

雨生红球藻对 4 种抗生素的敏感性研究

李艳国^{1,2}, 张琳^{1,2*}, 杨柳^{1,2}, 黄益丽^{1,2}, 徐年军^{1,2}

(1. 宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 教育部应用海洋生物技术重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 微藻对抗生素的敏感性研究是确定微藻遗传转化体系中筛选标记的基础。监测不同琼脂浓度下雨生红球藻的生长状况, 确定该藻落生长的最优琼脂浓度; 依据不同质量浓度庆大霉素、博来霉素、氯霉素和壮观霉素对雨生红球藻生长的影响, 确定该藻对 4 种抗生素的敏感性, 每种抗生素均设置固体和液体培养实验。研究结果表明: (1) 固体平板培养基上雨生红球藻生长的最佳琼脂浓度为 0.8%。(2) 实验浓度下, 雨生红球藻对庆大霉素、博来霉素敏感性高, 可作为雨生红球藻遗传转化的选择抗生素, 其对应的抗性基因可作为选择标记基因, 所需质量浓度分别为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。雨生红球藻对氯霉素不敏感, 可用于藻种无菌化处理。(3) 在固体和液体培养基上, 雨生红球藻对同一种抗生素的敏感性稍有不同, 研究及应用需根据培养方式选择适宜的抗生素浓度。

关键词: 雨生红球藻; 遗传转化; 琼脂浓度; 抗生素

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2017) 05-0037-05

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种淡水单细胞绿藻, 属于绿藻纲、团藻目、红球藻科、红球藻属^[1]。它是自然界中积累天然虾青素能力最强的生物^[2], 在胁迫条件下, 其虾青素积累量可达细胞干重的 3.8%左右^[3]。利用雨生红球藻生产虾青素是国内外研究的热点, 前景广阔。目前, 相关研究主要着力于利用生理生化手段实现雨生红球藻高密度培养和虾青素快速积累^[4-7], 但结果不够理想。

随着基因工程的发展, 已有将虾青素合成相关基因导入微生物、其他藻类、高等植物中生产虾青素的报道^[8-11], 但是虾青素产量并不高, 距离产业化应用仍有较大差距, 因此对雨生红球藻本身进行基因水平改造是提高其养殖密度, 促进虾青素积累的途径之一。目前, 雨生红球藻遗传转化体系尚不成熟, 寻找合适的基因工程选择试剂及其对应的筛选标记基因仍是关键。氯霉素(Chloramphenicol)、壮观霉素(Spectinomycin)、庆大霉素(Gentamicin)、博来霉素(Zeocin)是基因工程中

常用的抗生素^[12-15]。本文主要分析了雨生红球藻对 4 种抗生素的敏感性, 旨在为确定雨生红球藻筛选标记基因提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

雨生红球藻藻种由宁波大学微藻种质库提供, 经多次分离纯化后得到单一纯种培养物。培养条件为: 温度 24°C , 光照强度 2500 lx , 光周期 $12 \text{ h} : 12 \text{ h}$ 。培养基为 NMB3[#]培养基^[16]。经 121°C , 20 min 高压蒸汽灭菌后使用。

1.2 不同琼脂浓度培养基培养雨生红球藻

固体培养基常用于微藻分离、保种和遗传转化等。本研究分别配制琼脂浓度为 0.4%、0.8%、1.2%、1.6% 和 2.0% 的固体平板培养基, 每个浓度设置 3 个平行。吸取 $10 \mu\text{L}$ 对数生长期的藻液均匀涂布于固体培养基表面, 倒置培养, 每天定时观察和记录藻落数。

收稿日期: 2016-12-13.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(31572638); 宁波市自然科学基金(2015A610265); 宁波大学学科项目(XKL1526); 浙江省科技厅公益性项目(2015C32021); 宁波市科技攻关项目(2014C10023); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2016R405078)。

第一作者: 李艳国(1992-), 男, 河南三门峡人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 藻类分子生物学。E-mail: 807573212@qq.com

*通信作者: 张琳(1985-), 女, 山东滕州人, 博士/讲师, 主要研究方向: 应用微藻生物学。E-mail: zhanglin2@nbu.edu.cn

1.3 固体培养基中抗生素种类及质量浓度

庆大霉素、博来霉素、氯霉素、壮观霉素购自北京索莱宝科技有限公司. 抗生素母液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 低温保存. 分别配制不同抗生素终质量浓度(表 1)的固体平板培养基(琼脂浓度为 0.8%), 每个质量浓度设置 3 个平行. 吸取 $200\ \mu\text{L}$ 对数生长期的藻液均匀涂布于固体培养基表面, 倒置培养, 每天定时观察和记录藻落数.

表 1 抗生素种类及其配置的质量浓度

抗生素种类	抗生素质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$				
庆大霉素	0	1	5	10	20
博来霉素	0	0.1	0.5	1.5	3.0
氯霉素	0	50	100	200	300
壮观霉素	0	100	200	300	400

1.4 液体培养基中抗生素种类及质量浓度

分别配制 $90\ \text{mL}$ 含不同抗生素质量浓度(表 1)的液体培养基, 加入 $6\ \text{mL}$ 对数生长期的藻液, 每个质量浓度设置 3 个平行, 以不加抗生素作为对照. 每 2 d 观察藻液生长状况, 并测定藻液光密度.

1.5 指标测定

雨生红球藻藻落计数方法: (1)藻落判断. 肉眼观察, 藻落正反面呈绿色, 无味, 表面光滑、质地均匀、不透明、无光泽, 单个藻落小而平坦, 藻落之间相对分散, 无蔓延扩散, 易区别于细菌、霉菌等. (2)藻落计数. 点数藻落数目, 再用 10 倍放大镜检查防漏.

雨生红球藻藻液光密度使用 $750\ \text{nm}$ 处的藻液吸光度(OD_{750})表示.

1.6 数据分析

数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 One-Way ANOVA (Turkey)进行显著性分析($P<0.05$).

2 结果与分析

2.1 琼脂浓度对雨生红球藻生长的影响

不同琼脂浓度固体平板培养基上雨生红球藻的生长情况见表 2. 从表 2 可知, 在琼脂浓度为 0.4% 和 0.8% 的固体培养基上, 雨生红球藻可以正常生长; 琼脂浓度超过 1.2% 后, 微藻生长速度下降, 藻落数变少甚至难以生长. 实验发现, 琼脂浓度为 0.4% 的固体平板培养基轻微晃动即碎裂, 不适于雨生红球藻的保存和培养. 琼脂浓度为 0.8%

的平板凝固性好, 且雨生红球藻可以正常生长, 适合研究使用. 当琼脂浓度过高时, 培养基凝固效果虽好, 但水分及营养元素流动性下降, 难以被吸收利用, 影响藻细胞正常生长.

表 2 不同琼脂浓度对雨生红球藻生长的影响

培养天数/d	琼脂浓度/%				
	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
10	1 ± 0.6^a	1 ± 0^a	—	—	—
20	3 ± 1.0^a	2 ± 0.6^b	1 ± 0.6^b	—	—
30	4 ± 1.0^a	3 ± 1.2^{ab}	2 ± 1.0^{bc}	1 ± 0.6^c	—

注: “—”表示无藻落长出. 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

2.2 固体培养基中雨生红球藻对 4 种抗生素的敏感性

表 3 为添加 4 种抗生素的固体平板培养基上藻落的生长状况.

表 3 固体培养基中 4 种抗生素对雨生红球藻生长的影响

抗生素种类	抗生素质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	藻落数目/个	
		12 d	50 d
庆大霉素	0	35 ± 2.1^a	93 ± 4^a
	1	3 ± 0.6^b	3 ± 0.6^b
	5	—	—
博来霉素	0	35 ± 2.1^a	93 ± 4^a
	0.1	2 ± 0.6^b	6 ± 0.5^b
	0.5	—	—
氯霉素	0	35 ± 2.1^a	93 ± 4^a
	50	26 ± 3.8^b	40 ± 3.2^b
	100	2 ± 0.6^c	3 ± 0.5^c
	200	1 ± 0^c	3 ± 0.6^c
	300	1 ± 0.6^c	1 ± 0.6^c
壮观霉素	0	35 ± 2.1^a	93 ± 4^a
	100	3 ± 0.6^b	4 ± 1^b
	200	—	1 ± 0.6^b
	300	—	1 ± 0.6^b
	400	—	—

注: “—”表示无藻落长出. 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

从表 3 可知, 添加 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素后, 藻落数目显著低于对照组, 但仍有较多藻落长出. 氯霉素质量浓度达到 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时仍有藻落长出, 说明固体培养基上氯霉素的致死剂量大于 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 雨生红球藻对其敏感性低. 庆大霉素和博来霉素对雨生红球藻生长抑制效果显著, 致死剂量分别为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 壮观霉素质量浓度低于 $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 均有藻落出现, 达到

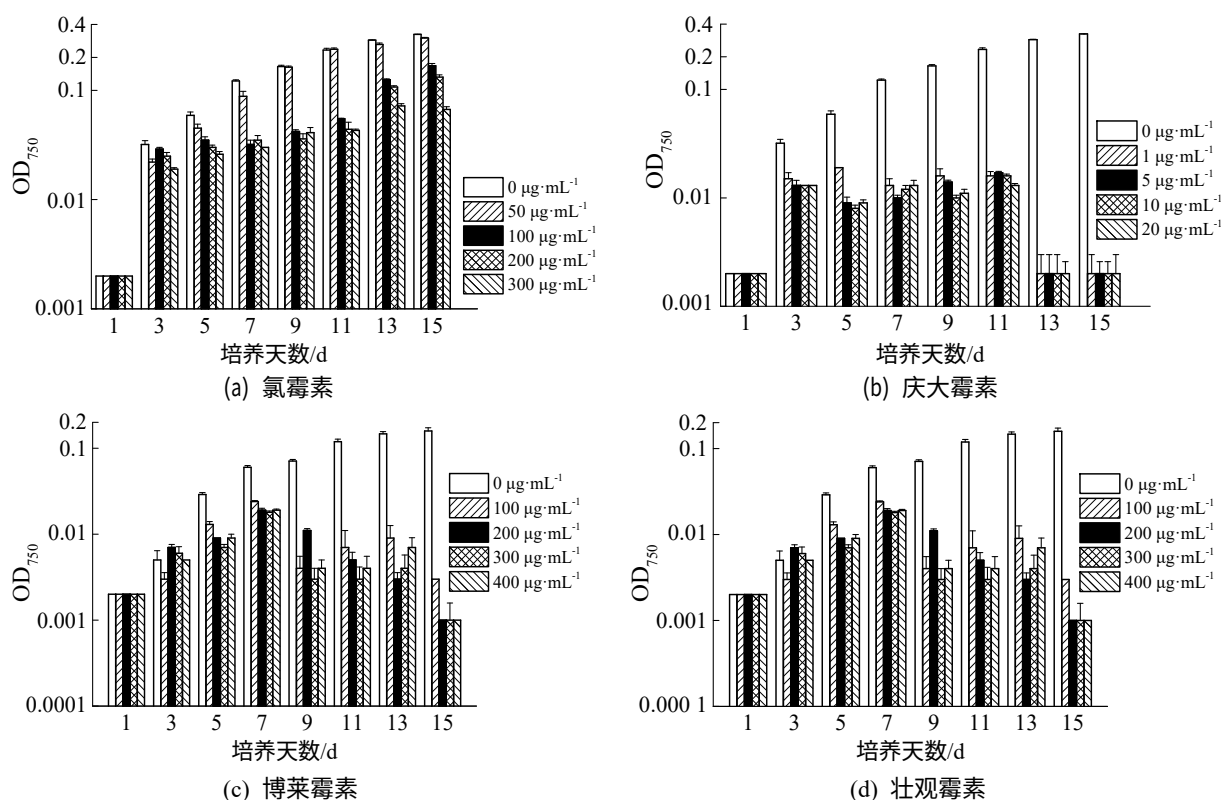


图1 液体培养基中4种抗生素对雨生红球藻生长的影响

400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后才完全抑制微藻生长。基于环保和生物安全考虑,过高质量浓度的抗生素不适合用作基因工程的筛选抗生素。因此,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 庆大霉素和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素可作为选择压力,筛选雨生红球藻基因工程阳性转化子;而低质量浓度的氯霉素适用于藻种分离纯化。

2.3 液体培养基中雨生红球藻对4种抗生素的敏感性

液体培养基中抗生素对雨生红球藻生长的影响如图1所示。从图1可知,不同抗生素对雨生红球藻的抑制效果不同,其对氯霉素的敏感性最低,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氯霉素未对雨生红球藻生长产生抑制,提示低质量浓度氯霉素可作为藻种无菌化处理的抑菌剂;超过 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,雨生红球藻生长缓慢,藻密度也有所下降,说明高质量浓度氯霉素在一定程度上抑制了微藻的生长增殖。

庆大霉素、博莱霉素、壮观霉素对雨生红球藻的抑制效果相似,添加抗生素的各组细胞密度均处于极低水平($\text{OD}_{750} < 0.025$),藻细胞滞长;培养后期,细胞密度下降,藻液逐渐透明,说明雨生红球藻对庆大霉素、博莱霉素、壮观霉素敏感性均较高,抗生素严重影响了藻细胞的增殖,长时间处理微

藻难以正常生长。实际应用及研究中,抗生素的使用量需严格控制,以防产生环境和生物安全性问题。庆大霉素和博莱霉素使用量较少,分别为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,且效果较好。

3 讨论

3.1 雨生红球藻生长的最适琼脂浓度

琼脂浓度不仅影响固体培养基的凝固效果,还影响微藻对水分和营养元素的吸收。有研究表明^[17],0.6%~0.8%的琼脂浓度适合微藻的生长需求,培养效果好。本研究也发现,最适合雨生红球藻生长的琼脂浓度为 0.8%,琼脂浓度过低,培养基易碎裂;琼脂浓度过高,难以为藻细胞提供营养,导致生长速度慢甚至难以生长。最佳琼脂浓度的确定可为藻种纯化、保存等提供借鉴。

3.2 雨生红球藻对博莱霉素的敏感性

博莱霉素及其抗性基因 *ble* 作为选择标记基因已广泛用于多种微藻的遗传转化研究^[18-19],*ble* 基因在杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)^[12]、金藻(*Chrysophyta*)及莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)^[20]、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)^[21]中已获得瞬时

或稳定表达。滕长英等^[22]研究表明, $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博来霉素可明显抑制雨生红球藻生长, 且博来霉素会因光照逐渐分解。樊庆德等^[23]指出, $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博来霉素能对雨生红球藻产生很大伤害, 使藻细胞裂解, 适合作为遗传转化筛选试剂。本研究发现, 因固体平板培养基上抗生素流动性弱, 作用效果不如液体培养基, 在液体培养基中仅需 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博来霉素即可抑制微藻生长, 而固体培养基中则需 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与其他研究者产生差异的主要原因可能是不同藻株之间的差异或培养条件的影响, 但结果均表明博来霉素及其抗性基因 *ble* 可用于雨生红球藻基因工程阳性转化子的筛选。

3.3 雨生红球藻对庆大霉素的敏感性

庆大霉素与核糖体 30S 亚基结合, 阻断蛋白质合成导致细胞死亡, *AACC3* 基因编码的氨基葡萄糖乙酰转移酶可使庆大霉素失活^[24-25]。庆大霉素选择标记系统在烟草和番茄中已得到应用^[26], 但对部分微藻如螺旋藻(*Spirulina*)、湛江等鞭金藻(*Isochrysis zhanjiangensis*)等并不适用^[25-28]。本研究结果表明, 固体和液体培养下分别需庆大霉素 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 即对雨生红球藻产生良好的抑制效果, 可作为雨生红球藻遗传转化的选择试剂。

3.4 雨生红球藻对壮观霉素的敏感性

壮观霉素可结合核糖体 30S 亚基, 阻断蛋白质合成导致细胞死亡, *aadA* 基因编码的氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶能产生壮观霉素抗性^[29]。研究发现, 在固体培养基中, 当壮观霉素达到 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后, 没有藻落生长; 在液体培养基中, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的壮观霉素可抑制雨生红球藻生长。液体培养基中抗生素的作用效果与固体培养基有差异, 但所需抗生素含量均较高, 在实际应用及研究中不符合抗生素的安全使用原则, 易产生抗药性和环境污染。

3.5 雨生红球藻对氯霉素的敏感性

氯霉素与核糖体 50S 亚基结合, 抑制肽酰基转移酶活性, 阻断蛋白质合成导致细胞死亡, *CAT* 基因编码的氯霉素乙酰转移酶可使氯霉素乙酰化而失活^[30]。有研究表明^[26,30-32], 龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)、多种蓝藻(*Cyanobacteria*)、海带(*Saccharina japonica*)等都对氯霉素表现出较高的敏感性, 多种绿藻对氯霉素则不甚敏感。本研究表

明, 高于 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氯霉素会抑制微藻生长增殖, 但仍处于藻的耐受范围, 这与滕长英等^[22]研究报道的结果相近, 均表明雨生红球藻对氯霉素不敏感, 不适合作为选择试剂。氯霉素影响真核细胞线粒体内的蛋白质合成, 而大部分物质进入线粒体内膜又需要特异性载体进行运输^[33], 缺乏相关载体导致氯霉素难以进入线粒体, 因而对雨生红球藻藻细胞产生的影响也较弱。

参考文献:

- [1] 陈峰, 姜悦. 微藻生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:151-153.
- [2] KAMATH B, VIDHYAVATHI R, SARADA R, et al. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(18):8667-8673.
- [3] RAPOSO M F, MORAIS A M, MORAIS R M. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(3):1253-1257.
- [4] WANG J, HAN D, SOMMERFELD M R, et al. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*, in an outdoor photobioreactor[J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(1):253-260.
- [5] 蒋霞敏, 柳敏海, 任凯来. 化学因子对雨生红球藻诱变株虾青素积累的调控[J]. 宁波大学学报(理工版), 2005, 18(3):306-312.
- [6] IMAMOGLU E, DALAY M, SUKAN F. Effect of different cultivation models on growth of *Haematococcus pluvialis* floto[J]. International Journal of Natural & Engineering Sciences, 2009, 3(2):10-13.
- [7] 才金玲, 欧阳泽瑞, 陈国兴, 等. 光照强度对雨生红球藻细胞生长和虾青素积累的影响[J]. 食品科技, 2013(1):17-20.
- [8] BREITENBACH J, MISAWA N, KAJIWARA S, et al. Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 140(2):241-246.
- [9] TAN C P, ZHAO F Q, SU Z L, et al. Expression of β -carotene hydroxylase gene (*crtR-B*) from the green alga *Haematococcus pluvialis* in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(4): 347-355.
- [10] JAYARAJ J, DEVLIN R, PUNJA Z. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot

- plants[J]. Transgenic Research, 2008, 17(4):489-501.
- [11] HUANG J C, ZHONG Y J, LIU J, et al. Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin[J]. Metabolic Engineering, 2013, 17(1):59-67.
- [12] 李子兴, 孙煜, 刘志学, 等. 外源 *ble* 基因在杜氏盐藻中的瞬时表达[J]. 实验生物学报, 2005, 38(5):411-416.
- [13] 李杰, 刘颖, 黄洁虹, 等. G418 和氯霉素作为转基因盐藻的抗生素筛选标记[J]. 生物技术, 2003, 13(3):22-23.
- [14] 李克锦, 唐颖, 王长海. 盐藻的无菌培养及其抗生素标记的选择[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2009, 22(2):117-121.
- [15] 王逸云, 王长海. 小球藻基因工程选择标记研究[J]. 大连理工大学学报, 2007, 47(4):509-514.
- [16] 王建沅, 周成旭, 严小军, 等. 雨生红球藻在红光下的生长及营养盐消耗特征[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6):1135-1142.
- [17] 刘卫东, 苏浩, 虞星炬. 培养基琼脂浓度及抗生素对3种海洋微藻生长的影响[J]. 生物技术, 2006, 16(6):75-77.
- [18] 张琳, 马晓磊, 朱葆华, 等. 微拟球藻抗生素抗性分析和选择标记筛选[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(4):72-76.
- [19] 肖志新, 周冀衡, 杨虹琦, 等. 转基因植物选择性标记基因[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(5):19-22.
- [20] 曹军平. 莱茵衣藻外源基因高效转化系统的建立及金藻转化方法的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2000.
- [21] ZASLAVSKAIA L A, LIPPMEIER J C, KROTH P G, et al. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes[J]. Journal of Phycology, 2000, 36(2):379-386.
- [22] 滕长英, 梁成伟, 秦松, 等. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)基因工程选择试剂的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(4):302-306.
- [23] 樊庆德, 张雪芹, 王潮岗. 雨生红球藻遗传转化试剂的筛选[J]. 广东农业科学, 2013, 40(14):154-157.
- [24] 张冬宝, 隋正红, 茅云翔, 等. 8种抗生素对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. 海洋学报, 2007, 29(2):123-130.
- [25] 王高歌, 臧晓南, 张宝红, 等. 螺旋藻对六种抗生素的敏感性研究[J]. 高技术通讯, 2001, 11(7):6-13.
- [26] 臧晓南, 张学成, 王高歌, 等. 节旋藻和螺旋藻对7种抗生素敏感性的比较研究[J]. 海洋学报, 2004, 26(3):82-92.
- [27] 黄振华, 刘晓娟, 胡章喜, 等. 湛江等鞭金藻对抗生素的反应及无菌化培养[J]. 生态科学, 2007, 26(2):120-121.
- [28] 王明兹, 施巧琴, 庄惠如, 等. 紫球藻对抗生素的生物学效应[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2004, 20(3):59-62.
- [29] RUHLMAN T, VERMA D, SAMSON N, et al. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression[J]. Plant Physiology, 2010, 152(4):2088-2104.
- [30] 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.
- [31] 林丽春, 江佳瑜, 侯赛男, 等. 龙须菜的无菌处理及其典型附生菌的分离鉴定[J]. 宁波大学学报(理工版), 2017, 30(2):15-21.
- [32] 屈建航. 5种绿藻对几种常用抗生素的敏感性[J]. 大连工业大学学报, 2004, 23(2):111-113.
- [33] 王镜岩. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002:544.

Study of the sensitivity of *Haematococcus pluvialis* to four antibiotics

LI Yan-guo^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2*}, YANG Liu^{1,2}, HUANG Yi-li^{1,2}, XU Nian-jun^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Establishment of genetic transformation system is based on the sensitivity of algae to antibiotics. The current study investigated the optimal agar concentration for *Haematococcus pluvialis* growth. The sensitivities of four kinds of antibiotics were respectively determined in solid and liquid mediums. The results showed that the most optimal agar concentration for *H. pluvialis* growth was 0.8%. At the experimental concentration, Gentamicin and Zeocin showed the strongest inhibitory effects on *H. pluvialis*, which could serve as the selective antibiotics in transformation system at 5 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Chloramphenicol can be used to purify algae, due to its lowest inhibition to *H. pluvialis*. In the presence of the different effects of antibiotics in solid and liquid mediums, appropriate antibiotic concentration should be chosen for research or application of *H. pluvialis*.

Key words: *Haematococcus pluvialis*; genetic transformation; agar concentration; antibiotics

(责任编辑 史小丽)