, **58**(1): 149—155
- [14] Shao J H, Li R H, Lepo J E, *et al.* Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: problems and prospects [J]. *Journal of Environmental Management*, 2013, **125**(1): 149—155
- [15] Erhard D, Gross E M. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton [J]. *Aquatic Botany*, 2006, **85**(3): 203—211
- [16] Mohamed Z A, Al Shehri A M. Differential responses of epiphytic and planktonic toxic cyanobacteria to allelopathic substances of the submerged macrophyte *Stratiotes aloides* [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2010, **95**(3): 224—234
- [17] Jasser I. The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions [J]. *Hydrobiologia*, 1995, **306**(1): 21—32
- [18] Körner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes [J]. *Journal of Phycology*, 2002, **38**(1): 862—871
- [19] Willis R J. The historical bases of the concept of allelopathy [J]. *Journal of the History of Biology*, 1985, **18**(1): 71—102
- [20] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* [J]. *Water Research*, 2000, **34**(11): 3026—3032
- [21] Nakai S, Yamada S, Hosomi M. Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum* [J]. *Hydrobiologia*, 2005, **543**(1): 71—78
- [22] Wang H Q, Cheng S P, Zhang S H, *et al.* Analysis of alkaloid from *Elodea nuttallii* by GC-MS and its allelopathic activity on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 361—366 [王红强, 成水平, 张胜花, 等. 伊乐藻生物碱的GC-MS分析及其对铜绿微囊藻的化感作用. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 361—366]
- [23] Zi J C, Mafu S, Peters R J. To gibberellins and beyond! Surveying the evolution of (Di) terpenoid metabolism [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, **65**(1): 259—286
- [24] Leslie A W, Ulrike M. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, **39**(1): 283—297
- [25] Wang J, Zhu J Y, Gao Y N, *et al.* Study on toxicity of allelochemicals released by submerged macrophytes to phytoplankton by flow cytometry [J]. *Allelopathy Journal*, 2013, **31**(1): 199—210
- [26] Hong Y, Hu H Y, Xie X, *et al.* Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, **91**(3): 262—269
- [27] Zhu J Y, Liu B Y, Wang J, *et al.* Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte (*Myriophyllum spicatum*) and its secretion [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, **98**(1): 196—203
- [28] He Y, Zhou Q H, Liu B Y, *et al.* Programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* induced by allelopathic effect of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* in co-culture system [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, DOI 10.1007/s10811-016-0814-7
- [29] Zhang T T, Wang L L, He Z X, *et al.* Growth inhibition and biochemical changes of cyanobacteria induced by emergent macrophyte *Thalia dealbata* roots [J]. *Biochemical Systematic and Ecology*, 2011, **39**(1): 88—94
- [30] Gross E M. Differential response of tellimagrandin II and total bioactive hydrolysable tannins in an aquatic angiosperm to changes in light and nitrogen [J]. *OIKOS*, 2003, **103**: 497—504
- [31] DellaGreca M, Fiorentino A, Isidori M, *et al.* Antialgal furano-diterpenes from *Potamogeton natans* L [J]. *Phytochemistry*, 2001, **58**(1): 299—304
- [32] Xian Q M, Chen H D, Liu H L, *et al.* Isolation and identification of antialgal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2006, **13**(4): 233—237
- [33] Erhard D, Pohnert G, Gross E M. Chemical defense in *Elodea nuttallii* reduces feeding and growth of aquatic

- herbivorous Lepidoptera [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2007, **33**(1): 1646—1661
- [34] Gross E M, Meyer H, Schilling G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, **41**(1): 133—138
- [35] Wu Z B, Gao Y N, Wang J, *et al.* Allelopathic effects of phenolic compounds present in submerged macrophytes on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Allelopathy Journal*, 2009, **23**(2): 403—410
- [36] Gao Y N, Liu B Y, Ge F J, *et al.* Isolation and identification of allelopathic fatty acids exuded from three submerged *Hydrocharitaceae* species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(1): 170—174 [高云霓, 刘碧云, 葛芳杰, 等. 三种水鳖科沉水植物释放的脂肪酸类化感物质的分离与鉴定. 水生生物学报, 2011, **35**(1): 170—174]
- [37] Gao Y N, Liu B Y, Wang J, *et al.* Allelopathic effects of phenolic compounds released by *Vallisneria spiralis* on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Lake Science*, 2011, **23**(5): 761—766 [高云霓, 刘碧云, 王静, 等. 苦草释放的酚酸类物质对铜绿微囊藻的化感作用. 湖泊科学, 2011, **23**(5): 761—766]
- [38] Sun W H, Yu S W, Yang S Y, *et al.* Allelochemicals from root exudates of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) [J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1993, **19**(1): 92—96 [孙文浩, 余叔文, 杨善元, 等. 凤眼莲根系分泌物中的克藻化合物. 植物生理学报, 1993, **19**(1): 92—96]
- [39] Gao Y N, Liu B Y, Xu D, *et al.* Phenolic compounds exuded from two submerged freshwater macrophytes and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2011, **20**(5): 1153—1159
- [40] Gao Y N, Zhang L P, Liu B Y, *et al.* Research on allelochemicals with material properties exuded by submerged freshwater macrophyte *Elodea nuttallii* [J]. *Advanced Materials Research*, 2014, **1024**(1): 71—74
- [41] Rao G G, Rao K N, Rao G R. Biochemical studies of *Hydrilla* and its leachates [J]. *Indian Journal of Environmental Biology*, 1980, **18**(1): 771—772
- [42] Wu Z B, Zhang Y Y, Liu B Y, *et al.* Allelopathy of Aquatic Macrophytes on Phytoplankton [M]. Beijing: Science Press. 2016, 281—297 [吴振斌, 张雨元, 刘碧云, 等. 大型水生植物对藻类的化感作用. 北京: 科学出版社. 2016, 281—297]
- [43] Cangiano T, DellaGreca M, Fiorentino A, *et al.* Lactone diterpenes from the aquatic plant *Potamogeton natans* [J]. *Phytochemistry*, 2001, **56**(1): 469—473
- [44] Kamaya Y, Kurogi Y, Suzuki K. Acute toxicity of fatty acids to the freshwater green alga *Selenstrum capricornutum* [J]. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**(5): 289—294
- [45] Wu J T, Chiang Y R, Huang W Y, *et al.* Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **80**(4): 338—345
- [46] Wang R, Hua M, Yu Y, *et al.* Evaluating the effects of allelochemical ferulic acid on *Microcystis aeruginosa* by pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometry and flow cytometry [J]. *Chemosphere*, 2016, **147**(2): 264—271
- [47] Zhang T T, Zheng C Y, Hu W, *et al.* The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2010, **22**(1): 71—77
- [48] Shao J H, Wu Z X, Yu G L, *et al.* Allelopathic mechanism of pyrogallo to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): From views of gene expression and antioxidant system [J]. *Chemosphere*, 2009, **75**(3): 924—928
- [49] Shao J H, Wu X Q, Li R H. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to nonanoic acid stress [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, **24**(6): 610—617
- [50] Inderjit, Dakshini K M M, Einhellig F A. Allelopathy: Organisms, Processes and Applications [M]. USA: ACS Symposium Series 582, 1995, 96—116
- [51] Meng Z Q. Foundation of Environmental Toxicology [M]. Beijing: Higher Education Press. 2003, 49—52 [孟紫强. 环境毒理学基础. 北京: 高等教育出版社. 2003, 49—52]
- [52] Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, *et al.* Simplifying complexity: Mixture toxicity assessment in the last 20 years [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, **32**(8): 1685—1687
- [53] Liu Y G. Foundation of Hygienic Toxicology (Ed. 3) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House. 1987, 47—49 [刘毓谷. 卫生毒理学基础(第三版). 北京: 人民卫生出版社. 1987. 47—49]
- [54] Xiu R Q, Xu Y X, Fu Y C, *et al.* Additive index of coefficients for aquatic toxicology [J]. *Environmental Chemistry*, 1994, **13**(3): 269—271 [修瑞琴, 许永香, 傅迎春, 等. 水生毒理联合效应相加指数法. 环境化学, 1994, **13**(3): 269—271]
- [55] Plackett R L, Hewlett P S. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides [J]. *Annals of Applied Biology*, 1948, **35**(1): 347—358
- [56] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures [J]. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, 1977, **634**(1): 99—108
- [57] Inderjit, Streibig J C, Olofsdotter M. Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, **114**(1): 422—428
- [58] Boillot C, Perrodin Y. Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospitals: Use of the toxicity index model and isoblogram representation [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,

- 2008, **71**(1): 252—259
- [59] Sprague J B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results [J]. *Water Research*, 1970, **4**(1): 3—32
- [60] Bliss C I. The toxicity of poisons applied jointly [J]. *Annals of Applied Biology*, 1939, **26**(3): 585—615
- [61] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, **56**(1): 13—32
- [62] Zhu J Y. Studies on the effects of allelochemicals released by submerged macrophytes on the photosynthesis of phytoplankton [D]. PhD thesis, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2011 [朱俊英. 沉水植物释放的化感物质对浮游植物光合作用影响的研究. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2011]
- [63] Hua M, Chen L Y, Yin D Q. The compare on the mechanism of pyrogallol acid and caffeic acid allelochemicals to algal (*Microcystis aeruginosa*) [J]. *Environmental Chemistry*, 2008, **27**(3): 331—334 [花铭, 陈良燕, 尹大强. 邻苯三酚和咖啡酸对铜绿微囊藻的化感作用及其机理. 环境化学, 2008, **27**(3): 331—334]
- [64] Zhang T T, Wu A P, He M, et al. The allelopathy and its mechanism of phenolic acids on water-bloom algae [J]. *China Environmental Science*, 2007, **27**(4): 472—476 [张庭廷, 吴安平, 何梅, 等. 酚酸类物质对水华藻类的化感作用及其机理. 中国环境科学, 2007, **27**(4): 472—476]
- [65] Wang H Q, Wu Z B, Zhang S H, et al. Study on relationship between allelopathic activity and molecular structure of various hydroxyl derivatives of benzoic acid and their synergistic effects on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Allelopathy Journal*, 2008, **22**(1): 205—212
- [66] Zhang T T, Zheng C Y, He M, et al. Inhibition on algae of fatty acids and the structure-effect relationship [J]. *China Environmental Science*, 2009, **29**(3): 274—279 [张庭廷, 郑春艳, 何梅, 等. 脂肪酸类物质的抑藻效应及其构效关系. 中国环境科学, 2009, **29**(3): 274—279]
- [67] Lu Z Y, Gao Y N, Liu B Y, et al. Advances in research on mechanism of inhibitory effects on phytoplankton mediated by aquatic plant allelochemicals [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013, **36**(7): 64—69 [鲁志营, 高云霓, 刘碧云, 等. 水生植物化感抑藻作用机制研究进展. 环境科学与技术, 2013, **36**(7): 64—69]
- [68] Wu Z X, Shi J Q, Yang S Q. The effect of pyrogallol acid on growth, oxidative stress, and gene expression in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) [J]. *Ecotoxicology*, 2013, **22**(3): 271—278
- [69] Iason G R, Dicke M, Hartley S E. The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes [M]. UK: Cambridge University Press. 2012, 154—169
- [70] Hasler A D, Jones E. Demonstration of the antagonistic action of large aquatic plants on algae and rotifers [J]. *Ecology*, 1949, **30**(3): 359—364
- [71] Hu C Y, Ge F J, Zhang S H, et al. Isolation of antialgal compounds from *Potamogeton malaianus* and algal inhibitory effects of common fatty acids [J]. *Journal of Lake Science*, 2010, **22**(4): 569—576 [胡陈艳, 葛芳杰, 张胜花, 等. 马来眼子菜体内抑藻物质分离及常见脂肪酸抑藻效应. 湖泊科学, 2010, **22**(4): 569—576]
- [72] Wang H Q, Zhu H J, Zhang L P, et al. Organic acid from *Elodea nuttallii* by GC-MS and its inhibitory effects on algae growth [J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, **34**(7): 23—26 [王红强, 朱慧杰, 张丽萍, 等. 伊乐藻中有机酸的GC-MS分析及其抑藻作用研究. 环境科学与技术, 2011, **34**(7): 23—26]
- [73] Gao Y N, Liu B Y, Ge F J, et al. Joint effects of allelochemical nonanoic acid, N-phenyl-1-naphthylamine and caffeic acid on the growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Allelopathy Journal*, 2015, **35**(2): 1—9
- [74] He F, Deng P, Wu X H, et al. Allelopathic effects on *Scenedesmus obliquus* by two submerged macrophytes *Najas minor* and *Potamogeton malaianus* [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2008, **17**(1): 92—97
- [75] Wu C, Chang X X, Dong H J, et al. Allelopathic inhibitory effect of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. on *Microcystis aeruginosa* and its physiological mechanism [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, **28**(6): 2595—2603 [吴程, 常学秀, 董红娟, 等. 粉绿狐尾藻对铜绿微囊藻的化感抑制效应及其生理机制. 生态学报, 2008, **28**(6): 2595—2603]
- [76] Nakai S, Zou G, Okuda T, et al. Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* [J]. *Water Science and Technology*, 2012, **66**(5): 993—999
- [77] Gao Y N, Ge F J, Liu B Y, et al. Comparative study on antialgal effects of allelochemicals from aquatic plants under different exposure protocols [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, **24**(4): 554—560 [高云霓, 葛芳杰, 刘碧云, 等. 不同暴露方式下水生植物化感物质抑藻效应的比较研究. 生态环境学报, 2015, **24**(4): 554—560]
- [78] Lu Z Y, Liu B Y, He Y, et al. Effects of daily exposure of cyanobacterium and chlorophyte to low-doses of pyrogallol [J]. *Allelopathy Journal*, 2014, **34**(2): 195—205
- [79] Techer D, Fontaine P, Personne A, et al. Allelopathic potential and ecotoxicity evaluation of gallic and nonanoic acids to prevent cyanobacterial growth in lentic systems: A preliminary mesocosm study [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, **547**(1): 157—165

RESEARCH ADVANCES ON THE MODES OF ACTION FOR ALLELOPATHIC ALGAL INHIBITION BY SUBMERGED MACROPHYTES BASED ON THE RELEASE CHARACTERISTICS OF ALLELOCHEMICALS

GAO Yun-Ni^{1,2}, DONG Jing¹, HE Yan^{2,3}, GE Fang-Jie², LIU Bi-Yun² and WU Zhen-Bin²

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. College of Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Allelopathic algal inhibition is one of important mechanisms for submerged macrophytes to gain a competitive advantage and stabilize clear-water states. Allelochemicals are secondary metabolites produced and released into water environment by submerged macrophytes, which are pivotal for submerged macrophytes to exert allelopathic algal inhibition. Hence, it is very important to clarify their modes of action, process and mechanisms of allelochemicals. Varieties and contents of allelochemicals were released by submerged macrophytes, and their algal inhibitory effects were reviewed, indicating that the modes of action for allelochemicals at releasing levels were different from a single function in traditional acute toxicity assays. To figure out how allelochemicals at releasing levels to exert effective algal inhibition, combined and continual action as two possible modes of action were discussed. It was proposed that multiple allelochemicals of submerged macrophytes might be released continuously at low-dosage levels to exert a persistent and synergetic inhibition on target algae. In the future research, plant-algae coculture system, in situ experiments, analytical chemistry, plant chemistry, cell biology, and molecular biology are extremely essential for understanding allelopathical mechanisms of submerged macrophytes on phytoplankton.

Key words: Allelochemicals; Release contents; Effective algal inhibitory dosage; Combined action; Continual action