

浒苔原生质体再生苗对草丁膦与 6 种抗生素的敏感性

吴春辉^{1,2}, 王 峰³, 赵 瑾¹, 刘晓杰^{1,2}, 姜 鹏¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青岛大学 生命科学学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 浒苔(*Ulva prolifera*)是构成黄海绿潮的优势种, 通过构建浒苔稳定转化系统, 可以为相关基因功能验证提供有力工具。本文以浒苔原生质体再生苗为材料, 试验了对除草剂草丁膦和 6 种抗生素的敏感性, 发现浒苔对氯苄青霉素、卡那霉素、硫酸链霉素、Zeocin 4 种抗生素不敏感, 对氯霉素、潮霉素较敏感, 对除草剂草丁膦极为敏感, 进一步统计得出草丁膦对浒苔的半致死剂量(LD₅₀)和 95%可信限, 发现敏感性与光周期明显相关。上述结果为进一步筛选转化子、构建浒苔稳定转化系统打下了基础。

关键词: 浒苔(*Ulva prolifera*); 基因工程; 草丁膦; 抗生素; 敏感性; 光周期

中图分类号: S917.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)08-0001-06

doi: 10.11759/hyqx20140423003

自 2007 年起, 黄海海域连年春夏季暴发大规模绿潮, 遗传分析发现, 尽管附近海区定生的石莼属绿藻具有一定的物种多样性, 绿潮早期也存在物种演替的过程, 但暴发的漂浮藻优势种均为浒苔(*Ulva prolifera*)^[1-2], 提示浒苔的生物学特性与其暴发成灾具有明显的关联。

目前, 围绕浒苔(*U. prolifera*)的光合作用、营养吸收、繁殖发育已开展相关的比较研究, 从不同角度针对成灾的生物学基础提出了假设^[3-5], 也获得了大量基因序列并初步注释了功能^[6-7], 亟待建立个体水平基因功能验证的有效方法。建立浒苔遗传转化与稳定表达技术, 可为相关研究提供有力工具, 同时, 也可构建浒苔重组蛋白高效表达系统奠定基础, 发挥浒苔生长速度快、蛋白质含量高的优势^[8]。

在近缘物种长石莼中已报道绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的瞬间表达^[9], 但要实现稳定转化, 还需通过敏感性实验, 确定有效的选择标记和筛选流程, 以指导阳性转化子的筛选。目前大型海藻选择标记的研究已有较多报道^[10-12], 总体上对选择试剂的敏感性与适合剂量和陆生植物差异显著; 另外, 海藻的组织再生方式更加多样, 可施加筛选的生活史阶段包括各种类型的孢子、组织切块、愈伤组织、以及各种幼苗(来自受精发育、孤雌生殖、单性生殖、原生质体再生等), 不同阶段的敏感性表现也存在明显差异。因此, 针对同一门类的不同物种、同一物种的特定受体类型, 需要系统开展有针对

性的敏感性试验。

在条浒苔(*U. clathrata*)中曾针对孢子和孢子萌发幼苗两个阶段, 简单比较了对氯霉素和草丁膦的敏感性差异^[13]。由于石莼属绿藻原生质体的制备与再生方法非常成熟且高效^[14], 因此, 利用原生质体介导遗传转化, 在再生苗阶段进行筛选应是更加可行的路线。

作者以黄海绿潮优势种浒苔(*U. prolifera*)为材料, 通过制备原生质体, 并以再生苗为材料, 全面比较其对除草剂草丁膦和 6 种抗生素的敏感性, 计算并检验半致死剂量, 以期对浒苔基因工程选择标记的建立提供必要的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

浒苔样品于 2007 年 7 月采自山东青岛海域, 藻体经消毒海水冲洗 3~4 遍, 置于 VSE 培养液中暂养^[15]。参照 Lin 等^[16]的方法, 利用 ITS、5S 间隔区序列对个

收稿日期: 2014-11-22; 修回日期: 2015-02-10

基金项目: 中国科学院海洋战略性先导科技专项(XDA11020304); 国家 863 计划资助项目(2014AA093501); 国家自然科学基金项目(31300-365); 海洋公益项目(201205010); 山东省博士基金项目(2010BSB02009)

作者简介: 吴春辉(1988-), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 藻类生物技术, 电话: 0532-82898864, E-mail: w327420781@126.com; 姜鹏, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898865, E-mail: jiangpeng@qdio.ac.cn

体进行分子鉴定, 将获得的浒苔(*U. prolifera*)漂浮群体单藻株在光强 1500 lx、温度 15°C、光周期 12L:12D 条件下营养增殖, 实验所用材料均来自同一藻株。按照 Reddy 等的方法制备浒苔原生质体^[14], 并在光强 750 lx、温度 20°C、光周期 12L:12D 条件下诱导再生, 待幼苗苗长约 0.5 cm 时用于敏感性实验。

1.1.2 试剂

6 种抗生素分别为氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素(三者均为 MDBio 产品)、硫酸链霉素(Amresco 产品)、Zeocin(Solarbio 产品)、潮霉素 B(Solarbio 产品), 除草剂为 Basta(西安罗森伯科技有限公司产品, 含 20%草丁膦)。配制的抗生素母液质量浓度为: 氨苄青霉素 100 g/L、卡那霉素 50 g/L、氯霉素 34 g/L(无水乙醇配制)、硫酸链霉素 10 g/L、Zeocin 100 g/L、潮霉素 B 100 g/L, 除草剂草丁膦母液质量浓度为 20 g/L。配制好的抗生素及草丁膦母液过滤除菌后保存备用。

1.2 方法

1.2.1 选择试剂的初筛

使用直径 3.5 cm 的培养皿进行敏感性实验, 每个培养皿中加入 3 mL VSE 培养液、20 株 0.5 cm 长的原生质体再生苗、以及相应的选择试剂母液(参照文献[10, 12-13, 18]设置终浓度, 见表 1)。因 Zeocin 对光敏感, Zeocin 处理组进行遮光培养。每隔 12 h 镜检观察并统计各组藻体的死亡情况。培养液每周更换一次。

表 1 培养液中选择试剂的终质量浓度

Tab.1 Concentration of selective reagents in culture media

试剂	终质量浓度(μg/mL)				
	1	2	3	4	5
氯霉素	0	100	200	500	1000
潮霉素	0	100	200	500	1000
氨苄青霉素	0	100	200	500	1000
卡那霉素	0	100	200	500	1000
硫酸链霉素	0	100	200	500	1000
Zeocin	0	100	200	500	1000
草丁膦	0	10	20	50	100

1.2.2 草丁膦的半致死剂量(LD₅₀)及 95%可信限的计算

由于浒苔体细胞具有突出的全能性, 几乎每个体细胞都有发育成新植株的能力^[27], 因此, 本文以

细胞白化作为细胞死亡标准, 以细胞死亡率代替个体死亡率统计浒苔原生质体再生苗的死亡率。具体方法是, 每隔 12 h 对所有藻体进行拍照, 使用图像分析软件计算幼苗白化部分所占比例, 得出每株幼苗的细胞死亡率, 然后计算每个处理组 20 株幼苗的平均死亡率, 其计算公式为:

$$\text{平均死亡率}(\%) = (\Sigma \text{白化部分面积} / \text{幼苗总面积}) / 20 \times 100\%$$

在草丁膦敏感性实验初筛的基础上, 根据寇氏法(Karber)等比设置各组草丁膦的剂量(表 2), 共设置暗周期 0 h 起始、光周期 0 h 起始 2 个实验组, 每隔 12 h 镜检观察各组藻体的死亡情况, 并计算死亡率。寇氏法计算草丁膦对浒苔原生质体再生苗的半致死浓度(LD₅₀)及 95%可信限^[17], 计算公式为:

$$\lg LD_{50} = X_m - i(\Sigma P - 0.5)$$

式中, X_m 为最大剂量的对数值; i 为相邻剂量比值的对数; ΣP 为各实验组浒苔原生质体再生苗死亡率的总和(以小数表示)。

$$\lg N = \lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}$$

式中, N 为 LD₅₀ 的 95%可信限; $S_{\lg LD_{50}} = i[\Sigma pq/n]^{1/2}$, p 为一个组的死亡率; q 为一个组的存活率; n 为各组浒苔原生质体再生苗的数目。

1.2.3 LD₅₀ 差异的显著性检验

通过计算 $K_{i,j}/f_{i,j}$ 比值, 判断两个相邻处理时间周期的 LD₅₀ 是否具有显著性差异。如果 $K_{i,j}/f_{i,j} > 1$, 则表示两个 LD₅₀ 差异显著。其中:

$$K_{i,j} = \text{相邻两组中较大的 LD}_{50} \text{ 值} / \text{较小的 LD}_{50} \text{ 值}$$

f 为 LD₅₀ 的 95%可信限因子(可信限两端的值分别为 LD₅₀× f 和 LD₅₀/ f)。

$$f_{i,j} = \text{antilog}[(\lg f_i)^2 + (\lg f_j)^2]^{1/2}$$

2 结果

2.1 初筛结果

初筛结果发现, 浒苔原生质体再生苗对氨苄青霉素、卡那霉素、硫酸链霉素、Zeocin 4 种抗生素不敏感, 即使最高剂量组(1000 μg/mL)培养 2 周后仍未见死亡且生长明显, 与对照组无差别, 说明上述试剂不适合作为浒苔遗传转化的选择压力。

此外, 还发现再生苗对潮霉素、氯霉素表现出一定的敏感性。在潮霉素最高剂量组(1000 μg/mL), 再生苗第 3 天停止生长, 第 4 天开始死亡, 第 6 天全部死亡; 500 μg/mL 组, 再生苗第 4 天开始死亡, 第 8 天全部死亡; 100 μg/mL 和 200 μg/mL 组在两周后与

对照组基本无差别,死亡率为0。在氯霉素最高剂量组(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$),再生苗第3天停止生长并开始由绿变黄,第6天全部白化死亡;500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,再生苗第4天开始死亡,第9天全部死亡;100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组在第8天开始死亡,两周后全部死亡。同时,发现再生苗对草丁膦极为敏感,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组在24 h内就会使幼苗明显白化死亡,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组几乎在24 h内全部死亡。

在潮霉素或氯霉素压力下,幼苗死亡时所有细胞表现同步性,先变成黄绿色,最后逐渐全部白化;而在草丁膦压力下,白化均从幼苗顶端起始,之后向下逐渐延伸到基部,因此,在后续草丁膦敏感性试验中,根据白化面积占比统计死亡率。

2.2 浒苔对草丁膦的敏感性

表2为暗起始与光起始组浒苔原生质体再生苗在不同剂量草丁膦压力下培养不同时间后的死亡率,可以看出,随着草丁膦剂量增加和筛选时间的延长,两组的死亡率均迅速升高。24 h后,46.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的两组基本完全白化,与初筛结果一致;即使较低剂量组(12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),60 h后死亡率均超过75%,说明浒苔原生质体再生苗对草丁膦极为敏感。

2.3 光周期对草丁膦敏感性的影响

为了比较光周期对敏感性的影响,设置了暗起始、光起始两个实验组。表2可见,暗起始各组在12 h的死亡率均为0,且光周期内死亡率的增加率在低剂量组显著高于相邻的暗周期,表现明显的光偶联,在高剂量组,由于死亡率迅速达到高值,表现则不明显。而在光起始各组,未观察到明显的光偶联规律。

表2还统计了暗起始与光起始组不同筛选周期下的草丁膦半致死剂量(LD_{50})及其95%可信限、以及相邻组差异的显著性分析。图1为暗起始与光起始组的草丁膦敏感性曲线。结果显示,在快筛(12 h、24 h、36 h)条件下,暗起始组的草丁膦 LD_{50} 高于光起始组,且两组内相邻组间 LD_{50} 均呈显著差异;而在慢筛(48 h、60 h)条件下,暗起始组的草丁膦 LD_{50} 低于光起始组,且两组内48~60 h两组间的 LD_{50} 差异均不显著。

另外,从图1可见,暗起始组曲线斜率在光周期(36~48 h)明显小于相邻暗周期(24~36 h, 48~60 h),这与表2一致,说明 LD_{50} 的变化与光偶联,同样,光起始组则未表现上述规律。

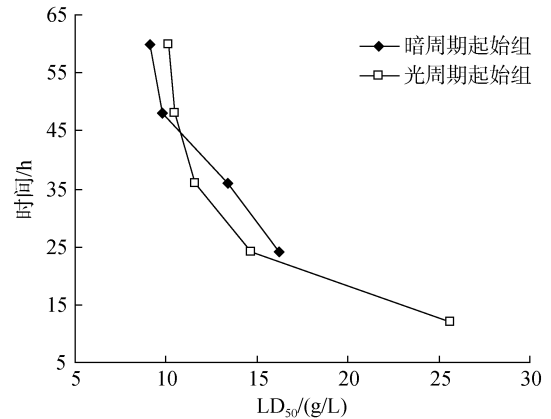


图1 浒苔原生质体再生苗对草丁膦的敏感性曲线
Fig.1 Phosphinothricin sensitivity curve of protoplast-regenerated seedling of *U. prolifera*

3 讨论

筛选试剂的选择以及 LD_{50} 的测定对于获得转化子、构建稳定表达系统至关重要,藻类对筛选试剂的敏感性研究已普遍开展,目前共试验约15种抗生素与除草剂。总体上,藻类对抗生素的敏感性与高等植物存在显著区别,对高等植物基因工程常用的卡那霉素、G-418、新霉素等均不敏感,推测原因可能来自二者在抗生素作用靶点与代谢途径的巨大差异^[18]。

尽管红藻、褐藻、硅藻、单细胞与大型绿藻等在敏感性上也存在明显区别,但其共性在于,大部分对除草剂草丁膦非常敏感^[13, 18-21],对氯霉素较为敏感^[11, 13, 21-23],作者试验发现,浒苔原生质体再生苗也符合这个规律,但与分类上同为一个属的条浒苔(*U. clathrata*)孢子和孢子萌发幼苗的结果相比,浒苔对草丁膦更加敏感,在46.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下24 h死亡率即超过90%,而条浒苔仅为30%^[13]。说明针对特定物种的特定阶段,开展有针对性的敏感性试验十分必要。

藻类材料对选择试剂敏感性的相关性研究可为筛选流程的确立提供重要参考。针对海带孤雌生殖幼苗,李新萍报导其苗长与氯霉素 LD_{50} 相关、与潮霉素 LD_{50} 则不相关^[23],吴韵发现苗长与高敏感性试剂草丁膦 LD_{50} 也不相关^[10]。针对海带配子体,张亦陈发现草丁膦 LD_{50} 与筛选温度显著相关,建议筛选时提高温度以缩短周期^[20]。

由于浒苔原生质体制备与再生过程的温度、光强等条件参数已经过优化^[14],而且初筛发现再生苗对草丁膦极为敏感,无需进一步缩短筛选周期。因此,

表 2 草丁膦对浒苔原生质体再生苗 LD₅₀ 的 95% 可信限统计及差异的显著性分析
 Tab.2 95% confidence range and variation significance analysis of phosphinothricin LD₅₀ to protoplast-regenerated seedling of *U. prolifera*

组别	时间(h)	不同剂量草丁膦(μg/mL)中浒苔原生质体再生苗的死亡率(%)										LD ₅₀ (μg/mL)	95%可信限 (μg/mL)	作用时间相邻组间差异显著性分析(K _i /f _i)					
		0	5.7	7.4	9.6	12.5	16.3	21.2	27.6	35.8	46.5			12-24h	24-36h	36-48h	48-60h		
D	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	24	0	6.54	7.32	12.04	37.13	59.95	68.29	81.22	88.82	92.81	16.19	14.25-18.40		1.008				
	36	0	8.42	14.40	26.78	46.23	71.86	82.64	87.92	92.62	95.34	13.42	11.83-15.22		1.161				
	48	0	20.24	31.02	42.05	74.13	88.23	94.67	97.86	100	100	9.76	8.71-10.93						0.915
	60	0	20.88	32.08	46.19	81.75	94.25	98.12	100	100	100	9.14	8.22-10.16						
L	12	0	2.95	8.40	9.85	16.22	19.09	27.08	47.60	75.73	86.31	25.65	21.71-27.98		1.498				
	24	0	8.75	15.03	19.15	41.90	62.49	77.63	82.98	89.69	95	14.65	12.86-16.68		1.061				
	36	0	11.38	20.13	22.35	66.03	78.88	88.88	95.75	97.81	100	11.62	10.37-13.02						0.946
	48	0	16.83	25.55	28.70	75.42	83.61	94.50	96.25	100	100	10.48	9.38-11.71						0.887
	60	0	17.13	28.33	31.80	75.65	84.08	97.33	100	100	10.12	9.07-11.28							

注: D 为暗起始组, L 为光起始组

本研究考察了光周期对浒苔草丁膦敏感性的影响。通过分别设置光、暗周期起始组,并将镜检统计时间与光暗周期的切换同步,发现暗起始组再生苗死亡率的升高与光周期存在明显的相关性。谷氨酰氨合成酶(glutamine synthetase, GS)是调节氮代谢的关键酶,草丁膦是GS的竞争性抑制剂,它通过阻止氨的同化、干扰氮代谢,从而导致氨的积累、光合作用停止并破坏叶绿体结构。推测由于氨同化过程与光合作用偶联^[24-25],导致浒苔中氨积累致死主要发生在光周期阶段。然而,光起始组未见明显上述规律,其机理有待深入研究。

研究还发现,在快筛条件下,暗起始组的草丁膦LD₅₀高于光起始组;而在慢筛条件下,正好相反。因此,一定时间周期的LD₅₀与筛选起始时间(0 h)的设定显著相关。上述认识对于设定浒苔的筛选流程具有明显指导作用,但有必要在其它藻类材料中进一步验证。

作者以浒苔原生质体再生苗为材料,通过对除草剂草丁膦和6种抗生素的敏感性试验,发现再生苗对草丁膦极为敏感,且敏感性与光周期明显相关,统计得出草丁膦对浒苔的LD₅₀,上述结果可用于构建浒苔(*U. prolifera*)稳定转化系统。

参考文献:

- [1] Zhao J, Jiang P, Liu Z Y, et al. The Yellow Sea green tides were dominated by one species, *Ulva* (*Enteromorpha*) *prolifera*, from 2007 to 2011[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(19): 2298-2302.
- [2] Huo Y Z, Zhang J H, Chen L P, et al. Green algae blooms caused by *Ulva prolifera* in the southern Yellow Sea: Identification of the original bloom location and evaluation of biological processes occurring during the early northward floating period[J]. Limnol Oceanogr, 2013, 58(6): 2206-2218.
- [3] Xu J F, Fan X, Zhang X W, et al. Evidence of coexistence of C3 and C4 photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *Ulva prolifera*[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37438.
- [4] Luo M B, Liu F, Xu Z L. Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*[J]. Aquatic Botany, 2012, 100: 18-24.
- [5] 田琪琳, 任冬梅, 穆新武, 等. 黄海南部海域绿潮浒苔不同种群繁殖特性比较[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 606-608.
- [6] Niu J F, Hu H Y, Hu S N, et al. Analysis of expressed sequence tags from the *Ulva prolifera* (Chlorophyta)[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2010, 28(1): 26-36.
- [7] Jia S G, Wang X M, Liu G M, et al. Gene expression analysis of "green tide" alga *Ulva prolifera* (Chlorophyta) in China[J]. Genes & Genomics, 2011, 33: 173-178.
- [8] Liu F, Pang S J, Xu N, et al. *Ulva* diversity in the Yellow Sea during the large-scale green algal blooms in 2008-2009[J]. Phycological Research, 2010, 58: 270-279.
- [9] 何建华, 汤文仲, 叶静, 等. 绿色荧光蛋白(ZsGreen)基因在长石莼细胞中的表达[J]. 生物技术通报, 2011, 9: 114-119.
- [10] 吴韵, 邹立红, 姜鹏, 等. 孤雌生殖海带对草丁膦的敏感性[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(1): 19-22.
- [11] 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.
- [12] 于道展, 杨玲玲, 姜鹏, 等. 裙带菜基因工程选择标记的研究[J]. 高技术通讯, 2003, 13(6): 74-77.
- [13] 叶静, 张喆, 李富超, 等. 大型绿藻浒苔转化表达系统选择标记的筛选[J]. 生物技术通报, 2006, 3: 63-67.
- [14] Reddy C R K, Dipakkore S, Kumar G R, et al. An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplasts as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae[J]. Aquaculture, 2006, 260: 290-297.
- [15] von Stosch H A. Wirkungen von Jod und Arsenit auf Meeresalgen in Kultur[J]. Proc int Seaweed Symp, 1964, 4: 142-150.
- [16] Lin H Z, Jiang P, Zhang J X, et al. Genetic and marine cyclonic eddy analyses on the largest macroalgal bloom in the world[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(14): 5996-6002.
- [17] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学[M]. 天津: 天津大学出版社. 1993: 257-258.
- [18] 滕长英, 梁成伟, 秦松, 等. 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)基因工程选择标记的筛选[J]. 海洋与湖沼,

- 2005, 36(4): 302-305.
- [19] Cui Y L, Jiang P, Wang J F, et al. Genetic transformation of *Platymonas (Tetraselmis) subcordiformis* (Prasinophyceae, Chlorophyta) using particle bombardment and glass-bead agitation[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2012, 30(3): 471-475.
- [20] 张亦陈, 高江涛, 张喆, 等. 裙带菜配子体基因工程选择标记的研究[J]. *海洋科学*, 2007, 31(12): 64-68.
- [21] 卞曙光, 姜鹏, 崔玉琳, 等. 除草剂草丁膦抗性基因 *bar* 作为三角褐指藻基因工程选择标记的研究[J]. *海洋科学*, 2010, 34(5): 62-66, 78.
- [22] 耿德贵, 王义琴, 李文彬, 等. 杜氏盐藻基因工程选择标记的研究[J]. *生物技术*, 2001, 11(5): 1-3.
- [23] 李新萍, 秦松, 曾呈奎. 孤雌生殖海带对氯霉素和潮霉素的敏感性研究[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(2): 186-190.
- [24] 田纪春, 王学臣, 刘广田. 植物的光合作用与光合氮、碳代谢的耦联及调节[J]. *生命科学*, 2001, 13(4): 145-147.
- [25] Köcher H. Influence of the light factor on physiological effects of the herbicide Hoe 39866[J]. *Aspects Appl Biol*, 1983, 4: 227-234.
- [26] Zhang Y C, Jiang P, Gao J T, et al. Recombinant expression of *rt-PA* gene (encoding Reteylase) in gametophytes of the seaweed *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta)[J]. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2008, 51(12): 1116-1120.
- [27] Lin A P, Shen S D, Wang J W, et al. Reproduction Diversity of *Enteromorpha prolifera*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(5): 622-629.

Sensitivity of protoplast-regenerated seedling of *Ulva prolifera* to phosphinothricin and six kinds of antibiotics

WU Chun-hui^{1, 2}, WANG Feng³, ZHAO Jin¹, LIU Xiao-jie^{1, 2}, JIANG Peng¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. College of Life Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Received: Nov., 22, 2014

Key words: *Ulva prolifera*; genetic engineering; phosphinothricin; antibiotics; sensitivity; photoperiod

Abstract: *Ulva prolifera* is the dominant species of green tides in the Yellow Sea, which can accumulate a large amount of biomass in a short period. Establishing the genetic transformation system of *U. prolifera* can provide a powerful tool for verifying the function of related genes. In this paper, the sensitivity of protoplast-regenerated seedling of *U. prolifera* to phosphinothricin and six kinds of antibiotics was tested. Results showed that seedlings were not sensitive to ampicillin, kanamycin, streptomycin sulphate and zeocin, weakly sensitive to chloramphenicol and hygromycin, but very sensitive to phosphinothricin. Moreover, the sensitivity to phosphinothricin was significantly correlated with photoperiod. The LD₅₀ and 95% confidence range of phosphinothricin were calculated. These results can lay basis for screening transformants and establishing the genetic transformation system of *U. prolifera*.

(本文编辑: 梁德海)