

^{60}Co - γ 射线对条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)的诱变效果与色素突变体分离*

严兴洪 张淑娟 黄林彬

(上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306)

提要 用 ^{60}Co - γ 射线辐照处理野生型条斑紫菜的壳孢子萌发体以获得色素变异细胞, 随后用酶解法获得单离的变异细胞进行个体再生培养, 从中分离出不同的条斑紫菜色素突变体。结果表明, 叶状体经剂量分别为 100、300、500、700 和 900Gy 的 γ 射线辐照后再培养 1 周, 均出现了多种色素变异细胞, 随后, 它们逐渐分裂成为变异细胞块。在 0—500Gy 辐照剂量范围内, 色素变异细胞块的百分率随着辐照剂量的增加而增加, 但增至 700Gy 时, 变异细胞块的百分率反而下降, 说明 500Gy 是最合适的剂量。从单离变异细胞的再生叶状体中分离出桔红、紫红、桔黄和墨绿等颜色的单色变异体, 并获得了它们的丝状体纯系。各变异品系的 F_1 叶状体均为单色, 其颜色与各自的母本叶状体相同, 表明它们是稳定突变体。各色素突变品系的叶状体活体吸收光谱不仅与野生型品系有明显的差异, 而且各突变品系之间也存在较大的差异。

关键词 条斑紫菜, 叶状体, ^{60}Co - γ 射线, 色素突变体, 活体吸收光谱

中图分类号 Q789

条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda)是中国、日本、韩国的主要栽培品种(马家海等, 1996), 在我国, 条斑紫菜的年产量占全国紫菜年产量的 25%左右。在条斑紫菜的生活史中有微型的丝状体和大型的叶状体两个阶段, 叶状体为雌雄同体, 被大规模养殖, 供食用。条斑紫菜的叶状体含三种主要的光合色素, 即叶绿素 *a*、藻红蛋白和藻蓝蛋白, 它们的含量和相互之比决定了叶状体的色彩和商品紫菜饼的质量好坏(Saitou *et al*, 1975; Aruga, 1980; Aruga *et al*, 1984)。所以, 紫菜色素突变体不仅对紫菜的遗传学、生理学、生物技术等基础研究很重要, 而且对优良品种的培育均有重要意义。

20 世纪 70 年代, 日本紫菜学者首次获得了条斑

紫菜的天然色素突变体, 并对它们进行了一系列的遗传和生理学研究(Miura, 1978)。另外, 他们还通过不同色素突变体之间的杂交, 获得了有栽培价值的新品种(Miura *et al*, 1989)。随后, 各国紫菜研究者相继利用人工诱变进行了紫菜人工色素突变体的分离(Katayama, 1983; Yan *et al*, 1992), 其中利用化学诱变剂如二硝基胍(MNNG)、秋水仙碱等, 分别获得了条斑紫菜的多种人工色素突变体和其它突变体(许璞, 1997¹⁾; Yan, 1997²⁾; Yan *et al*, 1997, 2000, 2004; Wang *et al*, 2000; 王金峰等, 2007)。另外, 物理诱变如紫外线(戴继勋等, 1990; 严兴洪, 1992)和 γ -射线(匡梅等, 1997; Wang *et al*, 2000; 严兴洪等, 2003; 纪德华等, 2005)辐照处理, 也可以使紫菜的细胞产生变异, 在坛紫菜中利用 γ -射线诱变已分离出多种人工色素突

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助, 2006AA10A413 号; 国家自然科学基金资助项目, 30571443 号; 上海市优秀学科带头人项目, 07XD14028 号; 上海市自然科学基金资助项目, 05RZ14110 号; 上海市教委重点学科建设项目, J50701 号。通讯作者: 严兴洪, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: xhyan@shou.edu.cn

1) 许 璞, 1997. 紫菜色素突变体诱导与遗传特征. 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 14—81

2) Yan X H, 1997. Induction, isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). Ph.D thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, 1—101

收稿日期: 2007-10-29, 收修改稿日期: 2007-12-16

变体(严兴洪等, 2005; 李琳等, 2006), 但关于利用 γ -射线辐照处理获得条斑紫菜色素突变体的成功报道还较少。本文旨在利用 γ -射线辐照处理条斑紫菜, 以获得具有不同遗传变异的人工色素突变体, 用于今后的遗传和育种等研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验中所用野生型条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda), 株名为 U-511。该株采自条斑紫菜的养殖群体, 以自由丝状体的方式保存在室内 20 多年, 保存和培养方法同 Kato 等(1984), 培养液用自然海水加 MES 培养基配成(王素娟等, 1986)。

1.2 条斑紫菜叶状体的培养

取适量的自由丝状体进行充气培养以促进壳孢子囊成熟和壳孢子放散, 同时, 在瓶内放入 4—6 根尼龙单丝(长 3—4cm)供壳孢子附着, 培养条件: 温度 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照密度 $30\text{—}50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 明暗周期 10L: 14D。当壳孢子苗附着在尼龙线上后, 将已附苗的尼龙线转移到 500ml 的充气瓶内充气培养, 将光照密度增至 $90 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 其它条件同 Yan 等(1997)。

1.3 叶状体的诱变处理及突变体分离

选择日龄约 60d 的壳孢子萌发体(长约 5cm)用于人工诱变处理, 诱变源为 ^{60}Co , 辐照剂量分别为 100、300、500、700 和 900Gy。辐照后培养 4 周, 每组随机取 3 棵叶状体进行色素变异细胞块的统计, 从叶状体的梢部到基部每隔 2cm 检查 20 个视野($\times 20$)内的色素变异细胞块数。辐照处理后再培养 4 周左右, 选色素变异细胞多的叶状体进行酶解以获得单离细胞, 进行个体再生培养, 培养方法同于 Yan 等(1997)。培养 4 周后, 从细胞再生体中挑出单色的变异体进行单

株培养。当变异体达到 1cm 左右时, 再将其移至 500ml 的培养瓶内进行充气培养, 培养温度为 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照密度为 $90 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。数周后, 叶状体被转移至 1000ml 培养瓶中培养, 培养条件同上, 直至叶状体成熟。从成熟叶状体获得的果孢子, 被培养成自由丝状体(品系)予以保存。

1.4 色素突变体的活体吸收光谱测定

活体吸收光谱测定的测定方法同 Yan 等(1997)。

2 结果

2.1 诱变和色素变异

不同剂量的 γ -射线照射, 均导致了条斑紫菜叶状体的部分细胞死亡。照射后再培养 1 周, 细胞颜色变淡, 但随着培养时间的延长, 一部分颜色变淡的细胞又慢慢地恢复正常颜色, 开始细胞分裂, 但部分细胞一直保持很淡的颜色, 不死也不分裂; 还有一部分细胞则发白死去。在 0—500Gy 范围内, 细胞成活率高达 90%以上, 当辐照剂量进一步增至 700Gy, 细胞成活率降到了 62.8%, 到 900Gy 时, 细胞成活率下降至 46.9%。辐射过的叶状体再培养 1 周左右, 其颜色比未辐照过的叶状体更深, 并出现了少数色彩发生明显变异的细胞。随着培养时间的延长, 变异细胞逐渐分裂形成不同颜色的色素变异细胞块, 色素变异细胞块与野生型细胞有较清晰的界限, 在显微镜下很容易识别。如表 1 所示, 变异细胞块的主要颜色有桔红、桔黄、紫红、红紫、黄绿、墨绿等。桔红色变异细胞块出现频率最高, 其次是桔黄色细胞块, 浅灰色细胞块较低, 绿色细胞块最低。辐射组的叶状体上均出现了色素变异细胞块, 而对照组叶状体上未出现色素变异细胞块, 这说明色素变异细胞块是由于 ^{60}Co - γ 射线辐射诱导引起的。如表 1 所示, 在 0—

表 1 经 γ -射线辐照过的条斑紫菜叶状体培养 28 天后出现的色素变异细胞块

Tab.1 Color-mutated cell-clusters appeared in the blades of *P. yezoensis* irradiated by γ -ray and cultured for 28 days

剂量组 (Gy)	色素变异细胞块的种类和数目/视野($\times 20$ 倍)											合计 (块)
	桔红	浅红	桔黄	浅黄	红紫	紫红	橄榄	绿色	黄绿	灰褐	浅灰	
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
100	1.6	0.7	1.0	0.3	0.2	0.2	1.0	0.0	0.7	0.4	0.7	6.8
300	3.1	2.1	2.9	1.0	0.4	2.0	1.2	0.1	1.6	0.6	1.0	16
500	7.1	3.0	6.7	4.1	1.3	5.4	3.7	0.3	4.7	1.0	1.5	38.8
700	6.6	1.7	5.9	3.3	0.9	4.8	1.7	0.2	2.9	0.7	0.9	29.4
900	5.4	1.2	4.9	3.1	0.8	3.9	1.2	0.1	2.0	0.3	0.8	23.7
合计(块)	23.8	8.67	21.4	11.8	3.6	16.3	8.8	0.7	11.9	3.0	4.9	

500Gy 范围内, 色素变异细胞块出现的频率, 随着诱变剂量的增加而增加, 而诱变剂量超过了 500Gy 后, 则随着诱变剂量的增加, 变异细胞块数量反而减少。在同一棵叶状体上, 不同部位的细胞诱变效果不同, 0—500Gy 范围内, 在叶片的基本部、中部到梢部等三个部位, 色素变异细胞块出现的频率均随着辐照剂量的增加而增加, 尤其在细胞分裂旺盛的梢部, 其增加更加明显, 但超过 500Gy 后, 各部位的色素变异细胞块数量均随着诱变剂量的增加反而减少。

2.2 色素突变体的分离

把含色素变异细胞的叶状体利用酶解法获得大

量的单离细胞, 后者经过 2—3 个月的培养, 再生成不同颜色的色素变异体, 其种类有桔红、桔黄、紫红、黄绿、深绿等, 变异体的颜色种类基本上与母体叶状体上观察到的色素变异细胞种类一致。所获得的色素变异体绝大部分是单色, 少部分为多种颜色镶嵌的嵌合体。单色色素变异体的颜色相当稳定, 当把它们再次酶解, 分离出单个体细胞进行再生培养, 其再生体的颜色仍然是单色并与母体的颜色相同。获得的 5 种色素突变体如图 1 所示。参照色名字典(Wada, 1954), 将它们分别命名为 *row*(深红色)、*cop*(紫红色)、*fre*(浅桔黄色)、*yel*(青橄榄色)、*ggr*(绿色), 见表 2。

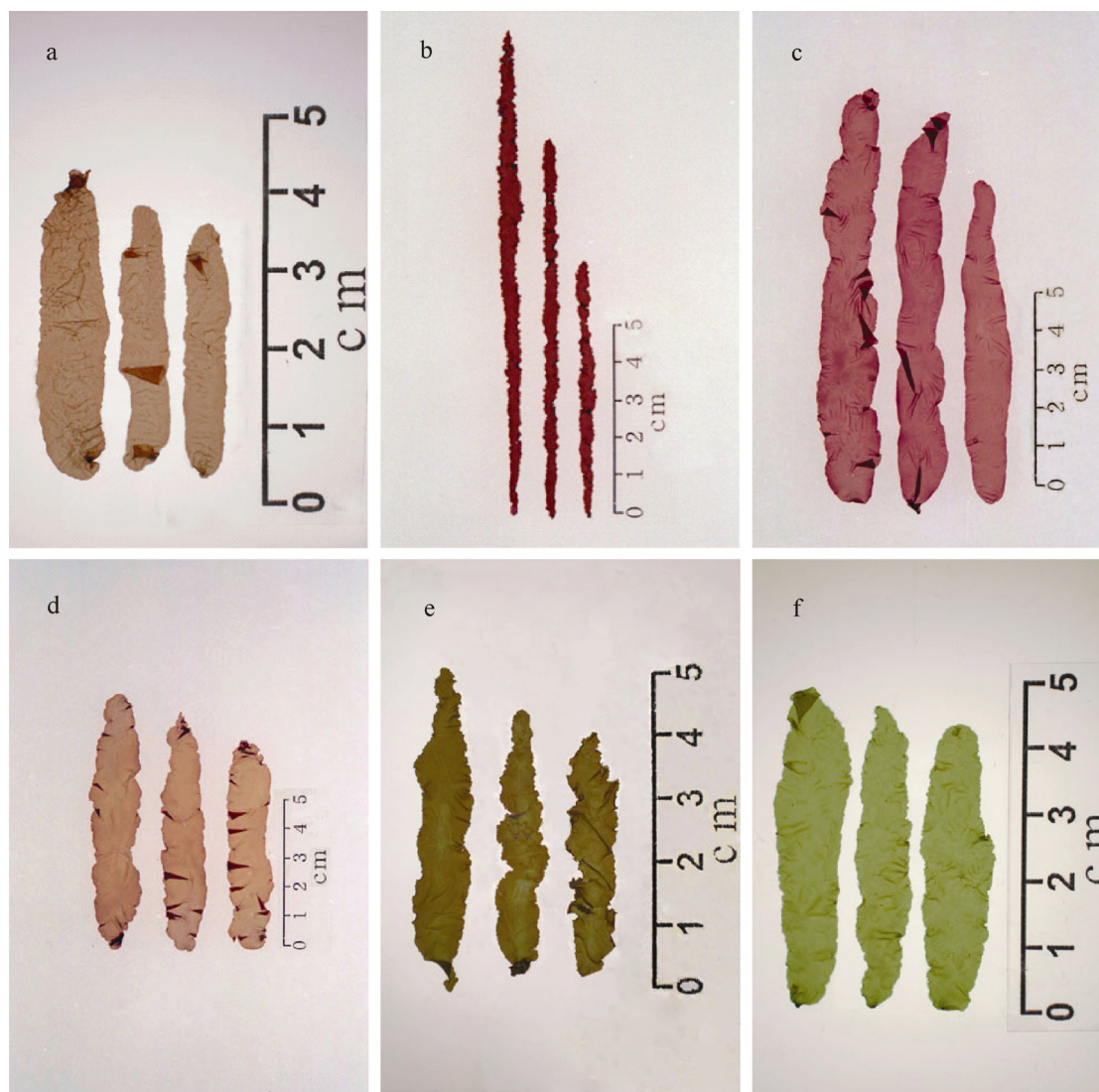


图 1 经 ^{60}Co - γ 射线辐照后获得的条斑紫菜色素突变体和野生型叶状体的体细胞再生体

Fig.1 Blades regenerated from somatic cells of wild type (*wt*) and pigmentation mutants of *P. yezoensis* obtained after treatment with irradiation of ^{60}Co - γ ray

a. 野生型叶状体 *wt*(70d); b. 深桔红色突变体 *row*(65d); c. 紫红色突变体 *cop*(65d); d. 浅桔黄色突变体 *fre*(52d); e. 青橄榄色突变体 *yel*(83d); f. 绿色突变体 *ggr*(83d)

表 2 条斑紫菜野生型和 5 种色素突变体的颜色和命名
Tab.2 Colors and names of five pigmentation mutants and wild type of *P. yezoensis*

中文株系名	Strains	Names	Colors
野生型	<i>wt</i>	Camel	Light brown
深红色突变体	<i>row</i>	Rose wood	Dark red
紫红色突变体	<i>cop</i>	Corinthian purple	Purplish red
浅桔黄色突变体	<i>fre</i>	Fire red	Red orange
青橄榄色突变体	<i>yel</i>	Oil yellow	Olive
绿色突变体	<i>ggr</i>	Grass green	Yellow green

2.3 色素突变体的 F₁ 叶状体培养与活体吸收光谱测定

利用条斑紫菜有性生殖, 从成熟的单色变异体分离到纯种的自由丝状体, 它们的颜色与各自的叶状体相同。各色素变异品系的自由丝状体经过 3—4 个月的培养, 形成大量的膨大藻丝, 最后成熟放出壳孢子。壳孢子经过 2 个月的培养, 长成 F₁ 叶状体。每个色素变异品系的 F₁ 叶状体均为单一颜色的纯色叶状体, 其颜色与各自的最初母体叶状体相同, 说明所得到的变异体是稳定的色素突变体。

野生型条斑紫菜的叶状体活体吸收光谱在波长 350—750nm 之间存在 5 个明显的吸收高峰, 从短波到长波依次被标记为 P₁、P₂、P₃、P₄ 和 P₅, P₁ 主要由 Chl-*a* 和 β -胡萝卜素, P₂ 主要由 PE 和 β -胡萝卜素, P₃ 由 PE, P₄ 由 PC, P₅ 由 Chl-*a* 的吸收所致(有贺佑胜, 1980)。图 2 和图 3 分别表示条斑紫菜野生型和 5 种色素突变体的活体吸收光谱。5 种突变体叶状体的活体吸收光谱与野生型叶状体一样, 在波长 350—750nm 之间, 均有 5 个明显的吸收高峰, 但各吸收峰的形状和各峰顶所处的波长与 *wt* 相比存在一定的差异。突变体 *row* 和 *cop* 的 5 个吸收峰均明显高于 *wt*。与 *wt* 相比, 突变体 *fre* 的各峰值差不多, 但 P₄ 峰顶向长波方向移动了约 6nm。突变体 *yel* 的 P₂、P₄ 和 P₅ 均高于 *wt*, 而 P₃ 基本与 *wt* 相同。突变体 *ggr* 的 P₂、P₃、P₄ 和 P₅ 均明显低于 *wt*, 并且 P₂ 的峰顶所处波长向短波方向移动了约 8nm。

3 讨论

3.1 诱变和色素变异

至今, 在紫菜人工色素突变体的研究中, 被使用过的诱变剂主要是化学诱变剂, 如秋水仙素、EMS、MNNG 等, 以及物理诱变剂, 如紫外线和 γ -射线。在条斑紫菜人工色素突变体的研究中, 被证明最有效的诱变剂是化学诱变剂 MNNG, 利用它分离出来了

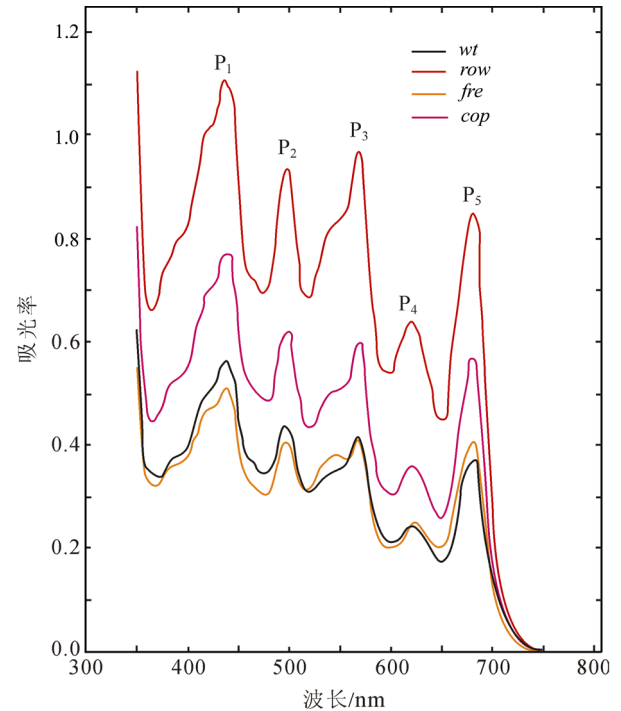


图 2 条斑紫菜色素突变体(*row*, *cop*, *fre*)和野生型的叶状体(*wt*)(日龄 80d)活体吸收光谱

Fig.2 In vivo absorption spectra of blades of pigmentation mutants (*row*, *cop* and *fre*) and the wild type (*wt*) ones after 80 days in culture

大量有用的色素突变体。本实验中使用 γ -射线辐照野生型条斑紫菜叶状体, 获得了多种类型的色素变异细胞, 且变异细胞的种类也很多, 其诱变效果非常好。在 500Gy 的辐照组, 色素变异细胞的最高百分率达 7.27%, 而王金峰等(2007)利用 MNNG 作为诱变剂所获得的条斑紫菜最大突变率为 11.2%, 暗示 γ -射线的诱变效果与 MNNG 相比可能存在一定的差异。在 0—500Gy 剂量范围内, 细胞成活率很高, 都保持在 90%以上, 但剂量增加到 700Gy 时, 细胞成活率有所下降, 增至 900Gy 时, 成活率下降更加明显; 在 0—500Gy 范围内, 色素变异细胞块出现的频率随着诱变剂量的增加而增加, 而诱变剂量超过了 500Gy 后, 随

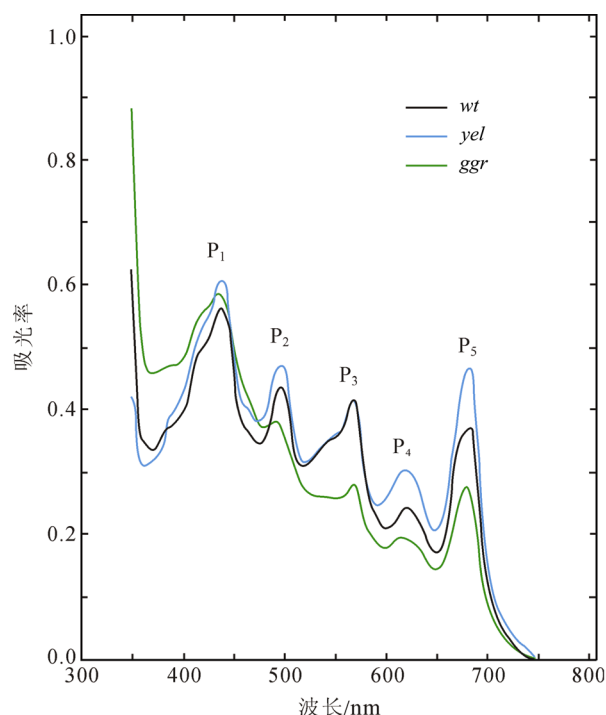


图3 条斑紫菜色素突变体(*yel*, *ggr*)和野生型的叶状体(*wt*)(日龄 80d)活体吸收光谱

Fig.3 *In vivo* absorption spectra of blades of pigmentation mutants (*yel* and *ggr*) and the wild type (*wt*) ones after 80 days in culture

着诱变剂量的增加, 变异细胞块数量反而减少, 说明 500Gy 是诱导条斑紫菜叶状体产生色素体变异的最适剂量。这一结果明显不同于使用 MNNG 诱导条斑紫菜和坛紫菜叶状体产生色素变异时, 死亡率达到 50% 左右, 才能获得最大的变异率(许璞, 1997¹⁾; 李琳等, 2006)。经 γ -射线辐照后的条斑紫菜叶状体, 培养 1 周左右, 出现了色素体颜色发生明显变异的细胞; 随着培养天数的增加, 色素变异细胞逐渐分裂并形成不同颜色的细胞块, 单个变异色块内的细胞其大小和颜色等均相同。因此, 可以认为每一个色素变异细胞块里的细胞来自同一个初始的色素变异细胞, 色素变异细胞块的百分比基本上可代表辐照处理后产生的色素变异细胞的百分比。

坛紫菜的叶状体经 γ -射线辐照后, 出现了一些色素变异细胞与野生型细胞或其它色素变异细胞呈点状嵌合排列(严兴洪等, 2005), 在本实验中也观察到这类呈点状嵌合排列的变异细胞, 但量较少。另外,

在本实验中还发现某些变异细胞发生融合的现象: 融合后的变异细胞体积明显增大, 是正常细胞的 2—3 倍, 同时细胞内的色素体有 2—3 个, 细胞无法分裂, 大约经过 1—2 周的培养, 这类大的变异细胞开始死亡, 发生这种现象的原因和机制尚不清楚, 有待进一步研究。在条斑紫菜叶状体的不同部位上, 色素变异细胞块出现的频率不同, 在梢部出现的频率最高, 中部次之, 基部最低, 这一结果与用 γ -射线辐照处理坛紫菜后产生的诱变效果很相似, 究其原因, 可能因为叶状体梢部处于分裂时期的嫩细胞较多, 老化细胞较少, 中部的嫩细胞又比基部多, 处于分裂期的嫩细胞比老化细胞更容易被诱变(严兴洪等, 2005)。

3.2 色素突变体的分离与吸收光谱测定

把含色素变异细胞的条斑紫菜叶状体酶解获得单离细胞, 后者经过 2—3 个月的体外培养, 再生成野生型叶状体和多种颜色的色素突变体, 所获得的色素突变体绝大部分是单色, 少部分为点状色彩突变体。色素突变体的颜色种类基本上与母体叶状体上观察到的色素变异细胞种类一致, 这说明获得的色素突变体来自母体叶状体上的单个变异细胞。在由 MNNG 处理获得的条斑紫菜人工色素突变体中, 也有色素变异细胞呈点状嵌合排列的色素突变体, 它们被认为是不稳定突变体(Yan, 1997²⁾)。本文中得到的少部分条斑紫菜嵌合点状色素突变体是否属于不稳定的突变体, 有待进一步证明。

在条斑紫菜的自然色素突变体中发现, 凡是吸收峰顶所处的波长发生变化的突变体, 其对应的藻胆蛋白性质发生了变化(Aruga *et al*, 1984)。本文中获得的 5 种色素突变体不仅在色彩上很不相同, 而且, 它们的叶状体活体吸收光谱也大不相同, 各突变体除了在吸收峰的高低存在明显差异外, 有的峰顶所处的波长也发生了较大的差异, 它们的藻胆蛋白性质是否发生了变化, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 马家海, 蔡守清, 1996. 条斑紫菜的栽培与加工. 北京: 科学出版社, 12—13
王金峰, 许璞, 朱建一等, 2007. 紫菜属海藻色素突变的研究. 海洋水产研究, 28(2): 28—35
王素娟, 张小平, 徐志东等, 1986. 坛紫菜营养细胞和原生质

1) 许璞, 1997. 紫菜色素突变体诱导与遗传特征. 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 14—81

2) Yan X H, 1997. Induction, isolation and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). Ph.D thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, 1—101

- 体培养的研究. 海洋与湖沼, 17(3): 217—221
- 匡 梅, 许 璞, 王素娟, 1997. γ -射线对条斑紫菜和坛紫菜诱变作用的初步研究. 上海水产大学学报, 6(4): 241—245
- 纪德华, 陈昌生, 郑伟刚等, 2005. ^{60}Co - γ 射线辐照坛紫菜叶状体及单克隆培养的研究. 台湾海峡, 24(2): 171—177
- 严兴洪, 1992. 紫外线辐射与条斑紫菜原生质体后代发育和变异. 上海水产大学学报, 1(1): 71—78
- 严兴洪, 李 琳, 陈俊华等, 2003. 坛紫菜的遗传与育种. 国家 863 计划资源环境技术领域第一届海洋生物高技术论坛论文集. 浙江舟山, 107—113
- 严兴洪, 梁志强, 宋武林等, 2005. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离. 水产学报, 29(2): 166—172
- 李 琳, 严兴洪, 2006. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析. 上海水产大学学报, 15(1): 30—35
- 戴继勋, 张全后, 包振民等, 1990. 紫菜原生质体的纯系培育、诱变处理和种间细胞融合的研究. 海洋与湖沼, 21(3): 293—297
- Aruga Y, Miura A, 1984. *In vivo* absorption spectra and pigment contents of the two types of color mutants of *Porphyra*. Jap J Phycol, 32: 243—250
- Aruga Y, 1980. Color and the pigments of *Porphyra yezoensis*. Iden, 34: 8—13
- Katayama K, 1983. Studies of mutations of *Porphyra*. I. Employment of some chemical mutagens. Bull Fish Res Stn Okayama Pref, 57: 51—57
- Kato M, Aruge Y, 1984. Comparative studies on the growth and photosynthesis of the pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* in laboratory culture. Jap J Phycol, 32: 333—347
- Miura A, 1978. Color variants and heredity of color in *Porphyra*. Iden, 32: 11—16
- Miura A, Shin J A, 1989. Cross breeding in cultivars of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). A preliminary report. Korean J Phycol, 4: 207—211
- Saitou M, Araki S, Sakurai T *et al*, 1975. Variations in contents of the photosynthetic pigments, total nitrogen, total free amino acids and total free sugars in dried lavers obtained at different culture grounds and harvesting times. Bull Jap Soc Sci Fish, 41(3): 365—370
- Wada S, 1954. Dictionary of color names. Tokyo Sogensha, Tokyo, 1—139
- Wang S J, Zheng Y Z, Ma L B *et al*, 2000. Gamma-Rays induction of mutation in conchocelis of *Porphyra yezoensis*. Chin J Ocean Limnol, 18(1): 47—53
- Yan X H, Aruga Y, 1997. Induction of pigmentation mutants by treatment of monospore germlings with MNNG in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). Algae, 12(1): 39—54
- Yan X H, Fujita Y, Aruga Y, 2000. Induction and characterization of pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). J Appl Phycol, 12: 69—81
- Yan X H, Fujita Y, Aruga Y, 2004. High monospore-releasing pigmentation mutants in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). Hydrobiologia, 512: 133—140
- Yan X H, Liu Z S, 1992. Selection of variants from protoplast cultures in *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta). Marine Science, 14: 262—271

INDUCTION AND ISOLATION OF PIGMENTATION MUTANTS OF *PORPHYRA YEZOENSIS* UEDA (BANGIALES, RHODOPHYTA) BY ^{60}Co - γ RAY IRRADIATION

YAN Xing-Hong, ZHANG Shu-Juan, HUANG Lin-Bin

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

Abstract To obtain pigmentation mutants of *Porphyra yezoensis* Ueda, single somatic cells were isolated enzymatically from the ^{60}Co - γ -ray-irradiated conchosporlings of the wild-type strain and were cultured to regenerate into whole blades. After irradiated at 100, 300, 500, 700, and 900Gy and cultured for 1 week, the color-mutated cells in different colors appeared in the irradiated blades. These cells formed cell-clusters in the next three weeks of culture. As irradiation dosage increased from 0 to 500Gy, the frequency of the color-mutated cell-clusters increased; however, beyond 700Gy, the frequency decreased. Therefore, 500Gy is the optimal dosage for inducing mutations. The frequency of the color-mutated cell-clusters varied in different parts of blade, increased from the base to the tip of the blade. Many mutant blades in different colors appeared in the regenerated blades from the single cells. Five pigmentation mutants (red orange, purplish red, yellow orange, olive, and green color) were isolated and their free-living conchocelis were established by sexual reproduction. The F_1 gametophytic blades of each mutant strains showed only one color that the same to its mother blade, indicating they have become relatively stable pigmentation mutants. Each mutant strain featured own characteristics in absorption spectra of *in vivo* blades, different from each other and from wild type's.

Key words *Porphyra yezoensis*, Gametophytic blade, ^{60}Co - γ ray, Pigmentation mutant, *In vivo* absorption spectra