



论文

盐生植物盐角草对中肋骨条藻的生长抑制

姜丹^{①②}, 黄凌风^③, 林永青^③, 聂玲玲^①, 吕素莲^①, 匡廷云^①, 李银心^{①*}

① 中国科学院植物研究所中国科学院植物分子生理重点实验室, 北京 100093;

② 中国科学院研究生院, 北京 100049;

③ 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005

* 联系人, E-mail: yxli@ibcas.ac.cn

收稿日期: 2012-02-21; 接受日期: 2012-04-19

中科院知识创新重要方向项目(批准号: KSCX2-EW-J-1)和国家高新技术研究发展计划(批准号: 2007AA091704)资助

摘要 利用盐生植物抑制藻类生长是防治海洋赤潮发生的一种新兴技术. 本文以中国近海典型赤潮原因种中肋骨条藻为对象, 研究了滩涂盐生植物盐角草对藻生长的影响及其机制, 并利用高效液相色谱技术分析潜在的抑藻物质. 共培养实验结果显示, 在营养盐充足的条件下, 盐角草能够显著抑制中肋骨条藻的生长, 降低藻生长水体叶绿素 *a* (Chl *a*) 浓度. 除盐角草根系水提物之外, 其余 3 种有机相提取物均能抑制藻的生长, 改变藻细胞大小, 并且影响单个细胞的 Chl *a* 含量. 各种有机相提取物的抑制作用具有浓度效应, 随浓度升高抑制作用增强; 以甲醇相提取物效果最明显, 其次是正丁醇和氯仿相提取物. 经高效液相色谱分析, 在甲醇相提取物中鉴定出 2 种黄酮化合物——芦丁和槲皮素-3-β-D-葡萄糖甙. 其中芦丁对中肋骨条藻的生长具有一定的抑制作用, 其抑制效果随芦丁浓度的升高而增强, 随藻细胞初始接种密度的升高而减弱. 结果表明, 盐角草能够抑制中肋骨条藻的生长, 芦丁作为盐角草的代谢产物之一有望成为新的抑藻剂.

关键词
浓度效应
根系提取物
芦丁
盐角草
中肋骨条藻

赤潮已成为世界 3 大近海污染问题之一, 破坏了海洋生态系统, 对海洋渔业、海水养殖业、滨海旅游业和休闲业构成严重威胁, 直接或间接地危害了海洋环境、海洋生物和人类健康^[1]. 因此, 采用切实有效的赤潮防治措施是赤潮研究的重要内容之一. 近年来研究表明, 细菌^[2]、酵母^[3]以及部分植物^[4-6]能够通过向环境释放化学物质影响浮游植物的生长. 在淡水领域中, 利用生物间的拮抗作用控制赤潮发生已取得较大进展, 但在海洋及沿海领域, 这项技术的研究才刚刚兴起. 厦门筭筭湖(24°47'14"N, 118°08'23"E), 位于厦门岛西部, 水域面积 1.49 km², 水力较差, 全湖区氮、磷、COD、BOD 等水质指

标常年超Ⅳ类海水标准, 水体严重富营养化导致赤潮频繁暴发. 湖区主要的赤潮原因种为中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)^[7], 属于耐污种类, 该生物在一定程度上可以指示海域环境的富营养化状态^[8].

盐角草(*Salicornia europaea*)是地球上迄今为止报道过的最耐盐高等植物之一, 它作为重要的耐盐基因供体及研究耐盐机制的目标植物, 正为世人瞩目. 目前已有研究表明, 盐角草在盐碱地改良和重金属修复方面具有重要的作用^[9,10], 但关于盐角草在海洋生态修复方面的研究尚未见报道. 之前的调查发现, 在严重富营养化的筭筭湖中铺设盐角草浮床, 流经浮床的水体其营养盐和浮游植物含量显著低于未

经浮床的水体, 浮床铺设 1 年后, 中肋骨条藻的细胞密度较上 1 年可降低 57%. 针对这种现象, 本文以近海典型赤潮原因种中肋骨条藻为对象, 探讨盐角草对藻生长的影响及其作用机制, 以期利用盐角草治理近海中肋骨条藻赤潮提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

盐角草幼苗和植株: 挑选饱满的盐角草种子(江苏晶隆海洋产业发展有限公司)播种于蛭石发芽床中, 待长出第一片真叶时改用厦门西海域海水培养(盐度 28~33 psu).

实验所用中肋骨条藻, 其无菌株由厦门大学海洋生态实验室提供(编号为 YDL1108). 藻种无菌培养于 f/2 培养液^[11]中, 培养温度为 20℃, 光强为 72 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$, 光周期为 12 h:12 h. 培养液的 pH 和盐度分别调至 8.0±0.2 和 30 psu. 每天定时晃动培养瓶 2 次, 以防止藻附壁生长.

实验海水: 厦门西海域海水经醋酸纤维滤膜(0.22 μm)过滤以除去微藻和颗粒物, 用 f/2 培养液加富, 海水 pH 和盐度分别调至 8.0±0.2 和 30 psu, 高压灭菌后冷却备用.

1.2 根系提取物的制备

实验开始前先将盐角草新鲜根系冷冻干燥并研磨成粉, 经 200 目筛绢过滤备用. 实验分别用蒸馏水和 3 种具有不同极性的有机溶剂(极性从高到低: 甲醇(methanol)>正丁醇(butanol)>氯仿(chloroform))抽提根粉末. 取 20 g 根粉末与 100 mL 氯仿混合, 用超声波萃取 1 h, 并放置在 20℃ 的黑暗环境中抽提 24 h, 收集抽提液, 用同样方法再抽提 2 次直至抽提液为无色, 合并 3 次抽提所得的抽提液, 经 Whatman GF/F 膜(0.7 μm)过滤后在旋转蒸发器上减压蒸干, 得到氯仿相提取物; 残余粉末依次经正丁醇、甲醇和水, 用同样方法进行抽提、过滤并蒸干得到各自提取物. -20℃ 保存备用.

1.3 盐角草植株对中肋骨条藻赤潮的抑制实验

取 6 个透明玻璃水缸(规格为 L×W×H=30 cm×20 cm×30 cm), 每缸中加入 16 L 经 15 μm 筛绢过滤的厦门西海域海水, 按照 f/2 的配制方法添加各种营养盐.

取处于指数生长期的中肋骨条藻立即接种于培养液中, 使藻的初始接种密度为 0.5×10^3 细胞/mL. 调节 pH 和盐度分别至 8.0±0.2 和 30 psu. 实验设置 2 个处理组, CK(对照组): 不种植盐角草; 植物处理组(Plant): 种植盐角草植株, 种植密度为 10 g FW/L; 每个处理设 3 个平行样. 实验过程中 24 h 通气和水循环, 平均光照为 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 光周期为 12 h:12 h, 平均气温 20/30℃. 每天定时取样, 测定. 在实验进行 72 h 时, 分别向实验组和对照组中添加营养盐, 营养盐的含量按照 f/4 培养液添加. 每天定时取样测定水中亚硝酸氮($\text{NO}_2^- \text{-N}$)、硝氮($\text{NO}_3^- \text{-N}$)、氨氮($\text{NH}_4^+ \text{-N}$)、可溶性无机磷酸盐(DIP)的浓度以及藻生长水体叶绿素 *a*(Chl *a*)浓度和藻密度^[12]. 藻比生长率(μ)和抑制率(IR)的计算方法如下:

在实验期间根据细胞密度计算中肋骨条藻的比生长率^[13]:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t,$$

其中, N_t 和 N_0 分别为第 t 和 0 d 时中肋骨条藻的细胞密度;

同时, 根据实验期间各个处理组中中肋骨条藻的比生长率, 计算海马齿植株对藻生长的抑制率^[14]:

$$\text{IR}(\%) = (1 - \mu_p / \mu_c) \times 100,$$

其中, μ_p 和 μ_c 分别为植物处理组和对照组中藻的比生长率.

1.4 盐角草根系提取物影响中肋骨条藻生长的实验

实验采用 100 mL 的三角烧瓶, 内含 40 mL 新鲜 f/2 培养液. 取处于指数生长期的中肋骨条藻立即接种于培养液中, 使藻的初始接种密度约为 2×10^3 细胞/mL. 取各组分根系提取物少量分别用氯仿、甲醇、正丁醇和水为助溶剂溶解, 进行毒性鉴定. 提取物浓度以 g/L 表示(即每升溶剂中含有多少克干重提取物). 实验时分别以添加了相同体积的 f/2 培养液和助溶剂与 f/2 培养液的混合液作为正负对照. 各助溶剂在藻培养液中的终浓度为 0.01%(体积比). 每组实验设 6 个平行样. 藻培养温度为 20℃, 光强为 72 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 光周期为 12 h:12 h. 每天定时晃动培养瓶 2 次, 以防止微藻附壁生长. 实验过程中, 每天定时取样测定藻密度、水体 Chl *a* 浓度和单个细胞 Chl *a* 含量. 同时, 在荧光显微镜(Leica DM4500 B)下观察细胞形态大小, 并用图像测量软件 Image-Pro Express 6.0 计算

各种处理下中肋骨条藻的长、短径, 并根据以下公式计算藻的细胞体积(Biovolume)^[15]:

$$V=(\pi \times (3 \times L - W) \times (W/2)^2)/3,$$

其中, V 为细胞体积(μm^3), L 为细胞长径(μm), W 为细胞短径(μm).

在实验结束后, 计算提取物对藻生长的抑制率, 并分别用以下回归模型: 直线型(Linear)、指数型(Exponential)、S 型(Boltzmann 和 Logistic)以及多项式模型(Polynomial)进行标准化, 根据拟合度最高的模型计算不同提取物对藻生长的半抑制浓度(IC_{50}).

1.5 盐角草甲醇提取物黄酮类成分的测定

精密称取芦丁(Co. R5143, Sigma)、槲皮素-3- β -D-葡萄糖苷(Co. 17793, Sigma)和槲皮素(Co. Q4951, Sigma)标准品适量, 加甲醇制成不同浓度的混合标准液. 实验用高效液相色谱(HPLC)分析仪进行分析. 所用 HPLC 仪器型号为 Waters 2695, 配有 Waters 2996 检测器, 色谱柱为 Waters C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm), 以甲醇(A)-0.2%磷酸(B)为流动相^[16], 以梯度洗脱方式对 3 种黄酮化合物进行洗脱, 洗脱程度为 0~10 min, 2% A, 10~15 min, 2% A 到 45% A, 15~26 min, 维持 45% A, 26~27 min, 45% A 到 2% A, 27~37 min, 维持 2% A, 然后停泵. 流速 1 mL/min, 检测波长 256 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μL .

1.6 芦丁对赤潮藻生长抑制实验

取适量芦丁用甲醇溶解, 实验浓度为 2×10^{-8} ~ 2×10^{-5} mol/L. 分别添加相同体积的甲醇与甲醇和 f/2 培养液的混合液作为正负对照, 甲醇终浓度为 0.01%(v/v). 取处于指数生长期的中肋骨条藻, 立即接种于装有 40 mL 各种培养液的三角烧瓶中, 使初始接种密度为 1×10^3 细胞/mL. 培养温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 光强为 72 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 光周期为 12 h:12 h. 每天定时晃动培养瓶 2 次, 以防止微藻附壁生长. 每组实验设 6 个平行样, 实验开始后, 每天定时取样, 观察藻细

胞密度变化, 并计算芦丁对藻的 IC_{50} 值.

根据上述实验确定芦丁对中肋骨条藻生长的 IC_{50} 值, 在此浓度下开展芦丁对不同初始接种密度的中肋骨条藻生长的抑制实验. 藻初始接种密度设置 5 组: 0.01, 0.1, 1, 10 和 100×10^3 细胞/mL. 其他实验条件同上, 每组实验设 6 个平行样. 实验开始后, 每天定时取样观察藻细胞密度变化.

1.7 数据处理与统计分析

利用 OriginPro 7.5 对实验数据作图; 采用 SPSS 16.0 中的方差分析(ANOVA)检验各处理组的差异显著性, 并采用 Tukey's 检验进行($P < 0.05$)各处理组间的多重比较.

2 结果

2.1 共培养盐角草对中肋骨条藻赤潮的抑制作用

如图 1A 和 B 中肋骨条藻的时间生长曲线所示, 共培养系统中水体 Chl a 浓度和藻细胞密度远远低于对照组, 说明藻的生长完全被盐角草抑制. 同时, 盐角草对藻生长的抑制作用具有时间效应, 5 天之前抑制作用随着时间的延长而增强. 在实验处理 5 天后, 对水体 Chl a 浓度和藻密度的抑制率分别达到 98.74% 和 99.68%. 在整个实验过程中, 水体 DIN 和 DIP 的浓度始终处于较高的浓度(图 1C 和 D). 在对照组中, 随着藻的生长逐渐衰退(5 天之后), DIP 重新释放到水体中, 导致 DIP 的浓度升高.

2.2 盐角草根系提取物对中肋骨条藻生长的作用

实验结果显示, 3 种助溶剂在浓度为 0.01%(体积比)时对藻的生长没有明显影响. 从图 2A 可以看出, 在实验浓度下, 盐角草水提取物对藻的生长具有一定促进作用; 相反, 3 种有机相提取物则显著抑制藻的生长. 各种有机相提取物的抑制作用具有浓度效应, 其中, 甲醇相提取物对藻的抑制作用最大, 其 IC_{50} 为 4.05 mg/L(表 1), 其次是正丁醇和氯仿相提取物. 与

表 1 盐角草根系提取物和芦丁对中肋骨条藻的 IC_{50} 值

	根系提取物(mg/L)				芦丁(mol/L)
	水相	甲醇相	正丁醇相	氯仿相	
IC_{50}	$>4 \times 10^3 (\pm 0.35)$	4.05(± 0.11)	5.26(± 0.29)	11.3(± 1.18)	$6.69 \times 10^{-7} (\pm 0.52)$

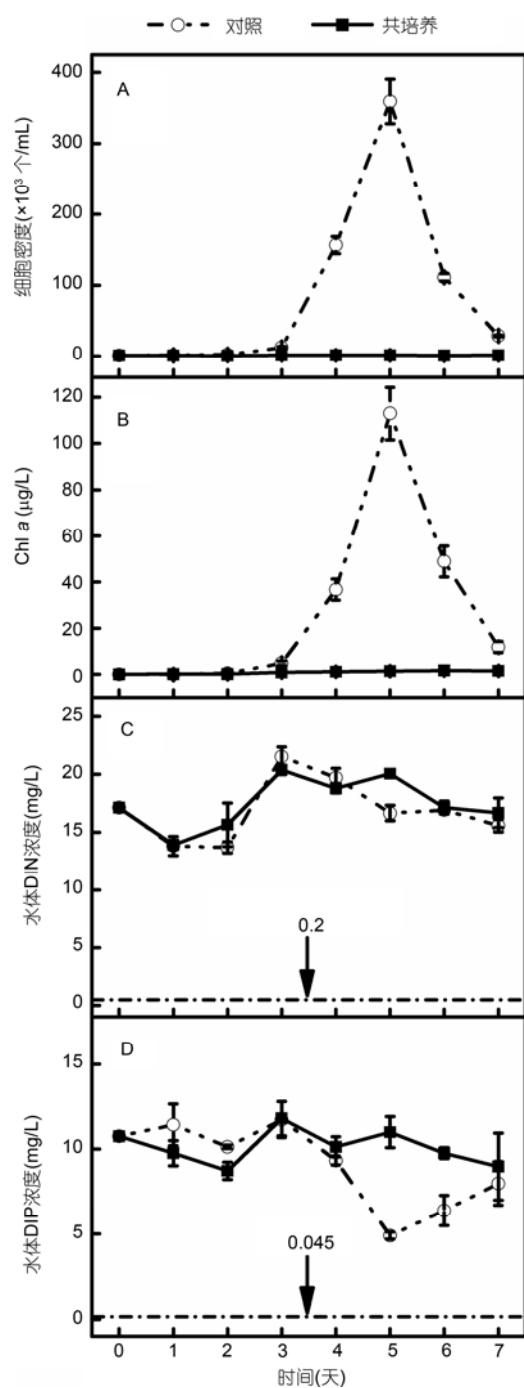


图1 盐角草植株对中肋骨条藻生长的抑制作用

细胞密度(A)、Chl *a* 浓度(B)、水体 DIN 浓度(C)和 DIP 浓度(D). 中肋骨条藻单独培养设为对照组, 点画线表示海水富营养化的阈值.

图中数据为 $\bar{x} \pm SD (n=6)$

对照组相比, 藻细胞大小和单个藻细胞的 Chl *a* 含量也受到影响, 并且随着提取物浓度的变化而改变.

2.3 芦丁对中肋骨条藻生长的抑制作用

经 HPLC 分析, 在甲醇相提取物中检测出 2 种黄酮物质——芦丁和槲皮素-3-β-D-葡萄糖甙. 芦丁和槲皮素-3-β-D-葡萄糖甙的标准曲线如图 3C 和 D 所示, 根据标准曲线计算得出, 每克干重盐角草根中芦丁和槲皮素-3-β-D-糖甙的含量分别为 60.14 和 29.48 μg.

如图 4 所示, 在不同浓度的芦丁处理下, 藻的生长受到一定的抑制, 且抑制作用随着芦丁浓度的升高而增强, 当芦丁浓度为 6.69×10^{-7} mol/L (表 1) 时, 对藻生长的抑制率达到 50%. 此外, 在不同初始接种密度下, 藻细胞对芦丁的响应不同. 从图中可以看出, 随着初始接种密度的减少, 芦丁的抑制作用增强, 特别是当初始接种密度 $\leq 1 \times 10^3$ 细胞/mL, 芦丁能显著抑制藻的生长.

3 讨论

为了证明盐生植物对海洋赤潮藻中肋骨条藻生长的抑制作用, 本研究首先开展了盐角草与藻的共培养实验. 在这个实验中, 一方面排除了温度、盐度和 pH 等非生物因素的干扰, 另一方面保证了共培养系统中具有充足的营养盐, 排除了营养盐对藻生长的限制作用. 虽然对照组和实验组中营养盐浓度均有轻微的波动, 但其浓度始终远远高于限制藻类生长的临界值. 结果发现, 不管从藻细胞密度还是 Chl *a* 浓度来看, 藻的生长都显著受到盐角草的抑制, 说明藻的生长抑制主要是由于盐角草的作用, 而不是两者的营养盐竞争作用. 近年来研究发现大型海藻海带的粗提取物也能够抑制中肋骨条藻生长^[17], 相反, Pmkash 等人^[18]证明掌状昆布的凋落物成分对藻的生长起促进作用. 值得一提的是, 当海带与中肋骨条藻共培养时, 藻的生长速率反而升高^[19]. 虽然另有一些研究表明石莼的过滤培养液对藻的生长有抑制作用, 但这种效果只发生在实验前 2 天, 第 3 天开始藻恢复生长, 其生长速率较之前略有提高^[20]. 这些研究表明石莼分泌的抑藻物质性质不稳定, 容易降解. 不同于大型海藻, 在实验中, 一次性添加盐角草的过滤培养液, 能够持续抑制中肋骨条藻的生长, 这说明盐角草通过根系可能向外分泌了具有生物活性的抑藻物质, 而且这些抑藻物质活性较稳定. 此外, 在厦门市筭筭湖的野外实验中也发现, 在湖上铺设盐角

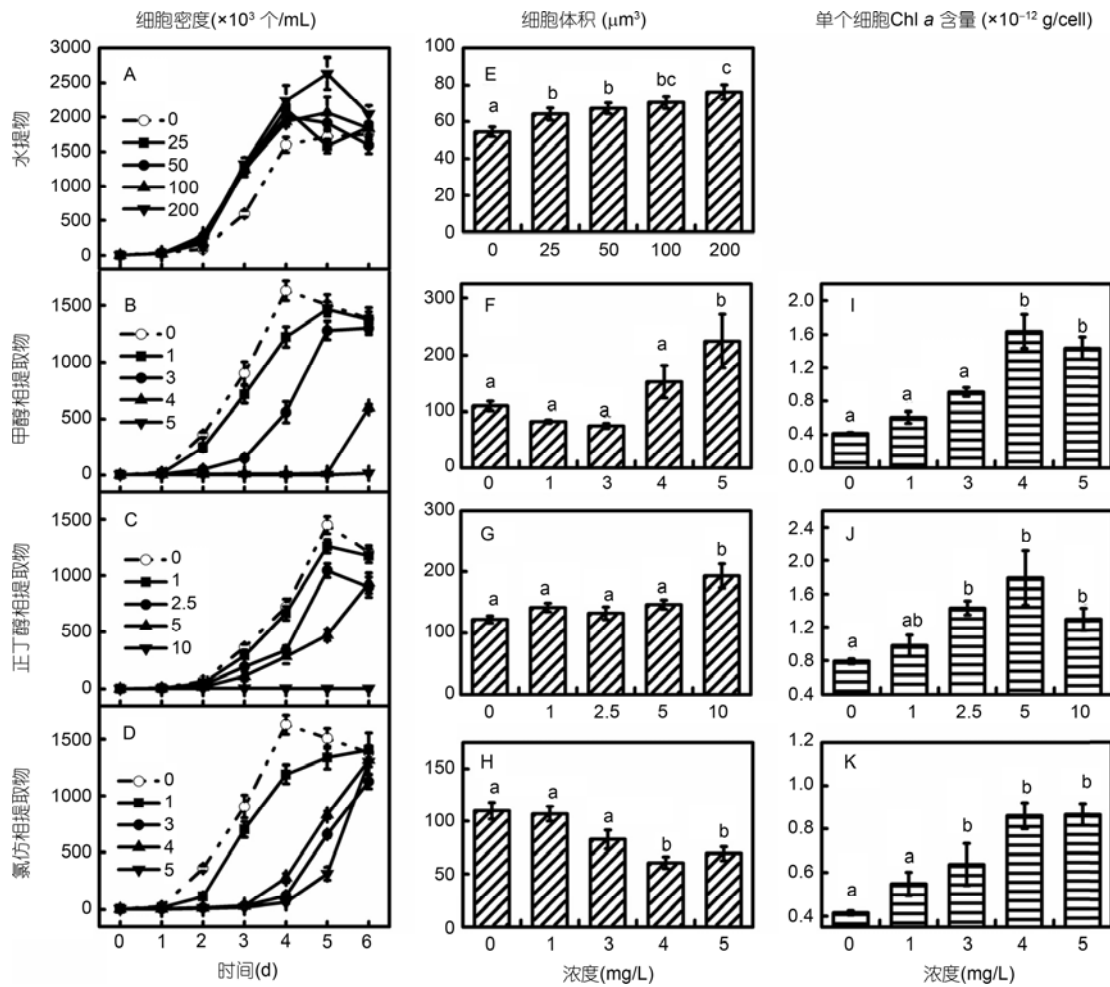


图 2 盐角草根系提取物对中肋骨条藻生长的影响

水提取物(A, E)、甲醇相提取物(B, F, I)、正丁醇相提取物(C, G, J)和氯仿相提取物(D, H, J)。中肋骨条藻单独培养作为对照组。图中数据为 $\bar{x} \pm \text{SD}$ (细胞密度和 Chl *a*: $n=6$; 细胞大小: $n=50$)。经 Tukey's ($P < 0.05$) 检验, 相同的字母表示处理间无显著差异, 不同字母表示差异显著。

草浮床 1 年后, 水体中肋骨条藻细胞密度显著下降。这些结果都表明, 盐角草能够显著抑制中肋骨条藻的生长, 然而, 这种抑制作用的生态学意义还有待于今后研究的进一步阐明。

提取物的实验结果表明, 弱极性的盐角草提取物对中肋骨条藻的抑制作用较强。这与 Erhard 和 Gross^[21]的结果相一致。Wang 等人^[22]报道了大型海藻缘管浒苔、小珊瑚藻和鼠尾藻的甲醇相提取物能够显著抑制东海原甲藻的生长。Lu 等人^[23]也发现龙须菜的乙酸乙酯相提取物对中肋骨条藻具有一定的抑制作用。与有机相提取物不同, 盐角草的根系水提取物对藻生长具有略微的促进作用, 造成这种结果的原因可能有两种, 其一, 水提取物的作用存在低促高抑的效

应^[24], 在本次实验中水提取物浓度可能偏低; 其二, 水提取物中的化合物与培养液中的某些微量元素形成螯合物后促进藻的生长^[25], 其研究机制将在下一步研究中继续深入。

同时, 本研究发现在盐角草根系提取物作用下, 中肋骨条藻细胞体积增大、容易聚团甚至出现裂解。这之前 Mulderij 等人^[26]的结果相符合, 他们的研究还显示大型海藻水剑叶的分泌物能够显著增大斜生栅藻的细胞个体, 并加速细胞的沉降^[27]。同时发现, 藻细胞内 Chl *a* 浓度发生了变化, 提取物可影响藻的光合作用。Hilt^[28]也曾报道被甲栅藻与穗状狐尾藻共培养时, 前者的 Chl *a* 浓度和 PS II 光化学活性明显高于单培养系统。这种通过对光合作用中能

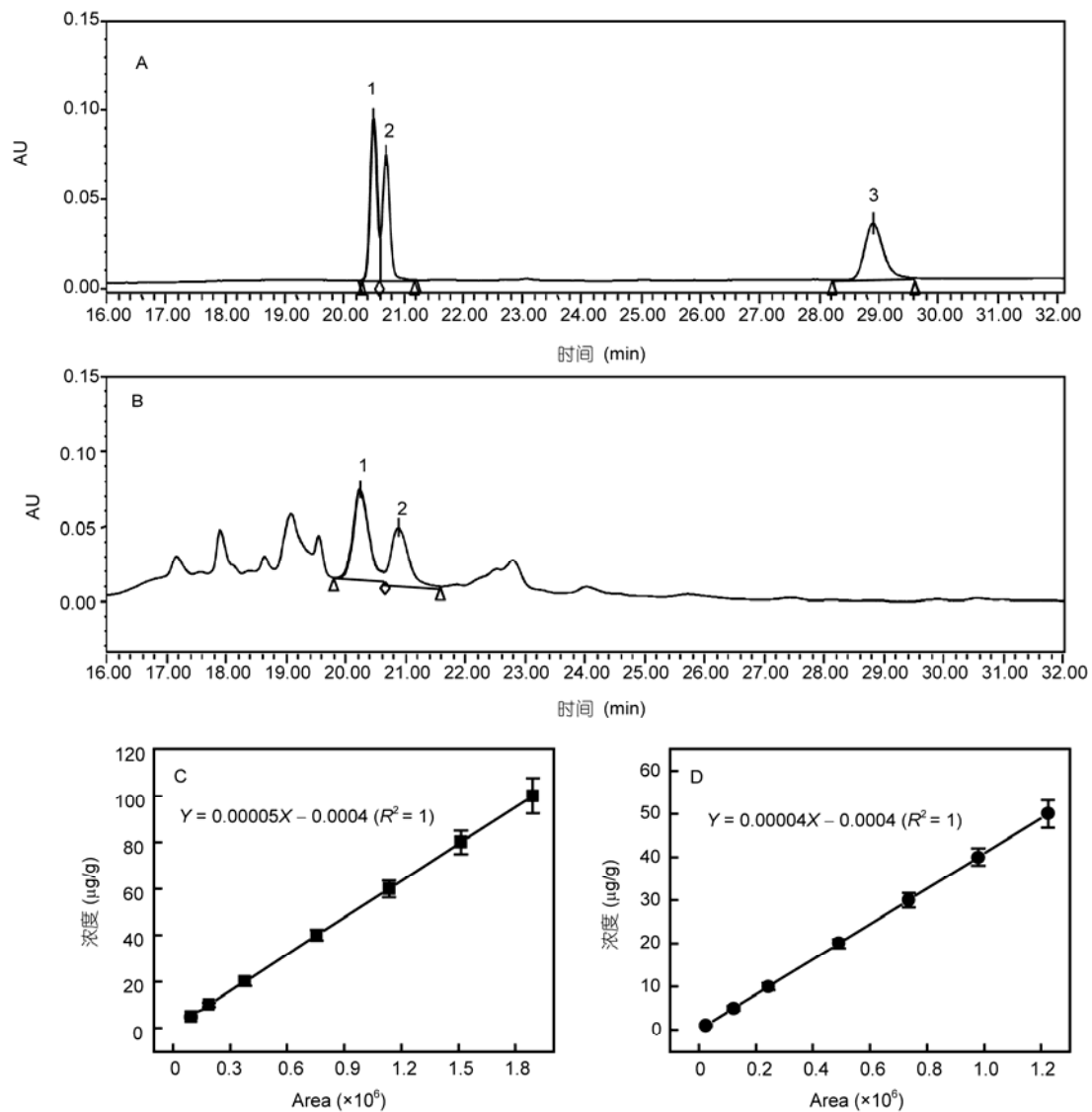


图3 盐角草根系甲醇相提取物的高效液相色谱图

A: 标准品, 1: 芦丁, 2: 槲皮素-3- β -D-糖甙, 3: 槲皮素; B: 甲醇相提取物; C: 芦丁标准曲线; D: 槲皮素-3- β -D-糖甙标准曲线. 图中数据为 $\bar{x} \pm SD$ ($n=3$)

量的投入和提高 Chl *a* 浓度已经被证实是藻耐受逆境的一项策略^[29].

芦丁是一种从植物中提取的黄酮化合物, 在抗氧化和抑菌活性等方面有重要的作用^[30,31]. 近年来研究发现芦丁能够抑制部分作物^[32]、细菌^[33]和人体胶质瘤细胞^[34]的生长. 本研究不仅发现了盐角草根系提取物中具有一定含量的芦丁, 也首次证实了芦丁对中肋骨条藻生长的抑制作用, 而且其抑制作用存在浓度效应. 与目前已报道的抑藻物质 N-苯基-2-萘胺^[35]、2-甲基乙酰乙酸乙酯^[36]和芦竹碱^[37]等具有

相似的作用. 然而, 芦丁是否能够通过盐角草根系分泌到外界环境以及释放的浓度问题还需在今后的工作中进一步验证.

4 结论

本研究表明滩涂耐盐植物盐角草及其根系有机相提取物能够抑制中肋骨条藻的生长, 其甲醇相提取物中存在抑藻物质芦丁, 有望作为新的抑藻剂防治近海中肋骨条藻赤潮的发生.

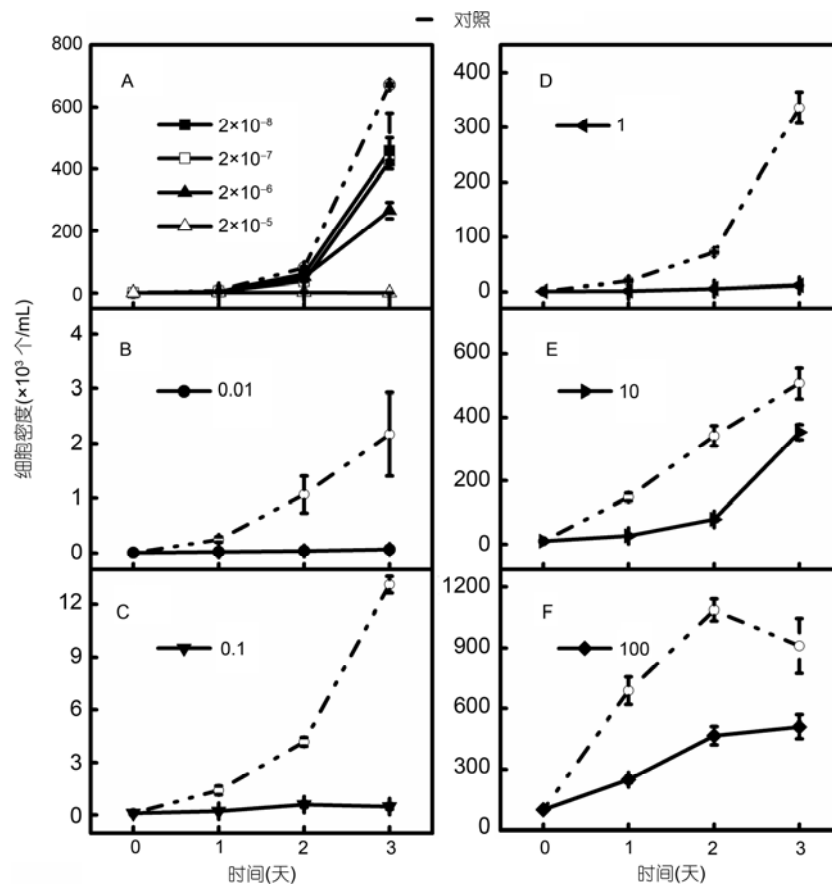


图 4 芦丁对中肋骨条藻生长的抑制作用

A: 不同浓度的芦丁对藻生长的影响; B-F: 不同初始接种密度的藻对芦丁的响应. 图中数据为 $\bar{x} \pm SD$ ($n=6$)

参考文献

- 1 GEOHAB. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Science Plan. Baltimore and Paris: SCOR and IOC, 2001. 87
- 2 El-Sheekh M M, Khairy H M, El-Shenody R A. Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutzinger on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. *Allelopathy J*, 2010, 26: 275–289
- 3 Kaya K, Sano T. Algicidal compounds in yeast extract as a component of microbial culture media. *Phycologia*, 1996, 35: 117–119
- 4 Legrand C, Rengefors K, Fistarol G O, et al. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 2003, 42: 406–419
- 5 Zhang T, Wang L, He Z, et al. Growth inhibition and biochemical changes of cyanobacteria induced by emergent macrophyte *Thalia dealbata* roots. *Biochem Syst Ecol*, 2011, 39: 88–94
- 6 Hong Y, Hu H. Effects of the aquatic extracts of *Arundo donax* L. on the growth of freshwater algae. *Allelopathy J*, 2007, 20: 315–325
- 7 Lin H, Zhang Y, Chen J. Eutrophication assessment of seawater for Xiamen sea area. *Taiwan Haixia*, 2002, 21: 154–161
- 8 Xu C Y. Distribution of phytoplankton in Yundang Lagoon and ecological assessment (in Chinese). *J Fujian Fisher*, 2005: 16–21
- 9 Ozawa T, Miura M, Fukuda M, et al. Cadmium tolerance and accumulation in a halophyte *Salicornia europaea* as a new candidate for phytoremediation of saline soils. Osaka: Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University 1881–6789. 2010. 1–8
- 10 Tikhomirova N, Ushakova S, Tikhomirov A, et al. Possibility of *Salicornia europaea* use for the human liquid wastes inclusion into BLSS intrasystem mass exchange. *Acta Astronaut*, 2008, 63: 1106–1110
- 11 Guillard R R, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J*

- Microbiol, 1962, 8: 229–239
- 12 Jiang D, Huang L, Lin S, et al. Allelopathic effects of euhalophyte *Salicornia bigelovii* on marine alga *Skeletonema costatum*. *Allelopathy J*, 2010, 25: 163–172
 - 13 Eppley R W. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish Bull*, 1972, 70: 1063–1085
 - 14 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. *Aquat Toxicol*, 2001, 56: 13–32
 - 15 Sun J, Liu D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res*, 2003, 25: 1331–1346
 - 16 Escarpa A, González M C. Fast separation of (poly) phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr*, 1999, 830: 301–309
 - 17 An Z, Wang Z, Li F, et al. Allelopathic inhibition on red tide microalgae *Skeletonema costatum* by five macroalgal extracts. *Front Environ Sci Engin China*, 2008, 2: 297–305
 - 18 Pmkash A, Rashid M A, Jensen A, et al. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: diatoms. *Limnol Oceanogr*, 1973, 18: 516–524
 - 19 Sasaki K, Uno S. Comparison of the growth rate of six diatom species cultured with a red alga *Porphyra tenera*. *Bull Plankton Soc Jpn*, 1988, 35: 57–65
 - 20 Nan C, Zhang H, Lin S, et al. Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory cultures. *Aquat Bot*, 2008, 89: 9–15
 - 21 Erhard D, Gross E M. Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. *Aquat Bot*, 2006, 85: 203–211
 - 22 Wang R, Xiao H, Wang Y, et al. Effects of three macroalgae, *Ulva linza*(Chlorophyta), *Corallina pilulifera*(Rhodophyta) and *Sargassum thunbergii*(Phaeophyta) on the growth of the red tide microalga *Prorocentrum donghaiense* under laboratory conditions. *J Sea Res*, 2007, 58: 189–197
 - 23 Lu H, Xie H, Gong Y, et al. Secondary metabolites from the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* and their allelopathic effects on *Skeletonema costatum*. *Biochem Syst Ecol*, 2011, 39: 397–400
 - 24 Dayan F E, Duke S O. Clues in the search for new herbicides. In: Reigosa M J, Pedrol N, González L, eds. *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer: Amsterdam, 2006. 63–68
 - 25 Poulson K L, Sieg R D, Prince E K, et al. Allelopathic compounds of a red tide dinoflagellate have species-specific and context-dependent impacts on phytoplankton. *Mar Ecol-Prog Ser*, 2010, 416: 69–78
 - 26 Mulderij G, Mooij W M, Donk E V. Allelopathic growth inhibition and colony formation of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the aquatic macrophyte *Stratiotes aloides*. *Aquat Ecol*, 2005, 39: 11–21
 - 27 Gross E M. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit Rev Plant Sci*, 2003, 22: 313–339
 - 28 Hilt S. Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. *Aquat Bot*, 2006, 85: 252–256
 - 29 Körner S, Nicklisch A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J Phycol*, 2002, 38: 862–871
 - 30 La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol*, 2000, 71: 45–53
 - 31 Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Sci Technol*, 2008, 41: 1060–1066
 - 32 Kazinczi G, Onofri A, Szabo L, et al. Phytotoxic effects of *Convolvulus arvensis* weed on crops. *Allelopathy J*, 2007, 20: 179–193
 - 33 Basile A, Sorbo S, Giordano S, et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia*, 2000, 71: S110–S116
 - 34 Santos B, Silva A, Pitanga B, et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chem*, 2011, 127: 404–411
 - 35 Qian H, Xu X, Chen W, et al. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 2009, 75: 368–375
 - 36 Hong Y, Hu Y, Li F. Growth and physiological responses of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum* to allelochemical ethyl 2-methyl acetoacetate(EMA) under different initial algal densities. *Pestic Biochem Physiol*, 2008, 90: 203–212
 - 37 Hong Y, Hu H Y, Xie X, et al. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquat Toxicol*, 2009, 91: 262–269