

苦草 (*Vallisneria spiralis*) 释放的酚酸类物质对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的化感作用*

高云霓¹, 刘碧云¹, 王静^{1,2}, 贺锋¹, 梁威¹, 徐栋¹, 张丽萍¹, 吴振斌^{1**}

(1: 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)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用广谱性固相萃取小柱富集以 10 g(FW)/L 的密度培养三天后的苦草 (*Vallisneria spiralis*) 种植水, 不同溶剂洗脱得到的各组分对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的生长表现出不同程度的抑制, 其中甲醇洗脱组分抑藻活性最强. 去除该组分中的酚酸后, 其抑藻活性下降了 22.8%, 表明酚酸参与到苦草的化感抑藻作用中. 甲醇组分通过液液萃取进一步分离, 得到的乙酸乙酯组分进行 GC-MS 分析, 从中检测到苯甲酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸、邻苯二甲酸、对羟基苯丙酸、香草酸、原儿茶酸、阿魏酸和咖啡酸等九种酚酸. 酚酸抑藻测试的结果显示其抑藻活性与本身的结构有关, 不同酚酸以毒性效应比例多维混合表现出加和抑藻效应, 且随着混合种数的增多, 酚酸的加和效应增强. 以上结果显示苦草可以释放酚酸, 抑制铜绿微囊藻的生长, 多种化感物质的联合作用可能是水生生态系统中沉水植物抑制蓝藻生长的一个重要机制.

关键词: 苦草; 分泌物; 酚酸; 铜绿微囊藻; 化感作用

Allelopathic effects of phenolic compounds released by *Vallisneria spiralis* on *Microcystis aeruginosa*

GAO Yunni¹, LIU Biyun¹, WANG Jing^{1,2}, HE Feng¹, LIANG Wei¹, XU Dong¹, ZHANG Liping¹ & WU Zhenbin¹

(1: State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

(2: Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

Abstract: Culture solutions of the submerged freshwater macrophyte *Vallisneria spiralis*, incubated at 10 g(FW)/L for three days, were extracted by solid phase extraction (SPE) with broad spectrum cartridges, and eluted with different solvents. The acquired fractions exerted various inhibitory effects on the growth of *Microcystis aeruginosa*, and the methanol-eluted fraction showed the strongest effect. After removing the phenolic compounds from the fraction, the inhibition rate was decreased by 22.8%, indicating that the phenolic compounds controlled the algal growth inhibition of *V. spiralis*. Moreover, the methanol-eluted fraction was further separated by liquid extraction (LLE), and the acquired ethyl acetate fraction was analyzed by gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS). Nine phenolic compounds were identified: benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, p-hydroxyphenylacetic acid, phthalic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, ferulic acid and caffeic acid. The algal inhibition test showed that the antialgal effects of the phenolic compounds were influenced by their structures. The multiple phenolic compounds, mixed at a ratio corresponding to their single toxicity, showed additive effects in most cases, which became much obvious with the increase of phenolic classes in the mixture. These results indicate that *V. spiralis* could release phenolic compounds to inhibit the growth of *M. aeruginosa*, and the joint action of multiple allelochemicals may be an important allelopathic factor of submerged macrophytes to inhibit the growth of noxious cyanobacteria in natural aquatic ecosystems.

Keywords: *Vallisneria spiralis*; plant exudates; phenolic compounds; *Microcystis aeruginosa*; allelopathy

* 国家自然科学基金项目 (30870221, 20877093, 50808172) 和湖北省自然科学基金项目 (2009CDB381) 联合资助. 2010-11-01 收稿; 2011-01-24 收修稿. 高云霓, 女, 1982 年生, 博士; E-mail: gaoyun@ihb.ac.cn.

** 通讯作者; E-mail: wuzb@ihb.ac.cn.

作为水生生态系统中重要的初级生产者,沉水植物除了在营养、光照和空间上与其它初级生产者尤其是藻类相互竞争资源外^[1],还可以通过释放化感物质来影响邻近植物的生长,从而保持自身的竞争优势,维持水体以水生植物占优势的清水状态^[2].尽管早在20世纪初,就有关于沉水植物加拿大伊乐藻(*Elodea canadensis*)对浮游藻类化感作用现象的报道^[3],沉水植物对藻类的化感作用研究在近几年才因为技术的进步和关注度的提高得以广泛开展.已有的研究主要集中于活性植株的筛选和沉水植物体内活性抑藻物质的分离鉴定^[4].Wium-Andersen等从具有化感活性的金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)植株体内发现了一种硫磺化合物^[5].胡陈艳等从马来眼子菜体内提取到多种具有抑藻活性的脂肪酸^[6].Xian等从苦草(*Vallisneria spiralis*)叶片中提取出2-乙基-3-甲基马来酰亚胺等抑藻物质^[7].在已发现的植物化感物质中,酚酸是其中的一个重要类别,许多沉水植物体内均有酚酸存在^[8-9].穗花狐尾藻(*Myriophyllum spicatum*)体内分离出了12种酚酸^[10],有的还可以释放到周围的水体抑制藻类生长^[11-12].沉水植物的化感抑藻作用被认为是水生生态系统中大型植物控制浮游藻类生物量和结构组成的重要机制之一^[13].

苦草是一种广泛分布于长江中下游浅水湖泊中的水鳖科沉水植物^[14-15].苦草的水浸提物和种植水均可以显著抑制多种浮游或附着藻类的生长^[16-17].在与水华蓝藻铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的共培养实验中,苦草对铜绿微囊藻的生长也表现出明显的抑制作用^[18].说明苦草能产生并释放具有抑藻活性的物质到水环境中,但主要是哪些物质目前还不清楚.在自然生态系统中,植物产生的化感物质要发挥抑藻作用,首先必须被释放到体外环境中^[19].而目前对沉水植物化感物质释放情况的研究还很少.基于此,本实验以苦草为研究对象,调查其是否释放酚酸类物质来抑制铜绿微囊藻的生长,主要研究内容如下:(1)筛选苦草分泌物中的活性抑藻组分;(2)测试酚酸去除前后分泌物抑藻活性变化;(3)分离和鉴定苦草释放到水中的主要酚酸类物质;(4)调查酚酸的联合抑藻作用.

1 材料和方法

1.1 试剂与标准物质

聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)购自美国Sigma公司,双(三甲基硅烷基)氟乙酰胺(BSTFA)购自美国Sigma-Aldrich公司.标准物质包括苯甲酸(天津市申泰化学试剂有限公司)、对羟基苯甲酸(上海化学试剂采购供应五联化工厂)、原儿茶酸(Alfa Aesar公司)、香草酸(Sigma-Aldrich公司)、阿魏酸(Sigma-Aldrich公司)和咖啡酸(Sigma-Aldrich公司).所有的溶剂和试剂均为色谱纯.

1.2 苦草的采集与培养

苦草采自武汉月湖(30°33'N,114°15'E),然后用来自同一样点的底泥室外水泥缸培养.实验前一个月左右转入实验室内底泥培养,培养条件为3000 lx光照强度,12:12 h光暗周期,25℃.实验开始前15 d,新鲜植物用自来水反复冲洗去除植物表面的附着物.然后在同上的培养条件下用M III培养液^[20]适应培养,发现有新枝长出.培养液每五天换一次.为减少微生物在共培养体系中对藻类生长的影响,用于培养的玻璃方缸和营养盐都经过灭菌处理.正式实验时挑选苦草的新生完整植株(整株长不超过50 cm),自来水清洗,双蒸水润洗后,在无菌M III培养液中以10 g(FW)/L的密度相同条件下培养3 d.

1.3 苦草分泌物的提取

培养结束后,取出植物,用GF/F滤纸(Whatman, UK)抽滤种植水,去除颗粒物,然后每2 L转移到一个干净锥形瓶中,分别采用预处理过的Oasis HLB固相萃取小柱(500 mg,6 cc. Waters, 美国,下同)富集.富集完的小柱用20 ml的超纯水清洗,真空抽干.

在分泌物活性组分的筛选实验中,富集的5个小柱分别用10 ml正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮和甲醇洗脱,得到的各洗脱组分常温氮吹干去除溶剂后,重新溶解在0.5 ml二甲亚砜中进行抑藻测试.选择抑藻活性最高的萃取方法即甲醇洗脱用于后续实验.

酚酸去除实验中,固相萃取得到的甲醇洗脱组分旋蒸干(40℃,70转/分)后重新溶解在50%甲醇中,然后取一部分与PVPP(最终浓度为5% [W/V])混合,8±2℃过夜后,悬浮液离心,得到的上清液旋蒸干,重新溶解在50%甲醇中,与PVPP处理前的等量洗脱液同步进行抑藻测试.

在酚酸物质的分离鉴定实验中,合并5个小柱的甲醇洗脱液旋蒸干后重新溶解在20 ml超纯水中,然后

通过改良的液液萃取方法^[16]进一步分离. 2 M NaOH 将水相调 pH 到 12 后, 用正己烷萃取三次, 然后水相用 2 M HCl 将 pH 调到 2, 用乙酸乙酯萃取 4 次. 收集乙酸乙酯组分, 用无水硫酸钠干燥, 旋蒸浓缩, -20 °C 保存, GC-MS 分析前采用 BSTFA 硅烷化^[21]. 同时设一无植物的 M III 培养液作为对照同步进行处理.

1.4 GC-MS 分析

GC-MS 分析在串联的 HP 6890 色谱仪和 HP 5973 质谱仪上进行. 所采用的毛细管柱型号为 HP5-MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm). 载气为氦气, 流速为 1.0 ml/min. 柱升温程序如下: 平衡 0.5 min, 起始温度 50 °C, 保持 1 min, 然后以 10 °C/min 升温到 280 °C, 最后保持 5 min. 进样温度和转移线温度均为 280 °C. 进样量为 1 μl, 以无分流模式进样. 各个峰的鉴定参照 NIST02 标准谱库, 面积归一化法计算样品中各物质的相对含量.

1.5 抑藻测试

用于所有组分和物质抑藻测试的受试藻均为来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库的铜绿微囊藻 (FACHB942), 保种和实验期间均用无菌 BG11 培养基^[22]在 2500 lx, 12:12 h 光暗比, 25 ± 1 °C 下培养, 培养期间, 每天手工摇动两次.

抑藻测试按照 ISO 8692 标准^[23]执行. 对于不同溶剂洗脱组分和 PVPP 处理前后分泌物的抑藻测试, 每个样品取相当于 2 mg (DW)/ml 的量添加到含有 100 ml 无菌 BG11 培养液的 250 ml 锥形瓶中, 然后接种对数生长期的铜绿微囊藻 (起始密度约为 1.0 × 10⁶ cells/ml). 对照则添加相当于样品体积的等量二甲亚砜 (DMSO) 或甲醇水溶液. 对香草酸、原儿茶酸、阿魏酸和咖啡酸四种酚酸, 标准物质先溶解在 DMSO 中, 然后稀释成不同浓度梯度, 添加到总体积为 20 ml 的藻液 (起始浓度为 1.0 × 10⁶ cells/ml) 中, 同步设不添加物质的对照. 根据预实验的结果, 每种物质设置 5 个浓度梯度用于计算其半抑藻浓度 (EC₅₀). 抑藻测试中每个处理和对照均设 3 个平行, 按上述条件培养 72 h 后, 光学显微镜 (Olympus BH2, 日本) 下进行细胞计数. 助溶剂 DMSO 和甲醇的添加比例均低于 0.3%, 已通过预试验证明对铜绿微囊藻的生长无影响.

联合作用实验中所选物质包括香草酸、原儿茶酸、阿魏酸、咖啡酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸, 根据各物质单独作用时 EC₅₀ 从小到大的顺序按二维、三维、四维和六维混合, 比较各组混合物以毒性效应比混合后的联合效应: 由咖啡酸和原儿茶酸以 1:3 的比例二维混合, 咖啡酸、原儿茶酸和香草酸以 1:3:13 的比例三维混合, 咖啡酸、原儿茶酸、香草酸和阿魏酸以 1:3:13:28 的比例四维混合, 咖啡酸、原儿茶酸、香草酸、阿魏酸、苯甲酸和对羟基苯甲酸以 1:3:13:28:15:7 的比例六维混合. 毒性测试方法同前, 联合作用评价方法采用联合指数 (TI) 法^[24], 联合毒性由以下公式计算:

$$TI = \sum_{i=1}^n \frac{C_{mix_i}}{EC_{50_i}}$$

式中, C_{mix_i} 表示化合物 i 在联合毒性中的半抑制浓度 (mg/L); EC_{50_i} 表示该物质单独作用下的半抑制浓度 (mg/L). $TI < 0.5$ 表示协同作用; $0.5 \leq TI \leq 2$ 表示加和作用; $TI > 2$ 表示拮抗作用.

1.6 数据分析

数据均以平均值 ($n = 3$) ± 标准差的形式表现. 采用 SPSS 13.0 对数据进行统计分析. 苦草分泌物不同洗脱组间抑藻率的比较采用单因素方差分析, 组间间的多重比较采用 Tukey 检验. 配对 T 检验比较酚酸去除前后的抑制率. 抑藻测试中不同混合组间 TI 的差异显著性采用单因素方差分析, 组间间的多重比较采用 Tukey 检验. 联合指数 TI 与混合物种数间的相关性均采用 Pearson 相关分析. 所有的数据均通过正态分布检验 (Kolmogorov-Smirnov 检验) 和方差齐检验 (Levene's 检验).

2 结果与讨论

2.1 不同极性溶剂洗脱苦草分泌物的抑藻活性

在化感物质的分离鉴定过程中, 一般先通过不同溶剂萃取筛选活性组分, 在此基础上从活性组分中进一步分离纯化活性物质^[25-26]. 实验中采用的 Oasis HLB 固相萃取小柱具有广谱性, 可以吸附苦草培养液中疏水性及较强极性的各类物质, 同时本实验中所选用的五种洗脱溶剂极性跨度较大, 涵盖了疏水性到亲水性的各极性段, 能够洗脱小柱所吸附的各类型有机物质. 五种不同溶剂洗脱固相萃取富集的苦草分泌物得到

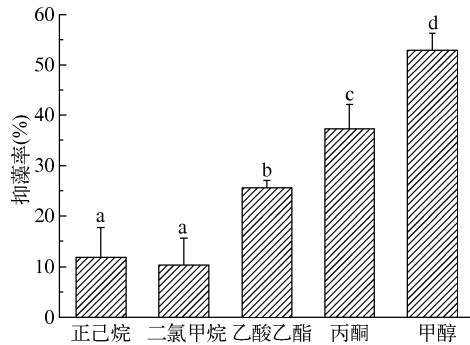


图1 不同溶剂洗脱固相萃取小柱富集的苦草分泌物的抑藻率(显著性差异用不同字母标出, Tukey 检验, $P < 0.05$)

Fig. 1 Algal growth inhibition of SPE enriched exudates from *V. spiralis* eluted with different solvents (Significant differences between fractions are indicated with different letters, Tukey test, $P < 0.05$).

实验对抑藻活性最强的甲醇洗脱组分进行 PVPP 处理, 通过 PVPP 与酚羟基的络合去除该组分中的酚酸类物质^[28-29]. 抑藻测试的结果表明 PVPP 处理后的苦草分泌物对铜绿微囊藻的抑制活性显著降低 ($P < 0.05$), 抑藻率由处理前的 52.9% 下降到 30.0%. 用于酚酸去除实验的样品为固相萃取得到的同一甲醇洗脱组分, PVPP 处理后苦草分泌物甲醇洗脱组分抑藻率的显著下降说明酚酸类物质参与了苦草分泌物对铜绿微囊藻的化感抑制作用, 同时可以肯定苦草能释放一些具有抑藻活性的酚酸物质到周围水环境中.

2.3 苦草释放的主要酚酸种类

为了鉴定苦草释放到培养液中主要的酚酸类物质, 在前期实验的基础上, 通过液液萃取方式对苦草分泌物的甲醇洗脱组分进一步分离, 得到的乙酸乙酯组分通过 GC-MS 分析, 共检测到 9 种酚酸, 分别是苯甲酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酸、邻苯二甲酸、对羟基苯丙酸、香草酸、原儿茶酸、阿魏酸和咖啡酸. 而这些物质在同样条件下提取的无植物对照中未检测到, 说明所检测到的这九种酚酸是从苦草体内释放到水环境中的. 苦草释放的各种酚酸的相对含量存在一定差异 (表 1), 其中含量超过 1% 的有苯甲酸 (1.3%), 咖啡酸 (1.3%), 对羟基苯甲酸 (1.3%) 和对羟基苯丙酸 (1.1%). 酚酸类物质总量所占比例为 5.9%. 结合酚酸去除实验的结果, 可以看出在苦草分泌物中所占比例较少的酚酸却贡献了近一半的抑藻作用, 进一步说明酚酸在苦草对铜绿微囊藻的化感抑制中具有重要的作用.

2.4 酚酸对铜绿微囊藻的联合抑制作用

酚酸的抑藻活性已有较多报道^[30]. 本文重点研究了苦草释放的香草酸、原儿茶酸、阿魏酸和咖啡酸的抑藻活性. 四种物质对铜绿微囊藻生长的抑制情况显著不同 ($P < 0.05$) (图 2a). 抑藻活性由强到弱的顺序如下: 咖啡酸 > 原儿茶酸 > 香草酸 > 阿魏酸. 从物质的结构特征来看, 咖啡酸和阿魏酸均属于苯丙烯酸系列, 原儿茶酸和香草酸均属于苯甲酸系列. 从苯环上的取代基团来看, 咖啡酸和原儿茶酸均是在苯环的间、对位上被羟基取代, 而阿魏酸和香草酸除了在苯环对位上被羟基取代外, 间位上均

的各组分对铜绿微囊藻的生长表现出不同程度的抑制作用 (图 1). 随着洗脱溶剂极性的增强, 洗脱组分对铜绿微囊藻生长的抑制率逐渐增大, 不同组分间差异显著 ($P < 0.05$). 洗脱剂极性相差越大, 洗脱组分间抑藻活性差异越明显. 极性相对较弱的正己烷和二氯甲烷组分抑藻率只在 10% 左右, 极性最强的甲醇组分抑藻率最高, 超过了 50%. 根据相似相溶原理, 正己烷和二氯甲烷洗脱下来的物质极性较弱, 强极性溶剂如甲醇洗脱下来的物质极性较强. Xian 等在分离苦草叶片的浸提物时得到两个极性相差较大的活性组分^[7], 而本实验中苦草释放到水中的活性组分则极性偏强.

2.2 酚酸去除前后苦草分泌物的抑藻活性比较

水生植物产生和释放的化感物质种类繁多^[13], 即使是一种水生植物也可以同时释放多种类别的化感物质到水环境中. Nakai 等就从同样条件下培养的穗花狐尾藻种植水中检测到分属于酚酸和脂肪酸的两大类化感抑藻物质^[12,27]. 酚酸是一类极性相对较强的物质, 为验证苦草向培养液中释放的抑藻活性物质是否含有酚酸类化合物, 本

表 1 苦草释放到水中的主要酚酸物质种类*
Tab. 1 Main phenolic compounds exuded from *V. spiralis*

序号 (No.)	停留时间 (min)	物质名称 (Name)	相对含量 (%)
1	10.54	苯甲酸 (Benzoic acid)	1.3
2	15.44	对羟基苯甲酸 (p-Hydroxybenzoic acid)	1.3
3	15.58	对羟基苯乙酸 (p-Hydroxyphenylacetic acid)	✓
4	16.24	邻苯二甲酸 (Phthalic acid)	✓
5	16.93	对羟基苯丙酸 (p-Hydroxyphenylpropionic acid)	1.1
6	16.98	香草酸 (Vanillic acid)	0.9
7	17.61	原儿茶酸 (Protocatechuic acid)	✓
8	20.07	阿魏酸 (Ferulic acid)	✓
9	20.66	咖啡酸 (Caffeic acid)	1.3

* ✓ 表示含量低.

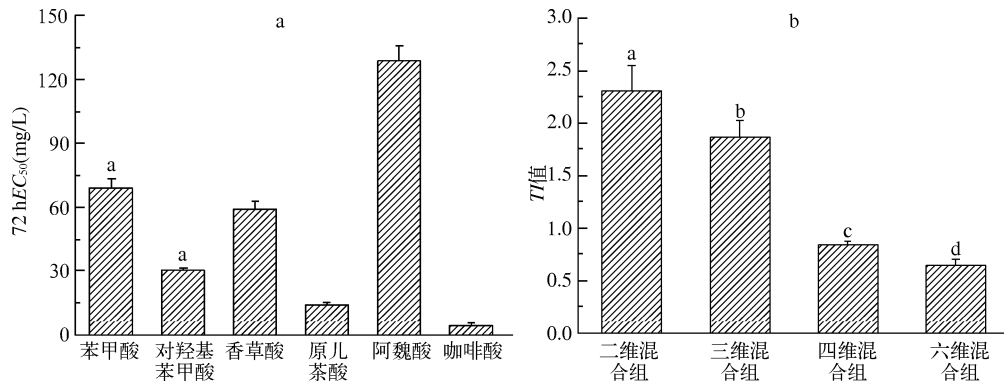


图2 酚酸对铜绿微囊藻的72 h EC_{50} (a) 和联合抑制作用(b) (均值 ± 标准差, $n=3$)

(显著性差异用不同字母标出, Tukey test, $P < 0.05$)

Fig. 2 The 72 h EC_{50} values(a) and joint inhibition of individual phenolic compounds(b) against the growth of *M. aeruginosa* (means ± standard deviation, $n=3$) (Significant differences between the treatments are indicated with different letters, Tukey test, $P < 0.05$)

被甲氧基取代。王红强^[31]采用相同的毒性测试体系得到苯甲酸和对羟基苯甲酸对同一株铜绿微囊藻的72h EC_{50} 分别为 69.3 ± 4.0 和 30.5 ± 0.7 mg/L(图2a)。结合各酚的抑藻活性,可初步推测:苯丙烯酸系列比苯甲酸系列的酚酸类物质抑藻活性高,苯环上对位和间位上的羟基取代基增强了物质的抑藻活性,甲氧基则削弱了物质的抑藻能力。

尽管各种酚酸都有不同程度的抑藻活性,但其半抑制浓度显著高于目前能够在水体中检测到的化感物质的分泌水平^[12]。同时也发现,苦草释放到水中的化感物质不只一种,本研究中检测到的酚酸就有九种。同样的现象在 Gross 等^[11]的研究中也有发现,穗花狐尾藻可以同时释放多种酚酸如特里马素 II 和鞣花酸等到水中。已有一些研究报道化感物质可以通过联合作用加强其抑藻作用^[12,31]。基于此,我们设计了一组实验来检测从苦草分泌物中分离到的几种酚酸的联合抑藻作用。各混合组对铜绿微囊藻的抑藻效应如图2b所示,单独抑藻作用最强的咖啡酸和原儿茶酸二维混合后对铜绿微囊藻的抑制作用表现出拮抗效应,在添加了香草酸后,三种物质的联合作用表现出加和效应,随着混和物质种数由三种增加到四种再增加到六种, TI 数值逐渐减小,加和效应逐渐增强。Pearson 相关分析的结果显示, TI 指数与混合物种数间存在极显著的负相关,相关系数为 $-0.907 (P < 0.01)$ 。由此可以看出,联合作用应该是苦草释放的酚酸类化感物质实现有效抑藻的一个重要模式,其联合抑藻效果随着酚酸混合种数的增加而增强。

致谢:张甬元、刘保元教授和周巧红副研究员对本论文的完成给予了多方面的指导,胡陈艳负责了本实验中样品的化学分析工作,朱俊英、葛芳杰和鲁志营对抑藻测试实验给予了协助,谨此致谢。

3 参考文献

- [1] 刘建康主编. 高级水生生物学. 北京: 科学出版社, 1999: 230.
- [2] Hilt S, Gross EM. Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic and Applied Ecology*, 2008, **9**(4): 422-432.
- [3] Schreiter T. Untersuchungen über den Einfluss einer Helodeawucherung auf das Netzplankton des Hirschberger Grossteiches in Böhmer in den Jahren 1921 bis 1925 incl V. Praze. Prague, 1928.
- [4] Van Donk E, Van de Bund WJ. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto-and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany*, 2002, **72**(3-4): 261-274.
- [5] Wium-Andersen S, Anthoni U, Houen G. Elemental sulphur, a possible allelopathic compound from *Ceratophyllum demersum*. *Phytochemistry*, 1983, **22**(11): 2613-2621.
- [6] 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.
- [7] Xian QM, Chen HD, Liu HL *et al.* Isolation and identification of antialgal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2006, **13**(4): 233-237.
- [8] Gross EM, Stützel R. Polyphenols with algicidal activity in the submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *Acta Horticulturae*, 1994, **381**: 710-716.
- [9] Erhard D, Gross EM. Do environmental factors influence composition of potential allelochemicals in the submersed freshwater macrophyte *Elodea nuttallii* (Hydrocharitaceae)? *Verh Internat Verein Limnol*, 2005, **29**: 287-291.
- [10] Planas D, Sarhan F, Dube L *et al.* Ecological significance of phenolic compounds of *Myriophyllum spicatum*. *Verh Internat Verein Limnol*, 1981, **21**: 1492-1496.
- [11] Gross EM, Meyer H, Schilling G. Release and ecological impact of algicidal hydrolysable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry*, 1996, **41**(1): 133-138.
- [12] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 2000, **34**(11): 3026-3032.
- [13] Erhard D. Allelopathy in aquatic environments. In: Reigosa M J, Pedrol N, González L, eds. *Allelopathy- a physiological process with ecological implications*. The Netherlands: Springer, 2006: 433-435.
- [14] 彭映辉, 简永兴, 王建波等. 湖北省五大湖泊水生植物多样性的比较研究. *水生生物学报*, 2004, **28**(5): 464-470.
- [15] 李 伟, 刘贵华, 熊秉红等. 1998 年特大洪水后鄱阳湖自然保护区主要湖泊水生植被的恢复. *武汉植物学研究*, 2004, **22**(4): 301-306.
- [16] Xian QM, Chen HD, Qu LJ *et al.* Allelopathic potential of aqueous extracts of submerged macrophytes against algal growth. *Allelopathy Journal*, 2005, **15**(1): 95-104.
- [17] 顾林娣, 陈 坚, 陈卫华等. 苦草种植水对藻类生长的影响. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 1994, **23**(1): 62-68.
- [18] 陈卫民, 张清敏, 戴树桂. 苦草与铜绿微囊藻的相互化感作用. *中国环境科学*, 2009, **29**(2): 147-151.
- [19] Blum U, Shafer SR, Lehman ME. Evidence for inhibitory allelopathic interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1999, **18**(5): 673-693.
- [20] Körner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology*, 2002, **38**(5): 862-871.
- [21] Zhang Z, Wu ZB, He L. The accumulation of alkylphenols in submersed plants in spring in urban lake, China. *Chemosphere*, 2008, **73**(5): 859-863.
- [22] Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB *et al.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1979, **111**(1): 1-61.
- [23] ISO. Water quality- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. DIN EN ISO 8692, 2004.
- [24] Zhu JY, Liu BY, Wang J *et al.* Study on the mechanism of allelopathic influence on cyanobacteria and chlorophytes by submerged macrophyte(*Myriophyllum spicatum*) and its secretion. *Aquatic Toxicology*, 2010, **98**(2): 196-203.
- [25] Leu E, Krieger-Liszkay A, Goussias C *et al.* Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiology*, 2002, **130**(4): 2011-2018.
- [26] Berger J, Schagerl M. Allelopathic activity of *Chara aspera*. *Hydrobiologia*, 2003, **501**(1-3): 109-115.
- [27] Nakai S, Yamada S, Hosomi M. Anti-cyanobacterial fatty acids released from *Myriophyllum spicatum*. *Hydrobiologia*, 2005, **543**(1): 71-78.
- [28] Erhard D, Gross EM. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. *Aquatic Botany*, 2006, **85**(3): 203-211.
- [29] Hilt S, Ghobrial MGN, Gross EM. *In situ* allelopathic potential of *Myriophyllum verticillatum* (Haloragaceae) against selected phytoplankton species. *Journal of Phycology*, 2006, **42**(6): 1189-1198.
- [30] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. *Water Research*, 2001, **35**(7): 1855-1859.
- [31] 王红强. 伊乐藻抑藻物质的分离、鉴定及其化感作用研究[学位论文]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2009.