

2-甲基乙酰乙酸乙酯对藻细胞膜和亚显微结构的影响

李锋民^{1, 2}, 胡洪营^{1*}, 种云霄³, 门玉洁¹, 郭美婷¹

(1. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084; 2. 中国海洋大学环境科学与工程学院 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266003; 3. 华南农业大学资源与环境学院, 广州 510642)

摘要:为揭示化感物质抑制藻类的机理, 研究了芦苇化感物质 2-甲基乙酰乙酸乙酯(eathyl-2-methyl acetoacetate, EMA)对蛋白核小球藻、铜绿微囊藻和普通小球藻细胞膜磷脂脂肪酸种类、含量以及藻细胞亚显微结构的影响, 采用 Bligh and dye 法提取藻类细胞膜磷脂脂肪酸, GC-MS 测定脂肪酸种类和含量, 透射电镜法观测细胞亚显微结构. 结果表明, EMA 使蛋白核小球藻细胞膜不饱和脂肪酸亚麻酸、亚油酸含量都增加了 14%, 而饱和脂肪酸肉豆蔻酸、棕榈酸含量则下降了 12% 和 11%. 加入 EMA 后, 铜绿微囊藻细胞膜中不饱和脂肪酸 C18:1 和 C18:2 含量分别增加了 12% 和 10%, 饱和脂肪酸 C18:0 和 C16:0 含量则下降. EMA 对普通小球藻细胞膜磷脂脂肪酸含量没有显著影响. EMA 使蛋白核小球藻和铜绿微囊藻细胞壁脱落, 细胞膜破裂, 细胞内含物渗出, 细胞内片层结构解体, 细胞核和线粒体结构损坏. EMA 对普通小球藻细胞亚显微结构没有显著破坏.

关键词:化感作用; 2-甲基乙酰乙酸乙酯; 藻; 细胞膜; 磷脂脂肪酸; 亚显微结构

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)07-1534-05

Effects of Allelochemical EMA Isolated from *Phragmites communis* on Algal Cell Membrane Lipid and Ultrastructure

LI Feng-min^{1, 2}, HU Hong-ying¹, CHONG Yun-xiao³, MEN Yu-jie¹, GUO Mei-ting¹

(1. State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Key Laboratory of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. College of Resource and Environment, Agricultural University of South China, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to reveal the antialgal mechanisms of allelochemicals, effects of the allelochemical eathyl-2-methyl acetoacetate (EMA) on cell membrane lipid and ultrastructure of *Chlorella pyrenoidosa*, *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* were studied in this paper. The lipid fatty acids of the algal membrane were isolated following the Bligh and Dye method and quantified by gas chromatograph/mass spectrometry. The ultrastructure of algal cells was observed with TEM. The results showed that EMA increased the contents of linolenic acid and linolic acid with increment of 14%, while decreased the content of myristic acid and cetylic acid in *C. pyrenoidosa* membrane. The content of unsaturated fatty acids C18:1 and C18:2 increased 12% and 10% in *M. aeruginosa* with the addition of EMA, while the content of saturated fatty acids C18:0 and C16:0 decreased. EMA showed no significant change in the fatty acid composition in *C. vulgaris* under the experiment condition. EMA broke off cell wall of *C. pyrenoidosa* and *M. aeruginosa*. EMA damaged the cell membrane and the inclusion of algal cell leaked out. Nuclear and mitochondrial structure was damaged with the addition of EMA. EMA showed no significant change in the ultrastructure of *C. vulgaris*.

Key words: allelopathy; eathyl-2-methyl acetoacetate; algal; cell membrane; lipid fatty acid; ultrastructure

利用水生植物产生的化感物质控制有害藻类的生长是一种较有前景的生态抑藻方法^[1]. 目前已经发现多种水生植物能产生具有抑藻能力的化感物质. 不同的研究者也分离出了多种抑藻化感物质. 例如荸荠中对蓝藻有抑制作用的物质主要是二十碳的三羟基环戊基脂肪酸和十八碳的三羟基环戊烯酮脂肪酸^[2]. Aliotta 等和 Greca 等^[3-5] 分别对香蒲 (*Typha latifolia*) 的乙醚提取物进行分析, 提取出数种具有抑制藻类的活性物质, 如 β -固甾醇、20, 24-亚甲基-4-甲基-7-烯胆烷醇、 α -亚油酸等. 穗花狐尾藻中对铜绿微囊藻有抑制作用的化感物质主要是多酚类物质, 如没食子酸 (gallic) 和焦棣酸

(pyrogalllic)^[6,7]. 水葫芦中的抑藻化感物质主要是: α -苯基萘胺、 β -苯基萘胺、乙酸乙基异氰和丙酸酰胺^[8-10]. 研究发现, 化感物质对作用对象具有选择性, 例如从水葫芦中分离到的化感物质乙酸乙基异氰和丙酸酰胺只能抑制小球藻和栅藻, 但对其它藻类抑制作用不明显^[8, 10].

研究发现, 化感物质通过多种作用机理抑制高

收稿日期: 2006-09-20; 修订日期: 2006-11-28

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划项目 (2003BA809B04-02); NSFC-JST 重大国际合作项目 (20510076)

作者简介: 李锋民 (1975 ~), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: lfm01@ouc.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

等植物的生长。例如,富里酸、对香豆酸、香草酸能导致蚕豆幼苗叶绿素含量减少,光合作用产物含量下降^[11]。Patterson^[12]也发现化感物质能使蚕豆叶片的叶绿素含量下降,同时使净光合作用和气孔导度明显下降。香豆素(coumarins)类物质如白茅苷(imperatorin)能抑制光合磷酸化作用^[13]。酚类化感物质能促进叶绿素的降解,从而降低高等植物叶片中叶绿素的含量^[14]。化感物质能降低细胞膜的完整性,使细胞内物质大量渗出,渗出液的电导率增加^[15~17]。可见,在高等植物领域,化感物质能降低植物的光合作用速率,使植物叶片的叶绿素含量降低。在藻类领域,Hagmann等^[16]和Srivastava等^[18]从侧生藻中分离出侧生藻素A对藻类和其它光合自养微生物具有强抑制作用,能抑制光合系统Ⅱ(PSⅡ)。化感物质还能引起某些藻类内含物含量的变化^[19,20]。尽管在高等植物领域,化感作用的机理研究已经取得一定成果,但化感物质抑制藻类的机理研究仍较缺乏,尤其是化感物质选择性抑藻的机理鲜见报道。

前期研究发现芦苇化感物质2-甲基乙酰乙酸乙酯(eathyl-2-methyl acetoacetate, EMA)能显著抑制蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的生长,但对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)基本没有抑制效果^[21]。本文通过研究EMA对蛋白核小球藻、铜绿微囊藻和普通小球藻细胞膜磷脂脂肪酸和藻细胞亚显微结构的影响,以期揭示EMA选择性抑藻的机理提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)、铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)和普通小球藻(*C. vulgaris*)由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库提供。试验前预培养4 d,使之处于对数增长期。小球藻培养基组分:NaNO₃ 25.5 mg, NaHCO₃ 15 mg, K₂HPO₄ 1.04 mg, MgSO₄ · 7H₂O 14.7 mg, MgCl₂ 5.7 mg, CaCl₂ · 2H₂O 4.41 mg, Na₂EDTA · 2H₂O 0.3 mg, H₃BO₄ 0.185 mg, MnCl₂ 0.264 mg, ZnCl₂ 3.27 × 10⁻³ mg, CoCl₂ · 2H₂O 0.78 × 10⁻³ mg, CuCl₂ · 2H₂O 0.009 × 10⁻³ mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 7.26 × 10⁻³ mg, FeCl₃ 0.096 mg, H₂O 1 000 mL。铜绿微囊藻采用BG11培养基培养。培养条件为:光暗比14:10,温度25℃。

实验用化感物质EMA从Sigma公司购买。

1.2 实验方法

1.2.1 对藻类细胞膜磷脂脂肪酸的影响

将3种藻类于锥形瓶中培养至对数增长后期。将藻类分成2组,一组加入2 mg·L⁻¹EMA,另一组不加EMA。继续培养24 h,测定2组藻类的细胞膜磷脂脂肪酸的种类和含量。

藻类培养液于3 000 r/min离心10 min,弃去上清液,藻细胞于40℃干燥。加1.5 mL柠檬酸盐缓冲液,1.9 mL三氯甲烷,3.75 mL甲醇,2 mL Bligh和Dye提取液。充分振荡混合。3 000 r/min离心10 min,上清液转移至另1个试管中备用。再加2 mL Bligh和Dye提取液,振荡混合,离心,上清液合并到试管中。加3.1 mL三氯甲烷和3.1 mL柠檬酸盐缓冲液到上述上清液中,1 500 r/min离心10 min,移去水层(上层)。转移底层有机物到小试管中,用氮气吹脱干燥。然后加2次1 mL甲醇,每次都蒸发至干燥。用体积为6 mL,填料为C18(500 mg)的固相萃取柱分离极性脂。用1 mL甲醇甲苯混合液(1:1,体积比)甲基化脂肪酸。用氮气吹脱蒸发有机溶剂至0.2 mL。

1.2.2 对藻类亚显微结构的影响

将3种藻类于锥形瓶中培养至对数增长后期。将藻类分成2组,一组加入2 mg·L⁻¹EMA,另一组不加EMA。继续培养24 h,离心,获得藻细胞。观察EMA对藻细胞亚显微结构的影响。

1.3 分析测定方法

1.3.1 磷脂脂肪酸

参照文献[22,23]的方法进行磷脂脂肪酸的提取分离。提取前藻细胞于40℃干燥1 h。分离使用固相萃取法(体积为6 mL,填料为500 mg C18)。用GC-MS测定磷脂脂肪酸甲酯的种类与含量。气相色谱-质谱联用仪为Perkin Elmer公司生产PETurboMass;色谱柱型号为SE-54石英毛细管柱,柱长30 m;程序升温条件:60℃ 5 min, 60~300℃ (10℃·min⁻¹);注射口温度为300℃。

1.3.2 藻细胞亚显微结构的观察

藻细胞用2%戊二醛(pH=7.2磷酸缓冲液配制)前固定,1%(pH=7.2磷酸缓冲液配置)锇酸后固定,磷酸缓冲液清洗,梯度酒精脱水,环氧丙烷置换,Epn812渗透包埋,LKB-V型超薄切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅对染,Hitach-600透射电镜(TEM)观察叶肉细胞内叶绿体的超微结构。所有的前处理及电镜观察工作在中国农业科学院原子能利用研究所电镜室完成。

2 结果与讨论

2.1 EMA 对藻类细胞膜磷脂脂肪酸的影响

通过分析藻类细胞膜中磷脂脂肪酸种类和相对含量发现, 2 种小球藻的脂肪酸主要是 C14:0、C16:0、C18:0、C18:2、C18:3, 铜绿微囊藻的则主要是 C16:0、C16:2、C18:0、C18:1、C18:2(其中“C”后数字为碳链长度, “:”后数字为不饱和键数)。

表 1 列出了加入 EMA 前后 3 种藻类细胞膜磷脂脂肪酸的组成变化。未加 EMA 的蛋白核小球藻细胞膜中不饱和脂肪酸C18:3和 C18:2 分别占总脂肪酸含量的 23.31% 和 11.46%, 而加入 2 mg•L⁻¹ 的 EMA 后则分别增加到 37.68% 和 25.91%; 未加 EMA 的蛋白核小球藻细胞膜中饱和脂肪酸 C14:0 和 C16:0 含量则由 16.57%、33.68%降低到 4.66%、22.04%。铜绿微囊藻对照组中不饱和脂肪酸 C18:1、C18:2 含量分别为 30.26%、18.85%, 加入 EMA 后, 则上升为 42.88%、28.46%; 而饱和脂肪酸C18:0含量则有明显下降。可见, EMA 使蛋白核小球藻和铜绿微囊藻细胞膜内不饱和脂肪酸含量上

升, 而饱和脂肪酸含量下降。但 EMA 对普通小球藻细胞膜中脂肪酸相对含量没有显著影响。前期研究表明, EMA 能选择性抑制铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的生长, 但对普通小球藻没有显著抑制作用^[21]。本研究的结果初步揭示了 EMA 选择性抑藻的机理在于其能改变铜绿微囊藻和蛋白核小球藻细胞膜中磷脂脂肪酸的结构, 但对普通小球藻磷脂脂肪酸的结构没有影响。

细胞膜中磷脂脂肪酸的种类与组成直接影响着细胞膜的流动性和选择透性, 铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的细胞膜中不饱和脂肪酸含量上升, 使细胞膜的流动性增大, 稳定性降低, 导致细胞内含物泄漏。这就是细胞内金属离子渗出的原因。在环境胁迫下, 植物细胞膜被破坏, 导致细胞内含物渗出的研究已有许多报道。金属离子、除草剂等有毒物质能破坏斜生栅藻、小球藻等藻类的细胞膜^[24, 25]。从玫瑰中提取的化感物质玫瑰草油破坏了酵母菌的细胞膜, 使酵母菌细胞膜中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸相对含量发生变化, 细胞膜的选择透性被破坏, 导致细胞内金属离子的渗出^[22]。

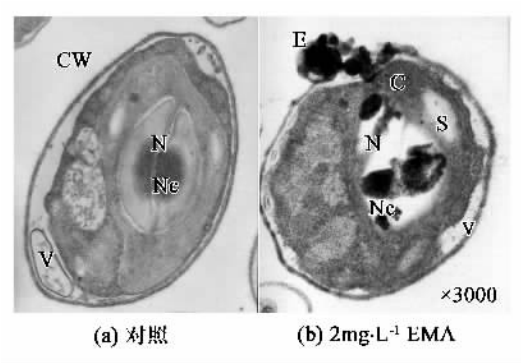
表 1 EMA 对 3 种藻类脂肪酸含量的影响
Table 1 Effects of EMA on lipid fatty acids of three algae

处理	脂肪酸	脂肪酸所占比例/%		
		蛋白核小球藻	普通小球藻	铜绿微囊藻
未加 EMA	C14:0 肉豆蔻酸	16.57±0.35	8.17±0.12	0±0
	C16:2 十六碳二烯酸	0±0	0±0	11.93±0.44
	C16:0 棕榈酸	33.68±0.09	26.95±0.21	16.8±0.22
	C18:3 亚麻酸	23.31±0.64	29.56±0.29	0±0
	C18:2 亚油酸	11.46±0.81	30.41±0.06	30.26±0.25
	C18:1 油酸	0±0	0±0	18.85±0.14
	C18:0 硬脂酸	14.98±0.32	4.9±0.18	22.15±0.31
加入 2 mg•L ⁻¹ EMA	C14:0 肉豆蔻酸	4.66±0.06	7.77±0.05	0±0
	C16:2 十六碳二烯酸	0±0	0±0	7.21±0.04
	C16:0 棕榈酸	22.04±0.13	25.04±0.37	11.4±0.27
	C18:3 亚麻酸	37.68±0.24	29.17±0.22	0±0
	C18:2 亚油酸	25.91±0.51	32.1±1.02	42.88±1.54
	C18:1 油酸	0±0	0±0	28.46±0.33
	C18:0 硬脂酸	9.71±0.05	5.91±0.65	10.05±0.03

2.2 EMA 对藻类亚显微结构的影响

EMA 破坏了铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的细胞膜, 必将引起它们细胞结构的改变。EMA 对蛋白核小球藻亚显微结构的影响如图 1 所示。加入 EMA 后, 蛋白核小球藻的细胞膜受到破坏, 细胞外出现从细胞内渗出的细胞质。藻细胞中叶绿体原本排列

规则的片层结构被破坏。叶绿体片层结构是与细胞膜相似的双分子层结构, 可能是 EMA 降低了藻细胞内抗氧化体系酶活性, 也使该片层结构受到破坏。细胞中央的蛋白核在 EMA 作用下结构被破坏, 核仁成为不规则的形状。EMA 加入后, 线粒体被破坏成多个碎块, 淀粉粒和液泡体积增大。



C: 色素体; CW: 细胞壁; N: 细胞核; Nc: 核仁;
M: 线粒体; S: 淀粉粒 V: 液泡; E: 渗出物质, 下同

图 1 EMA 对蛋白核小球藻亚显微结构的影响

Fig.1 Effect of EMA on the ultrastructure of *C. pyrenoidosa*

EMA 对铜绿微囊藻亚显微结构也有破坏作用 (图 2). 加入 EMA 后, 铜绿微囊藻出现质壁分离现象 [图 2(b), 2(c)], 并且细胞壁从细胞上脱落 [图 2(c)]. 细胞膜受到破坏, 细胞外出现从细胞内渗出的细胞质 [图 2(d)]. 正常蓝藻细胞内的色素以类囊体的形式附着在片层结构上 [图 2(a)], 加入 EMA 后, 片层结构被破坏, 类囊体杂乱的分布在细胞质内 [图 2(c), 2(d)]. 细胞中央的透明区域为铜绿微囊藻的核区, 在 EMA 作用下核区被破坏, 并被挤到细胞的一侧 [图 2(c), 2(d)]. EMA 加入后, 多个小淀粉粒合并成为少数大的淀粉粒, 其内含物总量上升.

EMA 对普通小球藻亚显微结构没有显著影响

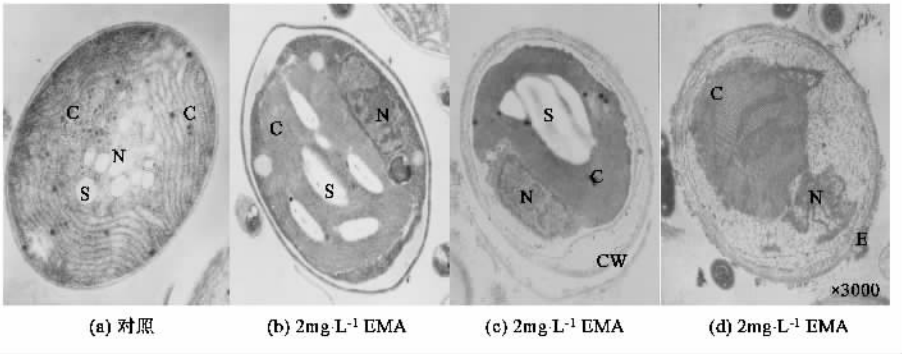


图 2 EMA 对铜绿微囊藻亚显微结构的影响

Fig.2 Effect of EMA on the ultrastructure of *M. aeruginosa*

(图 3). 加入 EMA 后, 普通小球藻出现轻微的质壁分离现象, 部分细胞的淀粉粒体积增大, 但细胞结构保持完整. 说明 EMA 对普通小球藻的破坏作用不明显. 这一结果与前面的研究结果是一致的.

的鼠李糖酯使藻细胞内液泡体积增大, 细胞核破裂, 细胞膜结构破坏, 最终导致藻细胞裂解^[26]. 0.5 mmol·L⁻¹的锰离子使藻类细胞的片层结构破坏, 叶绿体、线粒体解体, 细胞内液泡增大^[27]. 化感物质导致杂草细胞结构破坏也被证实^[28]. 本研究以及前期研究^[22]发现, EMA 抑制铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的作用点是降低了抗氧化体系酶活性, 使细胞内过量的活性氧得不到及时清除, 过量的活性氧使细胞内发生脂质过氧化作用, 使细胞的膜系统被破坏 (包括细胞膜和细胞内膜), 多种细胞器形态发生变化或解体, 最终导致细胞死亡或破裂. 这可能是 EMA 抑制藻类生长的机理.

3 结论

通过比较研究芦苇化感物质 EMA 对蛋白核小球藻、铜绿微囊藻和普通小球藻细胞膜磷脂脂肪酸种类和含量的影响, 并观察 EMA 对藻细胞亚显微结构的影响发现, 在实验条件下, EMA 使铜绿微囊藻和蛋白核小球藻细胞膜中不饱和脂肪酸亚麻酸和

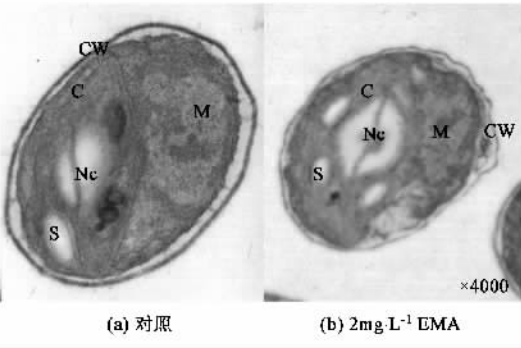


图 3 EMA 对普通小球藻亚显微结构的影响

Fig.3 Effect of EMA on the ultrastructure of *C. vulgaris*

EMA 对于铜绿微囊藻和蛋白核小球藻是毒性物质, 对藻类的抑制机理与其它毒性物质相似, 如多环芳烃、重金属、稀有金属等. 铜绿假单胞菌分泌

亚油酸含量增加,而使饱和脂肪含量下降. EMA 对普通小球藻细胞膜磷脂脂肪酸含量没有显著影响. 通过透射电镜观察,发现 EMA 使蛋白核小球藻和铜绿微囊藻细胞壁脱落,细胞膜破裂,细胞内含物渗出,细胞内片层结构解体,细胞核和线粒体结构损坏. EMA 对普通小球藻细胞亚显微结构没有显著破坏,这可能是 EMA 选择性抑制铜绿微囊藻和蛋白核小球藻的机理之一.

参考文献:

- [1] Rice E L. Allelopathy[M]. (2nd edition). London: Academic Press, 1984.
- [2] Van Aller R T, Clark L R, Pessoney G F. A prostaglandin like fatty acid from a species in *Cyperaceae*[J]. *Lipids*, 1983, **18**(9): 617 ~ 621.
- [3] Aliotta G, Greca N D, Monaco P, *et al.* *In vitro* algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, **16**: 2637 ~ 2646.
- [4] Greca M D, Mangoni L, Molinaro A, *et al.* (20s)-4-methyl-24-methylenecholest-7-en-3-ol, an allelopathic sterol from *Typha latifolia*[J]. *phytochemistry*, 1990, **29**(6): 1797 ~ 1798.
- [5] Greca M D, Monaco P, Previtera L, *et al.* Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus* [J]. *Phytochemistry*, 1989, **28**: 2319 ~ 2322.
- [6] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, *et al.* *Myrophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenoles inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*[J]. *Water Research*, 2000, **34**(11): 3026 ~ 3032.
- [7] Nakai S, Inoue Y, Hosomi M. Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols[J]. *Water Research*, 2001, **35**(7): 1855 ~ 1859.
- [8] Gallardo-Williams M T, Martin D F. Phytotoxic compounds from *Typha domingensis* P[A]. In: Inderjit, Mallik A U. *Chemical ecology of plants: Allelopathy in aquatic and terrestrial ecosystems* [C]. Berlin: Birkhauser Verlag, 2002. 57 ~ 72.
- [9] 杨善元, 俞子文, 孙文浩, 等. 凤眼莲根系中抑藻物质分离与鉴定[J]. *植物生理学报*, 1992, **18**(4): 399 ~ 402.
- [10] Jin Z H, Zhuang Y Y, Dai S G, *et al.* Isolation and identification of extracts of *Eichhornia crassipes* and their allelopathic effects on algae[J]. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2003, **71**(5): 1048 ~ 1052.
- [11] Einhellig F A, Rasmussen J A. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum seedlings[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1979, **5**: 815 ~ 824.
- [12] Patterson D T. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*) [J]. *Weed Science*, 1981, **29**: 53 ~ 59.
- [13] Mata R, Macias M L, Sojas I S, *et al.* Phytotoxic compounds from *Esenbeckia yaxhoob*[J]. *Phytochemistry*, 1998, **49**(2): 441 ~ 449.
- [14] Yang C M, Chang I F, Lin S J, *et al.* Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2004, **45**(2): 119 ~ 125.
- [15] Galindo J C G, Hernández A, Dayan F E, *et al.* Dehydrozalanin C, a natural sesquiterpenolide, causes rapid plasma membrane leakage [J]. *Phytochemistry*, 1999, **52**: 805 ~ 813.
- [16] Hagemann L, Jüttner F, Fischerellin A, a novel photosystem-II-inhibiting allelochemical of the Cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity [J]. *Tetrahedron letters*, 1996, **37**(36): 6539 ~ 6542.
- [17] Burgos N R, Talbert R E, Kim K S, *et al.* Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*) [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2004, **30**(3): 671 ~ 689.
- [18] Srivastava A, Jüttner F, Strasser R J. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1364**: 326 ~ 336.
- [19] Fistarol G O, Legrand C, Rengefors K, *et al.* Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? [J]. *Environmental Microbiology*, 2004, **6**(8): 791 ~ 798.
- [20] Fistarol G O, Legrand C, Selander E, *et al.* Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, **35**(1): 45 ~ 56.
- [21] Li F M, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel anti-algal allelochemical from *Phragmites communis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**: 6545 ~ 6553.
- [22] Prashar A, Hili P, Veness R G, *et al.* Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Phytochemistry*, 2003, **63**: 569 ~ 575.
- [23] Rose A H, Veazey F J. Membranes and lipid of yeast[A]. In: Campbell I. *Yeast: A Practical Approach*[C]. IRL Press, Oxford, England. 1988. 255 ~ 275.
- [24] Backor M, Fahselt D, Davidson R D, *et al.* Effects of copper on wild and tolerant strains of the lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta) and possible tolerance mechanisms[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, **45**(2): 159 ~ 167.
- [25] Franklin N M, Stauber J L, Lim R P, *et al.* Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, **21**(11): 2412 ~ 2422.
- [26] Wang X L, Gong L Y, Liang S K, *et al.* Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 433 ~ 443.
- [27] Paul A, Hauck M, Langenfeld-Heyser R. Ultrastructural changes in soredia of the epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* cultivated with manganese [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, **52**: 139 ~ 147.
- [28] Bertin C, Paul R N, Duke S O, *et al.* Laboratory assessment of the allelopathic effects of fine leaf fescues[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2003, **29**(8): 1919 ~ 1937.