

文章编号: 1674 - 5566(2012)06 - 0982 - 07

## 条斑紫菜壳孢子的抗生素敏感性研究

薛兆亮, 严兴洪

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 以往研究紫菜细胞对抗生素的敏感性时,常以叶状体的酶解单离体细胞为材料,但由于来自同一个叶状体的体细胞处于不同的分化阶段,离体培养时,体细胞的成活、再生和发育途径均不相同,从而无法准确地判断抗生素对紫菜离体细胞的生长和发育影响。以成活、萌发和发育途径等几乎一致的条斑紫菜壳孢子为研究材料,较系统地观察了3种抗生素对壳孢子的成活、生长和发育的影响。结果表明:卡那霉素能促进条斑紫菜壳孢子的萌发、生长和发育。加卡那霉素培养7 d,26%的壳孢子萌发体,其细胞数多于20个,比对照组多2倍,培养11 d和18 d,萌发体的平均长度分别为对照组的1.6倍和2.1倍。氨苄青霉素能显著地抑制条斑紫菜的壳孢子萌发、生长和发育,造成细胞的分裂速度减缓、叶状体发育异常。加氨苄青霉素培养7 d,80%的壳孢子萌发体的细胞数少于15个,培养11 d和18 d,各试验组的壳孢子萌发体的平均长度均显著低于对照组,并且随着氨苄青霉素浓度的提高,萌发体的平均长度下降。氯霉素对条斑紫菜的壳孢子具有强烈的致死作用。加氯霉素培养7 d,浓度大于100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各试验组的壳孢子萌发体全部死亡;培养11 d,低浓度组(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的萌发体也全部死亡,90%以上的萌发体的细胞数小于5个。由此得出,氯霉素是开展条斑紫菜基因工程的理想抗性选择压力。

**研究亮点:** 探讨了3种常用抗生素对条斑紫菜壳孢子的成活、萌发体的生长和发育的影响,发现卡那霉素可显著促进萌发体的生长和发育,而氯霉素对壳孢子具有强烈的致死作用,它有望成为紫菜基因工程的抗性选择压力。

**关键词:** 条斑紫菜;壳孢子;氨苄青霉素;氯霉素;卡那霉素

**中图分类号:** S 948

**文献标志码:** A

紫菜是世界上最主要的人工栽培海藻之一,具有很高的经济和营养价值<sup>[1]</sup>。但是随着紫菜栽培面积的不断扩大,紫菜种质出现退化,病害频发,严重制约了产业的可持续发展。目前,利用传统的育种方法,一些具有优良经济性状的品种(种)系已被选育出来<sup>[2-3]</sup>,但是传统选育的品种(系)在多种经济性状组合方面较难实现,选育本身存在一定的随机性,获得的品种存在许多不足之处。而利用紫菜基因工程育种,具有性状改良针对性强等优势,使得育种速度和效率显著提高。因此,结合紫菜传统育种技术,开展基因工程育种,选育出具有多种经济性状复合优势、抗

逆性强的紫菜新品种,对促进该产业的发展将具有重要意义。

海洋藻类的基因工程起始于20世纪60年代对蓝藻的研究,现今的海洋蓝藻基因工程已经在基因克隆、定位、功能分析和表达调控等方面深入而广泛的展开<sup>[4]</sup>。大型海洋藻类的基因工程起步较晚,始于20世纪90年代,如KUBLER等<sup>[5]</sup>和MIZUKAMI等<sup>[6]</sup>用电击转化分别获得了Gus基因在朱红紫菜(*Porphyra miniata*)和条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的瞬时表达;王素娟等<sup>[7]</sup>通过电转化获得了Gus基因在坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)中的瞬时表达;武建秋等<sup>[8]</sup>用基因枪

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-05-24

**基金项目:** 国家高技术研究发展计划(2012AA10A411);国家自然科学基金(31072208);农业部公益性专项(200903030);国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2C000005);上海市科学技术委员会重点科技攻关项目(10391901100);国家海洋局公益性专项(201105008,201105023);上海市教育委员会海洋生物学重点学科建设项目(J50701)

**作者简介:** 薛兆亮(1983—),男,硕士研究生,研究方向为海藻遗传育种。E-mail: xzl1983@hotmail.com

**通讯作者:** 严兴洪, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

获得了 Cat 基因在海带 (*Laminaria japonica* Aresch) 中的瞬时表达。但是由于种种困难,均未能获得稳定表达的转化体系,至今大型海洋藻类的基因工程还处于发展初级阶段。

有效的抗性选择压是开展大型海藻基因工程的基础,关于紫菜抗性选择压的研究主要集中在抗生素对紫菜叶状体体细胞再生影响方面<sup>[9-11]</sup>,且大多数为定性描述抗生素对紫菜体细胞生长和发育的影响。但是紫菜叶状体的体细胞由于本身处于不同的分化阶段,在体外再生培养时,具有各自不同的再生发育途径<sup>[12]</sup>,因此难以准确地判断抗生素对紫菜体细胞再生体生长和发育的影响。而紫菜的壳孢子具有相同的发育途径和趋势,几乎都能发育成一个完整的叶状体。所以在研究紫菜抗性选择压时,如果以壳孢子为研究材料,不仅可以弥补体细胞所存在的发育能力和途径不相同的不足,而且还能将来开展转基因紫菜的培育时得到完整叶状体提供保障。本文的目的是较系统地研究数种抗生素对条斑紫菜壳孢子的萌发、生长和发育的影响,寻找合适的抗生素作为抗性选择压,为今后开展紫菜基因工程育种打下一定的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 条斑紫菜贝壳丝状体的培育与壳孢子释放

本试验所用的条斑紫菜为野生品系 (WT-LS),是由从江苏吕泗海区采回的一棵叶状体放散的果孢子萌发而来,在实验室以自由丝状体保存<sup>[13]</sup>。

取适量的条斑紫菜自由丝状体,加入少量灭菌海水,用打碎机打碎。将打碎的丝状体均匀喷洒在清理干净的文蛤壳上,培养液由灭菌海水加 MES 培养基<sup>[14]</sup>配置而成。培养条件:暗光培养 3 d 后,光照密度为  $40 \sim 50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光周期为 10 L: 14 D,温度为  $(18 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 。移植 10 d 后,清除表面多余的自由丝状体,随后每 7 天洗一次贝壳。培养至 40 d 左右,丝状体长满贝壳表面,转移到  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  下进行促熟培养。其它培养条件:光照密度  $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,光周期 8 L: 16 D,每 10 天清洗一次贝壳。大约促熟培养 30 d 后,大量膨大藻丝形成,贝壳丝状体被用于采壳孢子。

取 2 个成熟的贝壳分别置于 250 mL 烧杯中,同时加入 100 mL 含 MES 培养液的灭菌海水,在  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  下充气培养,促进壳孢子的形成和放散。每天更换培养液,并同时镜检壳孢子放散情况。当每滴水中的壳孢子密度达到 10 个左右/视野 ( $10 \times$ ) 时,收集壳孢子到培养皿中,用于抗生素处理试验。

### 1.2 抗生素的配制

本研究选用了卡那霉素,氨苄青霉素和氯霉素(购自上海生工生物工程有限公司)3 种抗生素,均用无菌去离子水配制,经过  $0.22 \mu\text{m}$  的滤膜过滤除菌,于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.3 条斑紫菜壳孢子对抗生素的敏感试验

在各培养皿中,分别放入相同数量的壳孢子,在实验组中分别加入含有不同种类和浓度的抗生素的培养液(表 1),对照组未添加抗生素。每个试验组设置 3 个平行组,每隔 4 d 镜检一次,统计孢子或萌发体的存活个数,每个培养皿取 40 个视野 ( $10 \times$ )。孢子存活率为存活的孢子个数占初始孢子总数的比例。隔 7 d 换一次培养液,同时补加抗生素。培养 3 周,在此期间统计壳孢子的形态、颜色、分裂和萌发体的生长等情况。孢子分裂率为分裂的孢子个数占存活孢子总数的比例。

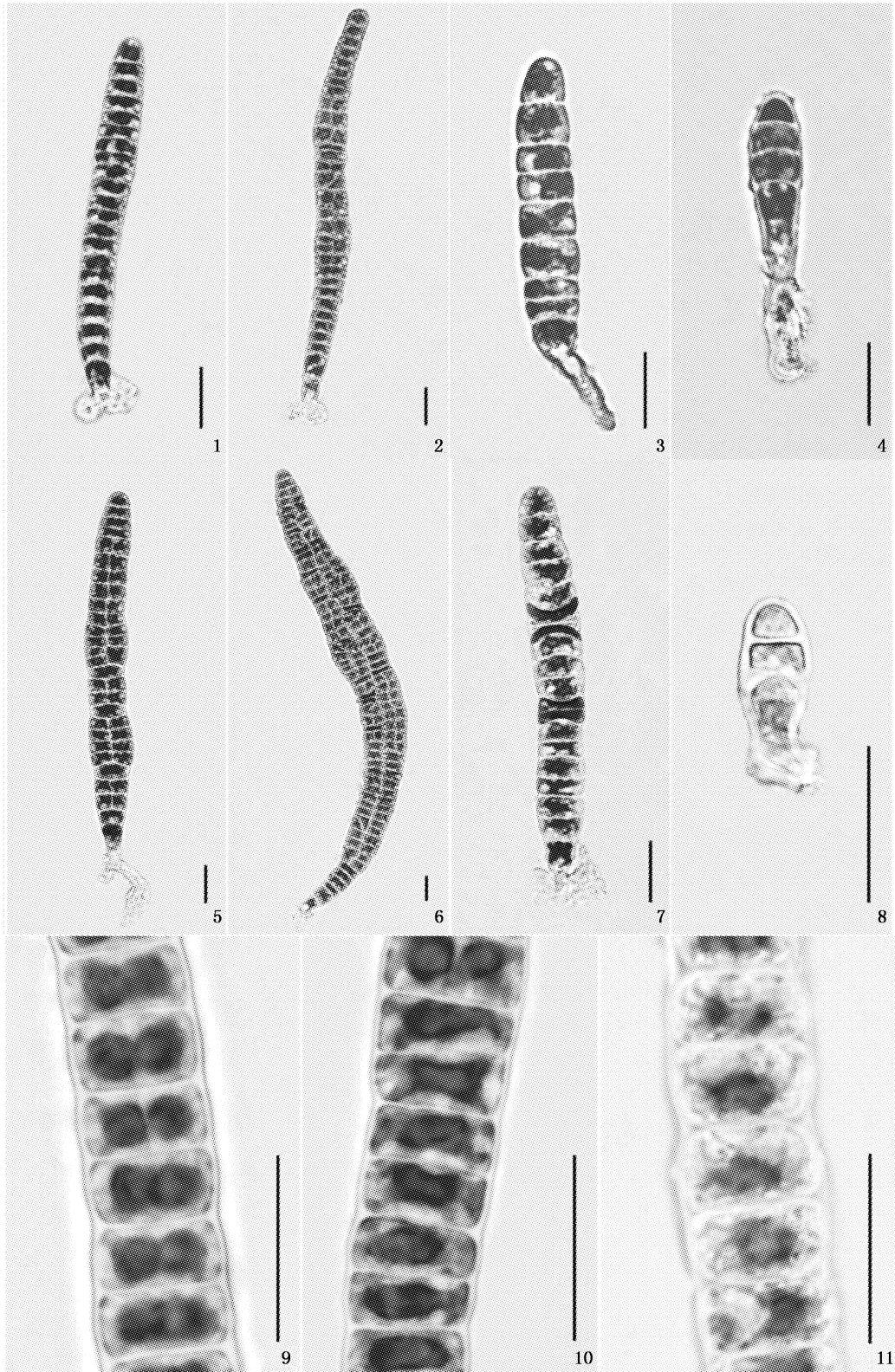
表 1 抗生素对条斑紫菜壳孢子生长发育影响的试验设计

Tab. 1 Experimental design of the effect of different antibiotics on the growth and development of *Porphyra yezoensis* conchospores

抗生素种类	试验组				对照组
	抗生素浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$				
卡那霉素	100	200	300	500	0
氨苄青霉素	100	200	300	500	0
氯霉素	50	100	200	500	0

## 2 结果

在对照组中壳孢子的存活、分裂、萌发和生长发育等均显正常(表 2,图 1,图版 I-1, 5, 9);但在添加了卡那霉素、氨苄青霉素和氯霉素的试验组中,壳孢子的生长和发育则受到了不同程度的影响。



图版 I 用不同抗生素处理后的条斑紫菜壳孢子萌发体的生长与发育

**Plate I Growth and development of conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* after treated by different antibiotics**

1. 对照组的壳孢子萌发体(日龄 7 d); 2-4. 分别为卡那霉素组、氨苄青霉素组和氯霉素组的壳孢子萌发体(日龄 7 d); 5. 对照组的壳孢子萌发体(日龄 11 d); 6-8. 分别为卡那霉素组、氨苄青霉素组和氯霉素组的壳孢子萌发体(日龄 11 d); 9. 对照组的壳孢子萌发体(日龄 11 d)细胞; 10-11. 分别为卡那霉素组和氨苄青霉素组的壳孢子萌发体(日龄 11 d)细胞。图中卡那霉素和氨苄青霉素处理浓度均为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 氯霉素处理浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 标尺均为 25  $\mu\text{m}$ 。

表 2 抗生素处理后条斑紫菜壳孢子的存活率  
Tab.2 The survival rates of *Porphyra yezoensis* conchospores after antibiotic treatment

抗生素种类	抗生素浓度 /( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	壳孢子的存活率/%			
		1 d	4 d	7 d	11 d
空白对照	0	100	91.0 $\pm$ 1.7	86.6 $\pm$ 4.1	84.9 $\pm$ 3.2
卡那霉素	100	100	89.4 $\pm$ 3.3	86.4 $\pm$ 4.3	83.9 $\pm$ 2.7
	200	100	90.0 $\pm$ 3.1	85.8 $\pm$ 1.5	84.1 $\pm$ 1.7
	300	100	89.9 $\pm$ 4.4	86.6 $\pm$ 2.5	83.7 $\pm$ 5.8
	500	100	89.8 $\pm$ 3.8	85.2 $\pm$ 4.9	84.0 $\pm$ 4.2
氨苄青霉素	100	100	88.7 $\pm$ 5.1	85.6 $\pm$ 5.6	74.6 $\pm$ 4.5*
	200	100	87.6 $\pm$ 2.5	84.5 $\pm$ 2.7	72.3 $\pm$ 3.1*
	300	100	86.0 $\pm$ 2.3	82.0 $\pm$ 1.6	67.8 $\pm$ 5.9*
	500	100	85.3 $\pm$ 1.9	79.0 $\pm$ 6.3*	66.5 $\pm$ 4.9*
氯霉素	50	100	57.6 $\pm$ 1.1**	36.8 $\pm$ 1.3**	0**
	100	100	49.5 $\pm$ 4.9**	0**	0**
	200	100	41.8 $\pm$ 4.1**	0**	0**
	500	100	33.9 $\pm$ 3.6**	0**	0**

注:\*表示与对照组比呈显著差异( $P < 0.05$ );\*\*表示与对照组比呈极显著差异( $P < 0.01$ )。

## 2.1 条斑紫菜壳孢子对卡那霉素的敏感性试验结果

与对照组相比,在添加不同浓度的卡那霉素试验组之间,条斑紫菜壳孢子的存活率和分裂率均没有显著差异(表 2,图 1)。显微观察也显示,用卡那霉素处理过的壳孢子萌发体呈棕红色,细胞排列紧密,叶状体发育良好(图版 I - 2, 6, 10)。

## 2.2 条斑紫菜壳孢子对氨苄青霉素的敏感性试验结果

培养 11 d,加氨苄青霉素的各试验组的壳孢子成活率明显比对照组低,且随着抗生素浓度的提高,壳孢子存活率明显下降(表 2)。

另外,发现不论浓度高低,卡那霉素处理对壳孢子分裂均有显著的促进作用。培养 7 d,统计处理组的平均数,细胞数多于 20 个的壳孢子萌发体个体数达 26.1%,比对照组高 1 倍多(图 2)。培养 11 d,壳孢子萌发体的平均长度显著大于对照组( $P < 0.01$ ),达到 350  $\mu\text{m}$ (图 3),其中最大的个体体长已超过 600  $\mu\text{m}$ 。培养 2 周后,壳孢子萌发体的平均长度超过 1 500  $\mu\text{m}$ (图 4),培养皿中的壳孢子萌发体已经肉眼明显可见,藻体长度远大于对照组(图版 II - 1, 2)。

与对照组相比,氨苄青霉素处理组的壳孢子分裂率略有下降(图 1)。培养 7 d,统计处理组的平均数,约 60% 的壳孢子萌发体所含细胞数为 1~10 个,细胞数多于 15 个的个体数不足 20%

(图 2)。培养 11 d,各试验组的壳孢子萌发体的平均长度显著低于对照组( $P < 0.05$ )。另外,随着抗生素浓度的提高,萌发体的平均长度呈现下降趋势(图 3)。培养 2 周,壳孢子萌发体的生长仍缓慢(图 4),培养皿中可观察到壳孢子萌发体颜色发黄,藻体短小(图版 II - 3)。

另外,显微观察发现,氨苄青霉素处理组的壳孢子萌发体,其细胞发育不正常,色素体的体积明显变小,颜色变淡(图版 I - 3, 7, 11)。

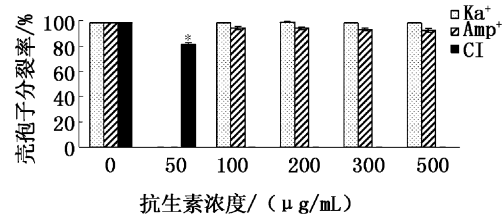


图 1 抗生素及其浓度对条斑紫菜壳孢子分裂的影响  
Fig.1 The division rates of *Porphyra yezoensis* conchospores after 7 days of culture with different antibiotics at different concentrations

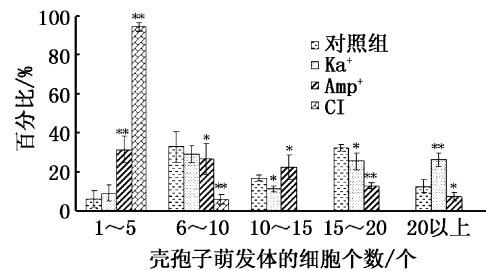


图 2 抗生素处理 7 d 后的条斑紫菜壳孢子的发育情况  
Fig.2 Development of conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* after 7 days of culture with different antibiotics

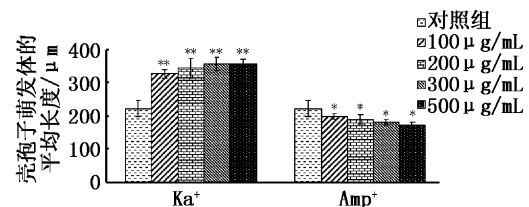


图 3 不同浓度的抗生素处理 11 d 的条斑紫菜壳孢子萌发体的平均体长  
Fig.3 Mean length of conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* after 11 days of culture by different antibiotics with different concentrations

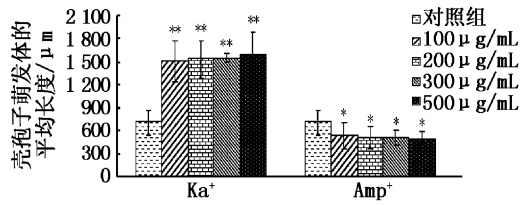
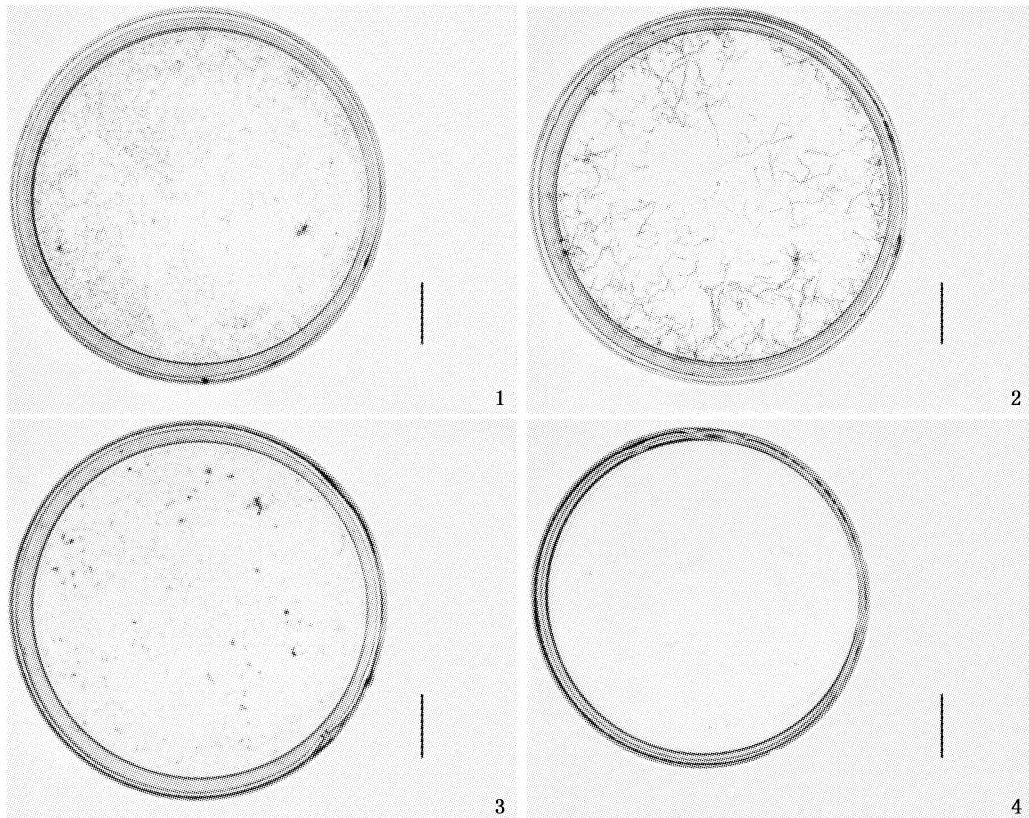


图4 不同浓度的抗生素处理 18 d 的条斑紫菜壳孢子萌发体的平均体长

Fig. 4 Mean length of conchospore germlings of *Porphyra yezoensis* after 18 days of culture by different antibiotics with different concentrations

### 2.3 条斑紫菜壳孢子对氯霉素的敏感性试验

与对照组相比,氯霉素各浓度组的条斑紫菜壳孢子存活率和分裂率均显著降低。培养第 7 天,浓度大于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的各试验组,壳孢子已全部死亡;培养第 11 天,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组的壳孢子也全部死亡(表 2,图版 II - 4)。显微观察发现,氯霉素处理过的壳孢子,其细胞显黄绿色,星状色素体消失,呈弥散状,90% 以上的壳孢子萌发体死亡时,其细胞数小于 5 个(版图 I - 8,图 2)。



图版 II 培养皿内抗生素处理 21d 的条斑紫菜壳孢子萌发体形态比较

Plate II Comparison of conchospore germlings in petri dishes after being treated by antibiotics for 21 days

1. 对照组的壳孢子萌发体; 2. 卡那霉素(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理的壳孢子萌发体; 3. 氨苄青霉素(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理的壳孢子萌发体; 4. 氯霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理的壳孢子萌发体。图中标尺均为 1 cm。

综合上述结果说明,卡那霉素对条斑紫菜壳孢子的生长和发育具有促进作用,能够加速细胞的分裂,使得壳孢子萌发体的第一次横分裂明显提前;氨苄青霉素对条斑紫菜壳孢子的生长和发育存在一定的抑制作用,主要表现在减缓细胞的分裂速度和影响细胞色素体的正常发育;而氯霉素对条斑紫菜壳孢子的生长和发育具有强烈的抑制作用。

### 3 讨论

在各类动植物基因工程中,卡那霉素,氨苄青霉素和氯霉素是 3 种较为常用的抗生素标记。但是每种抗生素的作用靶位不尽相同,已有研究证明,卡那霉素是一种蛋白质合成抑制剂,通过与 30S 核糖体结合而使 mRNA 产生错读;青霉素的抗菌作用可能和细胞壁合成相关;氯霉素也是

一种蛋白质合成抑制剂,却是通过干扰核糖体蛋白的合成而起作用<sup>[8]</sup>。因此,在本研究中,3种抗生素对条斑紫菜壳孢子的生长和发育产生了不同的影响可能缘于他们各自的作用机理不同。

离体的紫菜体细胞发育和分化问题比较复杂<sup>[12,15]</sup>。卡那霉素对紫菜细胞的影响存在较大的争议:沈怀舜和王素娟<sup>[10]</sup>认为卡那霉素会减缓条斑紫菜体细胞的分裂和生长;张亚萍等<sup>[9]</sup>的研究结果显示条斑紫菜体细胞对卡那霉素不敏感;王萍等<sup>[16]</sup>发现卡那霉素 > 400 mg/L 能促进紫菜组织块的生长。而本研究首次发现,卡那霉素能显著加快条斑紫菜壳孢子的细胞分裂速度,从而促进萌发体的生长和发育;即使在较低的卡那霉素浓度下(100 μg/mL),这个效果也十分明显。但是卡那霉素为何能促进壳孢子的细胞分裂和萌发体的生长和发育,有待于进一步研究。

本研究结果证明,氨苄青霉素对条斑紫菜壳孢子的细胞分裂,萌发体的生长和发育均存在抑制作用,这与以往关于氨苄青霉素对紫菜叶状体细胞的影响研究结果基本相符<sup>[9-11]</sup>。但本研究发现,氨苄青霉素对条斑紫菜壳孢子的抑制作用更多地表现在延缓细胞分裂和导致细胞色素体发育异常等方面,而没有发现处理体细胞时出现的抑制假根形成<sup>[11]</sup>。

武建秋等<sup>[8]</sup>在海带转基因研究中认为氯霉素是海带基因工程理想的抗性压;王素娟等和张亚萍等研究得出 Cat 基因是有望成为条斑紫菜基因工程理想的选择性标记基因<sup>[9-10]</sup>,赵杨等<sup>[11]</sup>对野生坛紫菜的体细胞研究初步表明,氯霉素可以作为坛紫菜基因工程有效的抗性压。本文证明,条斑紫菜壳孢子对氯霉素非常敏感,这与紫菜体细胞的研究结果是一致的。即使在低浓度条件下(50 μg/mL),处理 11 d 后的壳孢子萌发体的细胞也全部死亡,说明氯霉素对紫菜细胞具有强烈的致死效果,可以成为紫菜基因工程有效的抗性压。

## 参考文献:

- [1] 马家海,蔡守清. 条斑紫菜的栽培和加工[M]. 北京: 科学出版社, 1996:1-58.
- [2] 《中国水产》编辑部. 我国首个自主选育的紫菜良种——“申福1号”诞生[J]. 中国水产, 2010(3):25.
- [3] 蒋悦,严兴洪,刘长军. 坛紫菜优良品系的选育和特性分析[J]. 水产学报, 2010, 34(9):1363-1370.
- [4] 陈颖,李文彬,孙勇如. 藻类基因工程及其展望[J]. 世界农业, 1998(6):30-32.
- [5] KUBLER J E, MINOCHA S C, MATHIESON A C. Transient expression of the GUS reporter gene in protoplasts of *Porphyra miniata* (Rhodophyta) [J]. Journal of Marine Biotechnology, 1994, 1:165-169.
- [6] MIZUKAMI Y, HADO M, KITO H, et al. Reporter gene introduction and transient expression in protoplasts of *Porphyra yezoensis* [J]. Journal of Applied Phycology, 2004, 16(1):23-29.
- [7] 王素娟,李晖,李瑶,等. 电穿孔法诱导 GUS 基因在坛紫菜原生质体中的瞬间表达[J]. 上海水产大学学报, 1994, 3(3):145-150.
- [8] 武建秋,秦松,邓田,等. 氯霉素乙酰转移酶(Cat)基因在海带中的表达[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(1):28-33.
- [9] 张亚萍,于文功,戴继勋,等. 条斑紫菜叶状体细胞的抗生素敏感性研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2):245-250.
- [10] 沈怀舜,王素娟. 紫菜体细胞对抗生素的敏感性实验[J]. 海洋科学, 1998(1):67-69.
- [11] 赵杨,李秀,陈奕欣,等. 坛紫菜叶状体细胞对抗生素敏感性的研究[J]. 台湾海峡, 2004, 23(4):496-499.
- [12] 严兴洪,刘新轶,张善露. 条斑紫菜叶状体细胞的发育和分化[J]. 水产学报, 2004, 28(2):145-154.
- [13] 付春辉,严兴洪,黄林彬,等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)选育品系壳孢子的放散量与耐高温性研究[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(3):460-466.
- [14] 严兴洪,李琳,陈俊华,等. 坛紫菜单性生殖与遗传纯系分离[J]. 高技术通讯, 2007, 17(2):202-210.
- [15] 王素娟. 海藻生物技术[M]. 上海:上海科学出版社, 1994:93-98.
- [16] 王萍,成锋,滕亚娟,等. 抗生素抑制农杆菌的效果及对条斑紫菜生长发育的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(7):405-407.

## Studies on antibiotic sensitivity of conchospores in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta)

XUE Zhao-liang, YAN Xing-hong

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In the previous studies on the antibiotic sensitivity of *Porphyra*, the somatic cells isolated enzymatically from *Porphyra* gametophytic blades were often used. However, the accurate analysis of antibiotics effects on the survival, growth and development of the somatic cells was difficult, because the somatic cells isolated even from a *Porphyra* blade had different regeneration capacity, cell division and developmental pathways when they were cultured *in vitro*. In this paper, the antibiotic sensitivities of *Porphyra yezoensis* conchospores which are almost the same in viability, germinability and developmental pathways, were studied by treatment with kanamycin, ampicillin and chloramphenicol. The obtained results demonstrated that kanamycin could promote the growth and development of conchospore germlings. After 7 days of culture, the cell number of 26% of the conchospore germlings was over 20 cells, which was twice as many as that of control group. After 11 and 18 days of culture, the mean length of conchospore germlings was 1.6 times and 2.1 times longer than that of control group, respectively. The treatment with ampicillin could inhibit the growth and development of conchospore germlings, showing decrease of cell division rates and inhibition of germling development. After 7 days of culture, the cell number was less than 15 in 80% of conchospore germlings. After 11 and 18 days of culture, the mean length of conchospore germlings was shorter than that of control group, as ampicillin concentrations increased. The chloramphenicol had strong lethal effect on conchospore germlings. When chloramphenicol concentration was higher than 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the conchospore germlings died out after 7 days of culture. The conchospore germlings treated with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of chloramphenicol also died out after 11 days of culture. The cell number was less than 5 cells in 90% of the dead conchospore germlings. Therefore, it was concluded that the chloramphenicol is an effective selective pressure in genetic engineering of *P. yezoensis*.

**Key words:** *Porphyra yezoensis*; conchospore; ampicillin; kanamycin; chloramphenicol