

金鱼藻 (*Ceratophyllum demersum* Kom.) 对藻类的生化干预作用

袁峻峰* 章宗涉

(上海师范大学应用生态研究室, 上海 200234)

Q949.208

摘要 室内试验表明金鱼藻对普通小球藻 (*Chlorella vulgaris* Beij.) 和斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kutz.) 的生长有明显的生化干预作用。本研究表明, 金鱼藻和藻类共同培养, 用培养过金鱼藻的培养液直接培养藻类, 或用此培养液中提取的生物碱作藻类抑制实验, 藻类的生长均受到抑制。等量的金鱼藻经煮沸后, 对藻类的抑制作用高于原液。金鱼藻植株及其培养液中生物碱的含量与培养条件和时间有关。

关键词: 生化干预作用, 金鱼藻, 藻类, 生物碱。

植物间的生物化学相互作用现象早已为人们所注意^[1-3]。1937年Molisch用“Allelopathy”一词来描述一切植物间(包括微生物在内)的生化相互关系。由于当时研究的重点为植物间的相互毒害, 该词都理解为生化相克作用。近来, 由于植物间相促作用的大量发现, 此概念被扩大, 并被称为生化他感作用^[4]。

Muller提出“interference”一词以概括植物间复杂的相互关系^[5], 比较贴切、清楚, 有人译作干涉作用。考虑到“干涉”一词的社会含义, 本文建议用生化干预作用(Biochemical Interference)来表达植物间通过生物化学物质而发生的相互作用更为准确。

金鱼藻对藻类的生化干预现象前人已有研究^[6,7], 本文报告笔者的研究结果, 并作讨论。

1 材料与方 法

1.1 材 料

金鱼藻采自上海科普公园内小水塘。两种淡水藻类——斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 和普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 系笔者保存的藻种。藻种在实验开始前需经两周左右的扩大培养和驯化。

1.2 方 法

1.2.1 共同培养实验

1.2.1.1 培养金鱼藻对自然池水中藻类的影响 在上海师范大学植物园的温室中放入6个玻璃槽, 各盛园内小水池中池水100L, 水深25cm。3个玻璃槽中固定清洗过的金鱼藻(株长5cm, 每槽内金鱼藻总鲜重50g), 另3个玻璃槽不放金鱼藻作对照。试验过程中蒸发的水用池水补充, 以保持水深。每日充分搅动2次, 采用自然光照, 用温度计测定光照强度。池中藻类的生物量用叶绿素(chla)法测定。

1.2.1.2 金鱼藻对斜生栅藻的作用 金鱼藻固定在圆柱形玻璃培养缸底部, 与经预培养的斜生栅藻共同培养, 培养液中含氮43mg·l⁻¹, 磷4.4mg·l⁻¹, 每升加土壤浸出液0.5ml。9个缸分3组处理: (A) 分别放入金鱼藻8株(3g), (B) 16株(6g), (C) 不放金鱼藻, 每缸接

现在工作单位: 青岛海洋大学生物系, 266003。
本文于1990年11月6日收到, 修改稿于1991年8月4日收到。

种栅藻 1.03×10^4 个·ml⁻¹, 各试验组内 3 次重复。

各缸中试验液体积为 4l。深度为 23cm, 试验中蒸发的水分用蒸馏水补充。试验在恒温室(24±4℃)内进行, 光照强度 4000lx(12L/12D)。充分搅动, 每 2 天用显微镜计数藻类细胞。并用照度计测水层中照度。

1.2.1.3 金鱼藻对普通小球藻的作用 试验方法与(1.2.1.2)相同, (A)每缸放入金鱼藻 5 株(1.54g), (B) 每缸放金鱼藻 15 株(5.30g), (C) 不放金鱼藻作对照。接种小球藻浓度为 1.93×10^5 个·ml⁻¹叶绿素 a $124.81 \mu\text{g l}^{-1}$; 每 4d 测 chl a 含量, 并用照度计测水层中照度。

1.2.2 抽滤液培养栅藻实验

将培养过金鱼藻的培养液中 0.45μm 的微孔滤膜抽滤, 将得到的抽滤液用以培养栅藻。用(1.2.1.2)中的培养液作对照。试验在摇床内进行, 温度 24±2℃, 连续光照 4100±200lx

用蒸馏水稀释抽滤液, 使之浓度分别为原来的 1%、10%、75% 和 90%。然后各浓度都添加相当于培养液中含量的全部盐类。另有 2 组用经过煮沸的抽滤液, 配为 1% 和 90% 的浓度, 同样加入营养盐。试验共 7 组, 每组 3 个平行处理, 每个处理总体积 30ml, 放入经灭菌处理的 50ml 三角烧瓶, 接种栅藻 3.53×10^4 个·ml⁻¹, 封口, 放入摇床, 并固定位置。每隔 24h 计数藻类数量。

1.2.3 生物碱的提取、分析及其对斜生栅藻抑制作用的实验

金鱼藻的培养液用 0.45μm 的微孔滤膜抽滤, 将 5000ml 抽滤液在炉上加热蒸至 10—20ml, 再提取生物碱^[8]。植株中的生物碱提取, 直接将植株冰冻, 研磨后提取。在 10⁻⁴mol 的溴酚蓝酒精溶液中加入 1% 的酚, 滴定溶于甲醇的生物碱。生物碱的分子量按 350 计算。

用薄层层析法(TLC)分析生物碱的性质和成分。将硅胶制成的 TLC 板在纯甲醇中预展层, 以除去杂质, 用 110℃ 烘烤 2h, 使其活化。自然冷却后点样。在甲醇:氯仿:氨水(比重 0.880):水(50:50:12.5:10; V/V) 的展层剂中展层, 完毕后再在苯:甲醇(8:1; V/V) 的展层剂中从第二个方向展层, 干燥后用紫外光观察, 记录荧光点的形状、大小、位置, 求 Rf 值, 并记录颜色。

提取的生物碱——甲醇溶液水浴蒸干, 按照提取前抽滤液体积, 加蒸馏水配制 1%, 10%, 75%, 100% 和 500% 的浓度系列, 加入营养盐成(1.2.1.1, 1.2.1.2)中的浓度, 对照亦用此浓度, 培养条件与(1.2.1.2)完全相同, 接种栅藻浓度为 3.53×10^4 个·ml⁻¹。

2 结果

2.1 共同培养实验

2.1.1 培养金鱼藻对池水中藻类的影响 该实验共进行 13d, 试验结束时, 每个玻璃槽中金鱼藻鲜重为 125g, 增重 75g; 平均长度为 14cm, 增长 9cm。实测数据表明, 固定在槽底的金鱼藻在整个实验过程中对培养槽中光照的强度和分部无明显的影响。

所有培养槽中的藻类密度都显示了下降—上升—下降的过程, 试验结束时的藻类密度(叶绿素 a 处理组平均 $2.11 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, 对照组平均 $4.02 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)都远低于试验开始时的密度(叶绿素 a $16.58 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), 且组内各槽的变化亦不同步。但处理组的藻类密度一直低于同期的对照组, 对两组的藻类最大密度值进行 F 检验, 无水草和有水草间差异显著(叶绿素 a 最大值, $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 处理组 8.55 ± 2.84 , 对照组 20.67 ± 3.17 , $n=3$)。尚未对试验中藻类组成的变化进行详细分析。

2.1.2 金鱼藻对斜生栅藻的作用 试验共进行 15d。试验结束时, 处理 b 中金鱼藻鲜重由每缸 $3\text{g}(0.75\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$ 增加到 $4.87 \pm 0.35\text{g}$, 长度由 6cm 增加到 $9.35 \pm 1.28\text{cm}$; 处理 c 中金鱼藻鲜重由每缸 $6\text{g}(1.5\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$ 增加到 $9.07 \pm 2\text{g}$, 长度由 6cm 增加到 $9.2 \pm 1.91\text{cm}$; 实验表明金鱼藻对培养缸中光照无明显影响。试验结果见图 1。

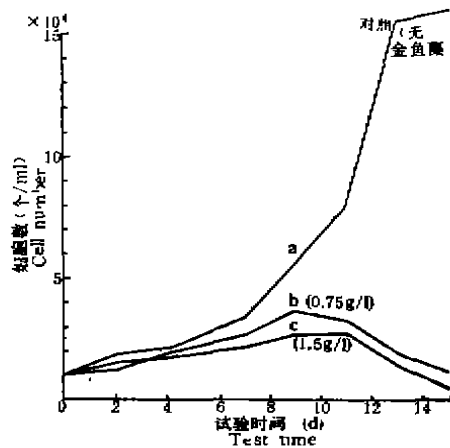


图1 金鱼藻对斜生栅藻的抑制效应
Fig.1 Inhibitory effect of *Ceratophyllum* on *Scenedesmus obliquus*.

a—Contrast
b—*Ceratophyllum* (0.75g/l)
c—*Ceratophyllum* (1.5g/l)

在本试验中, 金鱼藻对斜生栅藻的抑制作用非常明显, 用各试验组中藻类最大密度进行 F 检验, 有无金鱼藻的组间差异极显著, 且无水草组中藻类密度仍有上升趋势。

2.1.3 金鱼藻对普通小球藻的作用 试验共进行 22 d。第 6、7 天为连续 48h 停电, 对试验过程稍有影响, 但未影响结果。试验结束时, 处理 b 中金鱼藻鲜重由每缸 $1.54\text{g}(0.39\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$, 增加到 $4.92 \pm 0.38\text{g}$, 长度由 5cm 增加到 $14.4 \pm 0.69\text{cm}$; 处理 c 中鲜重由每缸 $5.3\text{g}(1.325\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$ 增加到 $12.16 \pm 0.54\text{g}$, 长度由 5cm 增加到 $17.05 \pm 1.26\text{cm}$ 。试验结果见图 2。

虽然受到停电的影响, 数据有不规则的变动, 但金鱼藻对普通小球藻的抑制作用非常明显, 且与金鱼藻在培养缸中密度有明显的关系, 3 个试验组之间藻类密度最大值的 F 检验均显著, 表明了这一关系。试验结束时, 无水草组的藻类密度仍在继续上升。

由表 1 可见, 抽滤液对斜生栅藻生长有抑制作用, 75% 和 90% 组更为明显。而 1% 煮沸与未煮沸组在 96h 有显著差异, 90% 的煮与未煮组间在 48h、72h 和 96h 差异都极显著。煮沸处理组与对照组间显著和极显著差异亦存在, 未在表上列出, 可从相应的未煮组与对照的比较来推知。1% 组在 96h 与对照组中的数据很接近, 可能与抽滤液的量很少有关。煮沸处理造成的差异将在讨论中进一步探讨。

2.2 金鱼藻的提取分析及其对斜生栅藻的作用

生物碱在培养液和金鱼藻植株中的含量见表 2。由表 2 可见, 由于培养的地点、时间及培养液中营养盐浓度的不同, 生物碱含量在植株和培养液中均有所不同。其原因尚需进一步

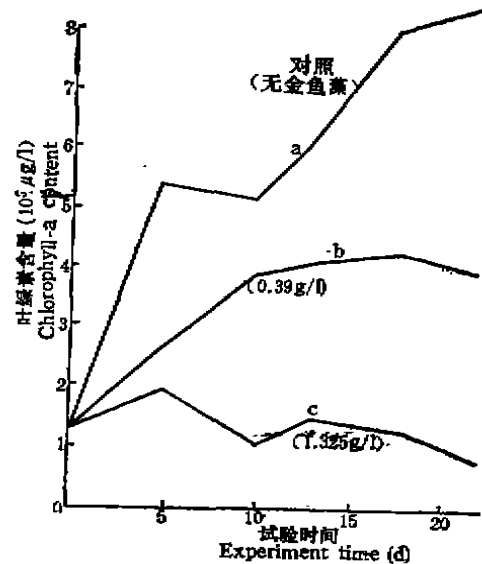


图2 金鱼藻对普通小球藻的抑制效应
Fig.2 Inhibitory effect of *Ceratophyllum* on *Chlorella vulgaris*.

a—Contrast
b—*Ceratophyllum* (0.39g/l)
c—*Ceratophyllum* (1.325g/l)

表1 抽滤液对斜生栅藻的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of filtrate, supplemented with nutrients, on *Scenedesmus obliquus* (cell number $\times 10^4 \text{ml}^{-1}$: mean \pm SD)

处理 Treatment	0	24	48	72	96	(h)
对照 Contrast	3.53	7.98 \pm 0.33	33.6 \pm 1.11	117 \pm 3.06	267 \pm 9.29	
1%	3.53	6.53 \pm 0.32	25.3 \pm 1.00*	71.4 \pm 1.07**	239 \pm 10.41	
1% (boiled)	3.53	6.59 \pm 0.44	24.6 \pm 1.72	76.9 \pm 2.21	239 \pm 13.86*	
10%	3.53	6.61 \pm 0.03	22.4 \pm 0.80**	67.7 \pm 1.25**	244 \pm 32.53	
75%	3.53	6.38 \pm 0.60	26.0 \pm 2.16*	95.3 \pm 2.85*	216 \pm 14.73*	
90%	3.53	6.29 \pm 0.13*	27.5 \pm 1.90*	71.2 \pm 1.05**	168 \pm 10.26**	
90% (boiled)	3.53	4.69 \pm 0.33*	13.2 \pm 0.76**	40.0 \pm 3.15**	142 \pm 10.26**	

*,** 与对照比较差异显著或极显著。

*,** 同一浓度组煮沸与未经煮沸组间差异显著或极显著。

表2 金鱼藻培养液和植株中生物碱的含量

Table 2 Contents of alkaloids in *Certophyllum* and culture medium

培养时间(d) Duration of culture	氮和磷的浓度 ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) Concentration of nitrogen and phosphorus	生物碱含量	
		植株($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) Contents of in plant	培养液($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) Alkaloids in medium
恒温室 16 In constant temperature	43; 4.4	40.7	1.29×10^{-3}
温室 50 In green house	1; 1	23.3	2.59×10^{-4}

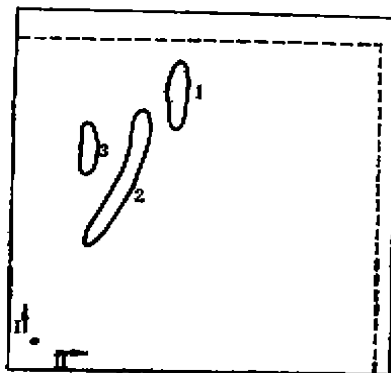


图3 生物碱的薄层层析图(2:1)
Fig.3 TLC-graph of alkaloids

研究。

生物碱的 R_f 值见表3, 薄层层析图见图3。

生物碱色斑在紫外线下为淡黄色。

表3 生物碱的 R_f 值Table 3 The R_f value of alkaloids

色斑号 No. of spots	甲醇-氯化铵-氨水-水 Methanol-ammonium hydroxide-water	苯-甲醇 Benzene-methanol
1	0.69	0.42
2	0.74	0.31
3	0.69	0.16

生物碱斜生栅藻的抑制作用见表4。各试验组含有等量的营养盐, 可以排除营养因子对实验结果的影响。

将不同浓度生物碱作用的结果进行回归分析, 藻类生长情况 Y 与生物碱浓度 X 的关系为: $Y = -3.3277 \lg X + 17.5854$, $r = -0.9718$ 。随生物碱浓度增加, 藻类所受抑制增强。

3 讨论

生化干预作用在自然界中普遍存在, 许多植物分泌物起生化干预作用, 影响其他植物的生长、发育, 甚至影响本种的种子萌发和幼苗的生长。在淡水中, 水生高等植物对藻类的生化干预作用也日益受到重视, 成为一个重要的研究领域。

表4 生物碱对斜生栅藻的抑制作用
Table 4 Inhibitory effect of alkaloids on
Scenedesmus obliquus
(cell number $\times 10^4 \text{ml}^{-1}$: mean \pm SD)

处理 Treatment	0	24	48 (h)
对照	3.53	7.98 \pm 0.32	53.6 \pm 1.11
1%	3.53	7.20 \pm 0.40	24.2 \pm 0.96**
10%	3.53	6.42 \pm 0.29	21.5 \pm 0.81**
75%	3.53	7.34 \pm 0.08	18.1 \pm 0.46**
100%	3.53	5.82 \pm 0.17	18.2 \pm 0.30**
500%	3.53	5.42 \pm 0.66	16.0 \pm 0.58**

** 与对照比较差异极显著。

Anabaenopsis 的生长可受抑制, 且某些绿藻(栅藻和小球藻)似乎有抗性^[7], 这一结果与本文的结论有所不同, 其原因尚需进一步研究。

本文的研究表明, 金鱼藻对普通小球藻、斜生栅藻的生长有明显的干预作用, 这种作用在排除了光照和营养因子之后依然存在, 这是一种典型的生化干预作用。这种生化干预的效果随金鱼藻在培养缸中量的增加而增加。至于金鱼藻和藻类之间能否达到某种平衡或在什么条件下可达到平衡, 尚需进一步的研究。

从培养过金鱼藻的培养液中提取的生物碱对斜生栅藻的生长也有明显的生化干预作用, 其抑制效果高于相应量的培养液(对照表1和表4), 从表1我们还可以看到, 煮沸可以增加抽滤液的抑制效果, 这一现象有2个可能的原因: (1)培养液中存在某种拮抗物质, 可拮抗生物碱的部分作用, 这类物质可能在煮沸或生物碱提取过程中失去; (2)在煮沸或提取生物碱的过程中, 生物碱本身的结构发生了改变, 增加了它对藻类的作用。生物碱在植物体内本来是与多糖分子相结合而存在的, 提取生物碱时这种多糖被除去, 是极可能的原因之一, 但它不能说明煮沸的作用, 因为煮沸不能去掉多糖。

生物碱广泛存在于各种水草, 可能是一种普遍存在的生化干预物质^[8,11]。

金鱼藻中生物碱的含量和分泌在其培养液中的浓度与培养条件有关, 试验条件好和差相比较, 植株中含量为1.75倍, 培养液中的5倍, 条件越好, 植株中和培养液中的含量越高, 这可能是一种生态上的适应。

生物碱的浓度与其抑藻效果成正相关, 和水草多时抑制效果强是一致的。

参 考 文 献

- [1] Rice E L. *Allelopathy* (Second Edition). Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1984, 267—292, 320—351
- [2] 宋君. 植物间的拖踏作用. 生态学杂志. 1990, 9(6):43—47
- [3] 郑霞, 李少菁. 植物间的生化相互作用研究——生态生化学的新进展. 生态学杂志, 1987, 6(3):30—34
- [4] 钱领元, 刘安兴, 金益民. 植物间的生化相克. 生态学杂志. 1982, 1(4):24—28
- [5] Newman E I. Interaction between plants. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Pirson A, Zimmermann M H. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983, Vol. 12, 679—710
- [6] Kogan SH I, Chinnova G A, Kravchenko M E. Effect of macrophytes on certain algae in joint cultivation. (Engl. summ.) *IZV AKAD NAUK TURRM SSR SER BIOL NAUK* 1978, 3: 3—8
- [7] Kogan SH I, Chinnova C A. Interaction of *Ceratophyllum demersum* L. and some blue-green algae. *GIOROBIOLOGIA, ZH* 1972, 8(5):21—27 *illus.*, 1972.

- [8] Ostrofsky L. M., Zetter R. E. Chemical defences in aquatic plants. *J Ecol.* 1966, 74:279—287
- [9] 宝月欣二, 冈西良治, 菅原久枝, Studies on the antagonistic relation between phytoplankton and rooted aquatic plants. *陆水学杂志*. 1960, 21:124—131
- [10] 孙文浩, 俞子文, 余叔文. 水葫芦对藻类的克制效应. *植物生理学报*, 1988, 14(3):294—300
- [11] 孙文浩, 俞子文, 余叔文. 城市富营养化水域的生物治理和风眼莲抑制藻类生长的机理. *环境科学学报*, 1989, 9(2):188—195

BIOCHEMICAL INTERFERENCE OF AQUATIC MACROPHYTE *CERATOPHYLLUM DEMERSUM* ON ALGAE

Yuan Jun-Feng* Zhang Zong-She
(Department of Biology, Shanghai Normal University)

Laboratory experiments have shown that *C. demersum* inhibited the growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Scanddesmus obliquus*. In culturing algae with *C. demersum* or the medium in which *C. demersum* have grown already, the algae growth is inhibited.

Alkaloids extracted from a medium in which *C. demersum* have been cultured were found to have an inhibitive effect on the growth of *S. obliquus* and the effect is larger than that of original medium. The boiled medium is still more inhibited than the unboiled. This may be owing to the presence of some antagonistic substances in the medium, or the extracting or boiling process have changed the nature of alkaloids.

R_f value of alkaloids on the TLC plate (methanol:chloroform:ammonium hydroxide:water) are 0.89, 0.74 and 0.69, respectively, and on the plate (benzene:methanol) are 0.42, 0.31, and 0.15, respectively. Under UV-light, the spots showed a light yellow color.

The contents of alkaloids in culture medium and plant body are related to the culture conditions.

Key words: biochemical interference, *Ceratophyllum demersum*, algae, alkaloids.

* Yuan Jun-Feng work in Department of Biology, Ocean University of Qingdao (266003)