

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220301001

http://www.yykxjz.cn/

张亦弛, 王文磊, 徐燕, 许凯, 纪德华, 陈昌生, 谢潮添. 坛紫菜诱变及 F₁ 代叶状体表型性状分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 137–148

ZHANG Y C, WANG W L, XU Y, XU K, JI D H, CHEN C S, XIE C T. Mutagenesis and blade phenotypic traits of *Neoporphyra haitanensis* F₁ lines. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 137–148

坛紫菜诱变及 F₁ 代叶状体表型性状分析*

张亦弛^{1,2,3} 王文磊^{1,2,3} 徐 燕^{1,2,3} 许 凯^{1,2,3}
纪德华^{1,2,3} 陈昌生^{1,2,3} 谢潮添^{1,2,3①}

(1. 集美大学水产学院 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产生物育种与健康养殖工程研究中心 福建省发展和改革委员会 福建 厦门 361021; 3. 农业农村部东海健康养殖重点实验室 福建 厦门 361021)

摘要 突变体是开展坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)良种选育和性状遗传调控机理研究的重要材料。为获得坛紫菜突变体,本研究利用不同强度的 γ 射线辐照(辐射剂量梯度:700、900、1100、1300、1500 Gy)处理野生品系 NSD35 的幼苗,恢复培养结果显示, γ 射线照射导致叶状体部分细胞死亡,且藻体细胞的死亡量随着诱变剂量的增加而升高;同时,突变的细胞数量随着辐射剂量增加呈先增后降的趋势。其中,经 1300 Gy 处理后藻体的突变细胞最多。之后利用体细胞酶解技术和单克隆技术获得了突变体的纯系藻体,从中初步筛选出性状各异的株系 67 个,并利用 14 个表型性状对其中 21 个株系的 F₁ 代进行相关性分析和聚类分析。结果显示,相较于对照组,突变体 F₁ 代群体中大部分性状的变异系数增加。突变体的多个性状间存在显著相关性,其中,藻体长度与宽度、鲜重没有显著相关性($P>0.05$);宽度与鲜重、叶形态呈极显著正相关($P<0.01$);鲜重与颜色呈显著负相关($P<0.05$);藻体不同部位的厚度之间存在极显著正相关;叶型与藻体中部、尖端的厚度呈显著负相关。进一步采用系统聚类的方法(遗传距离为 20),将 21 份材料分成 4 个主要类群,分别为颜色偏红的藻体组、宽而生物量大的藻体组、薄而日均增长快的藻体组和长而窄的藻体组。综上所述, γ 射线对坛紫菜叶状体具有良好的诱变效果,本研究为开展坛紫菜经济性状的遗传调控机理研究以及优良新品种选育提供了基础材料。

关键词 坛紫菜; γ 射线; 酶解; 突变体; 聚类分析

中图分类号 S917.3 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0137-12

紫菜(*Neoporphyra* 或 *Neopyropia*)是我国沿海传统的大宗水产养殖种类,富含人体必需的氨基酸、矿物质及维生素等营养物质(Cao et al, 2016)。2020 年全国紫菜养殖总产量约为 22.2 万 t,其中,坛紫菜(*Neoporphyra haitanensis*)产量占 70%以上(中国渔业统计年鉴, 2021)。由于丰富的营养价值和生态效益,

坛紫菜的市场需求持续增加。然而,随着栽培规模的扩大,良种匮乏的问题日益凸显。目前,大部分栽培品系是由岩礁上采集的野生坛紫菜驯化而来,加之多年自养自留,使得坛紫菜种质质量下降,抗逆性减弱(Yan et al, 2010)。通过国家审定的坛紫菜新品种虽然已有 5 个,但仍不足以满足多变的海域环境和市场的

* 国家重点研发项目(2018YFD0901500)、福建省重大科技专项(2019NZ0803)和财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系共同资助。张亦弛, E-mail: 252256361@qq.com

① 通信作者: 谢潮添, 教授, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-01, 收修改稿日期: 2022-04-07

需求。因此,培育出更多符合生产需求的新品系仍是当前坛紫菜育种的重要任务。

目前,紫菜新品种的选育技术主要包括选择育种、杂交育种、诱变育种等,其中,选择育种和杂交育种存在周期长、效率低等难题(丁洪昌等, 2019),而诱变育种操作简易、方便处理大批量的样品,且有利于筛选出一些具有重要研究价值和应用价值的材料(常金华等, 2002)。诱变育种在紫菜遗传育种中已被广泛应用, Lee 等(2019)通过 γ 射线诱变得到的甘紫菜(*Pyropia tenera*)色素突变体,不仅生长性状优于野生型,还具有较强的耐高温能力。Ding 等(2019)利用 ^{60}Co - γ 诱变处理紫菜新品系 HR-5 后,成功筛选出一株长度、重量、耐高温性等性状优于 HR-5 的突变株。除此之外,我国研究人员利用诱变育种等方法培育出了 4 个坛紫菜新品种(“申福 1 号”、“申福 2 号”、“闽丰 1 号”和“闽丰 2 号”)(梁志强, 2004; 王长青等, 2011; 梁艳, 2009; 梁艳等, 2009)。由此可见,诱变育种是选育紫菜优良新品种(系)的重要手段。

随着坛紫菜基因组测序的完成(Chen *et al.*, 2021),对坛紫菜重要性状调控基因的功能解析越来越迫切。但是,由于遗传操作技术体系不成熟、特异突变体缺乏等原因,坛紫菜关键农艺性状的遗传调控机理尚不明确。通过诱变方法构建突变体库是研究基因功能、发现新基因以及解析目标性状调控机制的有效方法(梁英等, 2020)。研究人员已在模式植物拟南芥(*Arabidopsis*)(Greene *et al.*, 2003)、小麦(袁凯等, 2021; 张婷等, 2021)、大豆(张小明等, 2016; 齐波等, 2019)、水稻(*Oryza sativa* L.) (叶俊, 2006)中构建了具有丰富性状的突变体库,并通过正向遗传学,从特定表型性状变化的个体中找到对应的突变基因,并揭示其功能(Zhang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2021)。因此,为了满足紫菜遗传学和育种学的需要,实现对基因功能的深入研究,开展紫菜诱变和突变体性状研究具有重要意义。

表型性状鉴定是紫菜育种工作中最基础的工作,紫菜的表型性状主要有数量性状和质量性状 2 种类型,数量性状主要受多个微效基因调控,极易受环境影响(孔繁玲, 2006),比如紫菜的长度、宽度、重量、厚度等性状(Xu *et al.*, 2015)。而紫菜的扭曲、叶型等属于质量性状,主要受单基因控制,不易受环境影响(邵元健, 2006)。因而,考察藻体各类性状,分析其遗传多样性,有利于改良紫菜性状。通过计算表型变异系数和遗传多样性指数,可为今后挖掘优质坛紫菜资源及选配杂交亲本提供理论参考。

本研究以纯化的坛紫菜野生品系 NSD35 为实验材料,利用 γ 射线诱变获得不同类型突变体,经过体

细胞克隆技术获得各突变体的纯系,对子代叶状体进行培育、观察和鉴定,以期解析坛紫菜经济性状的遗传调控机理以及选育优良品种提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养

本实验所用材料均来自福建省坛紫菜种质资源库的 NSD35 品系,该品系采自福建牛山岛,并通过酶解纯化获得纯系,以自由丝状体形式保存。取一定量 NSD35 丝状体在温度为 27~29℃、光照强度为 10~30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 9 L : 15 D 的条件下促熟,每隔 10 d 更换 1/3 丝状体培养液。当丝状体形成壳孢子囊枝时,挑选状态良好的藻丝,放入 500 mL 的锥形瓶中充气培养,在温度为 $(21.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、光强度为 40~50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光周期为 12 L : 12 D 的条件下培养。每 2 d 更换 2/3 培养液。培养促放出的壳孢子至小苗,待藻体长至 3~4 cm 时,挑选形态完整的叶状体进行人工诱变处理。

1.2 诱变处理

于 2019 年 11 月在浙江省辐照中心利用岛津 UV-1800 进行诱变, γ 射线放射源为铯-137,采用重铬酸钾(银)剂量计测定辐照处理实际计量值。设置 5 个梯度的辐射剂量分别为 700、900、1100、1300 和 1500 Gy,剂量率分别为 35、45、55、65 和 75 Gy/h。

1.3 诱变后的细胞显微观察及突变体分离

1.3.1 诱变后细胞的显微观察 将辐射后的藻体进行黑暗恢复培养 24 h,之后观察细胞死亡率。24 h 后将光照强度恢复至 20~30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 并弱充气培养藻体 7 d,显微观察统计叶状体变异细胞的种类和数量(20 倍镜下,每 1 cm 随机取 10~15 个视野)。

1.3.2 突变体分离 分别选取诱变后的藻体基部、中部和尖端各 2 cm^2 ,利用海螺酶进行酶解。

1.3.3 突变体初步筛选 对颜色、形态等性状有所变异的单克隆苗或细胞团进行筛选。

测量单色突变体色色度值: 将藻体平摊置于白色湿润磁盘上,利用分光测色剂(CM-700d),垂直于藻体随机测量藻体 3 个点,取色度值 a 值和 b 值, a 值越大藻体偏红色, a 值越小藻体偏绿; b 值越大表示藻体偏黄色, b 值越小表示偏蓝色。

1.3.4 突变体 F_1 代叶状体获取 对初筛出的突变株(色块)进行第 2 次酶解,获得它们的遗传纯合丝状体,诱导丝状体成熟放散壳孢子,培养放散出的壳孢子至小苗,用于后续 F_1 代叶状体的性状测定。

1.4 突变株 F₁ 代叶状体数量性状的测定

生长相关参数测定: 随机筛选 30 株 3.8~4.2 cm 健康完整的幼苗, 每 2 株分别置于 1000 mL 的锥形瓶中充气培养, 培养条件: 温度为(21.0±0.5)℃, 光强为 40~50 μmol/(m²·s), 光周期 12 L : 12 D。培养期间, 每 3 d 更换 1 次培养液, 培养 15 d 后观察并测量其长(L)、宽(W)和鲜重(FW)。

厚度测定: 随机取 12 株(25±5) cm 藻体, 用刀片横向切取藻体 1/4 (基部)、1/2 (中部)和 3/4 (尖端)处的单层细胞, 在 40 倍镜下进行观察测量, 并将其测量结果与对照组进行比对, 数值显著大于对照组的为厚叶型突变体, 反之则为薄叶型突变体。

生长速率测定: 根据以上测量结果计算长度特定生长率(LGR)、宽度特定生长率(WGR)和鲜重特定生长率(FWGR), 计算公式如下:

$$LGR=(\ln L_n-\ln L_0)/n\times 100\%$$

$$WGR=(\ln W_n-\ln W_0)/n\times 100\%$$

$$FWGR=[\ln(FW_n)-\ln(FW_0)]/n\times 100\%$$

式中, *n* 为培养天数; *L_n* 为培养 *n* 天藻体长度(cm); *L₀* 为初始藻体长度(cm); *W_n* 为培养 *n* 天藻体宽度(cm); *W₀* 为初始藻体宽度(cm); *FW_n* 为培养 *n* 天藻体鲜重(g); *FW₀* 为初始藻体鲜重(g)。

1.5 突变株 F₁ 代叶状体质量性状的赋值情况

对于坛紫菜叶状体颜色、藻体叶形、藻体基部形态、藻体锯齿等质量性状采用目测法, 观察其形态特征, 并按照谢小雪(2014)中的方法, 将质量性状数字化。其中, 参照颜色色谱表将叶状体颜色分为 12 个等级; 参照张学成等(2005)编著的《海藻遗传学》, 将叶型、基部形状分别划分为 2 个和 3 个等级; 将培养 15 d 的叶状体按基部锯齿大小分为 4 个等级, 按叶状体扭曲比例大小分为 4 个等级, 按藻体老化程度分为 2 个等级。具体赋值情况见表 1。

表 1 质量性状的赋值情况
Tab.1 The assignment value of quality traits

性状 Trait	分级赋值 Grading assignment											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
颜色 Color	野生色 少于 1/7	野生色 1/5~1/7	野生色 1/4~1/5	野生色 1/3~1/4	野生色 1/2~1/3	野生 偏红	深绿色	翠绿色	苹果绿	棕红色	黄色	紫色
叶型 Leaf form	披针形	亚披针形										
基部形状 Base section form	脐形	楔形	圆形									
锯齿程度 Size of saw tooth	无锯齿	波浪形	0.05 cm 以下		0.05~ 0.1 cm							
扭曲程度 Twist	无扭曲	扭曲部分 小于 1/4	扭曲部分大于 1/4 小于 1/2	扭曲部分 大于 1/2								
老化程度 Maturity	无老化	开始老化										

1.6 突变体 F₁ 代叶状体性状聚类分析

获得的原始数据先用 Excel 2016 计算平均值(mean)和标准差(SD)等, 将 21 个突变株系 F₁ 代叶状体的 14 个性状数据导入 SPSS 22 软件进行聚类分析。其中, 性状表型值以平均值表示, 将各性状的数值进行 Z 得分标准化, 并转换度量为绝对值, 采用间连接组间连接法, 区间为欧式距离进行聚类。

1.7 数据分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 22 软件进行实验数据的统计分析, F₁ 代藻体的性状数值均与对照组(未经诱变的 NSD35 藻体)的性状数值作进行对比。其中, 假

定判断方法采用单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验; 性状相关性分析采用 Pearson 分析方法; 根据变异系数(CV)和变异系数差判定突变体变异情况, 计算公式:

$$CV=\text{标准差}/\text{平均值}\times 100\%$$

$$\text{变异系数差}=\text{F}_1\text{代变异系数}-\text{对照组变异系数}$$

2 结果与分析

2.1 诱变对藻体成活率的影响

γ 射线辐照对坛紫菜的叶状体存活影响较大, 不同剂量的 γ 射线均造成坛紫菜叶状体细胞一定程度的死亡, 且藻体细胞的死亡量随着诱变剂量的增加而升高。在 700~900 Gy 辐照强度下, NSD35 叶状体只

有少量细胞死亡,细胞存活率为 90%以上;当诱变剂量增加至 1100 Gy 时,NSD35 品系叶状体细胞间隙增大,中部少部分细胞开始出现死亡,尖端细胞无明显变化。经高剂量(1300 Gy 以上)辐照后,藻体中部细胞间隙变大,细胞受损严重,大部分细胞形态由不规则形变为球形,细胞死亡率约为 40%,尖端细胞色素析出(图 1A)。就叶状体不同部位而言,基部细胞死亡率最高,尖端细胞死亡率次之,中部细胞死亡率最低(图 1B)。

2.2 诱变对藻体细胞的影响

与未辐照的叶状体相比,经辐照后的叶状体颜色变深、生长速度变慢。恢复培养 7 d 后,变异细胞与周围细胞出现明显的分界线,变异细胞块主要有橙色、橙红色、红色、绿色和紫色等色块(图 2A)。以辐照剂量 1100 Gy 为界,辐照低于 1100 Gy 剂量的藻体色素突变的细胞较少,存活率高;而辐照高于 1100 Gy 剂量的藻体细胞出现多个形态接近球形的细胞,部分色素突变细胞濒临死亡。随着诱变剂量的增加,NSD35 色素突变细胞个数呈先上升后下降的趋势,在 1300 Gy 时达到峰值(图 2B)。

2.3 突变株的分离及性状分析

将诱变叶状体的中部藻块进行酶解获得单离体细胞,进行个体再生培养,通过对再生体的颜色、形态、生长等特性进行筛选和鉴定。NSD35 品系初选获得 67 个突变株系。突变株包含色素突变体 45 个,形态突变体 51 个,其他类型突变 11 个,部分突变株有 2 个及 2 个以上的突变性状,表型突变具体情况见表 2。

2.3.1 色素突变体分离及性状分析 未经诱变处理的坛紫菜叶状体为野生色(图 3A),基部呈绿色,逐渐过渡成红棕色。在单克隆苗中,色素突变较为丰富,主要包括黄色、红色、浅绿色、褐绿色、紫色、野生红色、野生绿色等突变(图 3B~F)。进一步检测突变体的色度值,结果显示,不同颜色藻体的色度值差异显著(图 3G)。

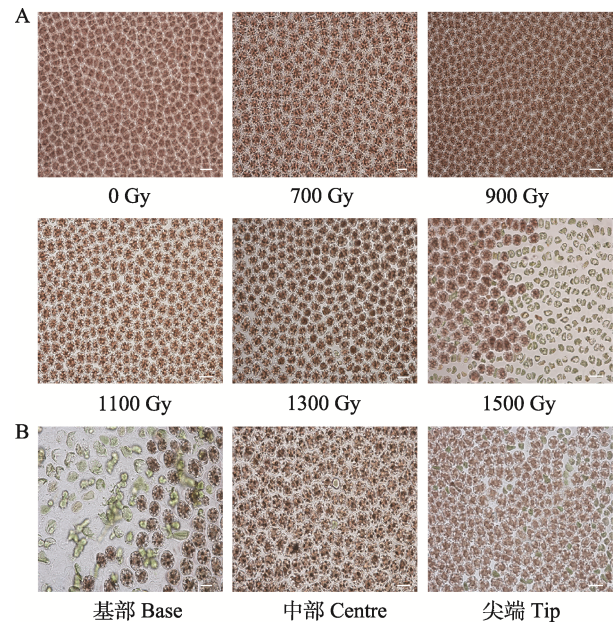


图 1 γ 射线辐照坛紫菜叶状体显微观察图(标尺=20 μm)

Fig.1 The microscopic observation of leaf shape of *N. haitanensis* irradiated by γ ray (bar =20 μm)

A: 不同剂量处理后的细胞状态;

B: 叶状体不同部位细胞状态

A: Status of cell after treatment with different doses of NSD35; B: Status of cell in different parts of blade

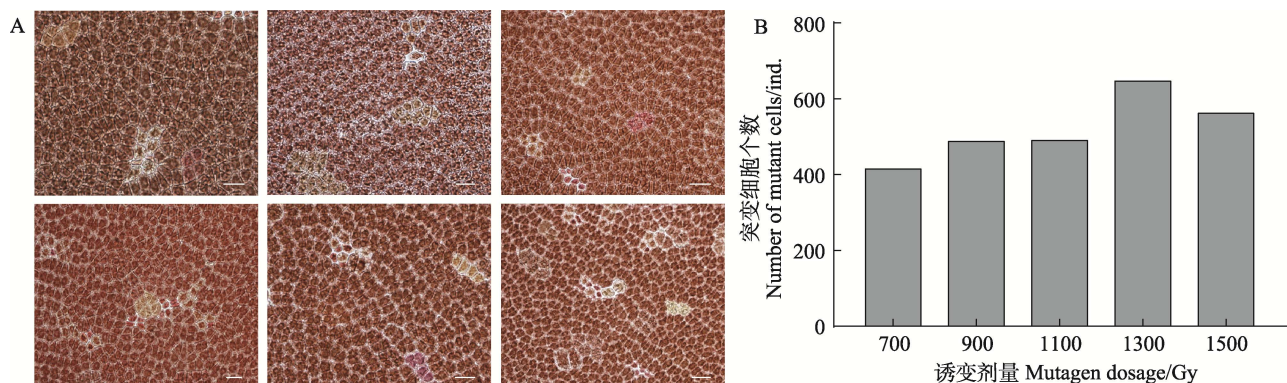


图 2 γ 射线辐照过的 NSD35 叶状体上形成的变异细胞块

Fig.2 The color-mutated cell-clusters formed on the γ ray irradiated blades of NSD35

A: NSD35 不同颜色的细胞(标尺=20 μm); B: 经不同剂量辐照后色素变异的细胞数目

A: Cells of different colors of and NSD35 (bar = 20 μm); B: The number of cells with pigment variation after irradiation at different doses

表 2 初步筛选坛紫菜突变体的表型统计
Tab.2 Phenotypic statistics of mutation types
of *N. haitanensis*

突变类型 Mutation type	性状特征 Trait	突变株数 Number of mutant plant
颜色 Color	红 Red	26
	翠绿色 Green	1
	深绿色 Deep green	2
	紫色 Purple	1
	黄色 Yellow	1
	褐绿色 Brownish green	1
	苹果绿 Apple green	1
	偏红 Slight red	12
	窄型叶 Narrow leaf	6
形态 Form	宽型叶 Wide leaf	16
	薄 Thin	17
	厚 Thickness	4
	锯齿 Saw tooth	5
	扭曲 Twist	3
其他类型 Other types	生长速度 Growth rate	6

2.3.2 形态突变体分离及性状分析 形态突变体有宽度突变体、锯齿突变体、基部形状突变体、厚度突变体等,共 51 份突变体。其中,厚度突变体 21 个,包括薄叶型藻体 17 个、厚叶型藻体 4 个。未经诱变的 NSD35 藻体中部厚度为(23.54±1.39) μm (图 4C、D),而经过诱变处理后获得的薄叶型突变体的叶状体中部厚度减少了 4~8 μm (图 4E、F),但厚叶型突变体的叶状体中部厚度增加了 4~10 μm (图 4A、B)。由于藻体是单层细胞,所以可以通过测定细胞厚度判断藻体厚度,如图 4B、D、F 所示,依次为厚叶型突变体、对照组 NSD35、薄叶型突变体。

宽度突变体有 22 个,包括宽叶型藻体 16 个、窄叶型藻体有 6 个,宽叶和窄叶的藻体表型对比明显(图 5)。未经处理的 NSD35 藻体宽度可达 1 cm,经过诱变后宽叶型突变体的宽度为 2~3 cm (图 5A、B、C),而极端窄叶型突变体的宽度不足 0.1 cm (图 5D)。

2.4 诱变群体 F₁ 叶状体的表型性状

2.4.1 F₁ 叶状体表型性状的平均表现 如表 3 所示,从叶状体表型性状的平均值来看,F₁ 代的长、宽、鲜重和厚度数值均小于对照组,偏向于负向变异,而长宽比、颜色、基部形状和扭曲程度均大于对照组,偏向于正向变异。变异系数在 8.74%~59.49%之间,其中,变异系数最小的是尖端厚度,仅有 8.74%;而

颜色、宽度、基部形状和锯齿变异系数较大,并依次递减,F₁ 代藻体的上述 4 项表型性状的变异系数分别为 59.49%、44.45%、43.03%和 40.83%。此外,老化程度的变异系数差为负值,这说明 F₁ 代的老化程度小于对照组,突变株不易老化。从最大值和最小值来看,F₁ 代藻体的变异幅度大于对照组。

2.4.2 F₁ 叶状体表型性状相关性分析 通过相关性分析发现,F₁ 代藻体的长度和日增长率、日增宽率、日增重率、长宽比呈极显著正相关($P<0.01$),相关系数分别为 0.982、0.536、0.688 和 0.695。宽度与鲜重、日增宽率、叶型呈现极显著正相关,相关系数分别为

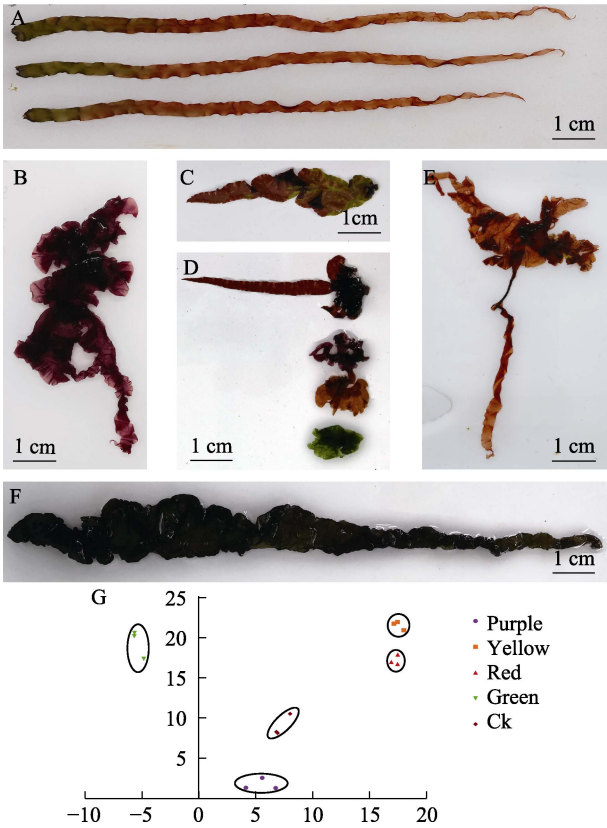


图 3 色素突变体藻体
Fig.3 Gametophytic blades of pigmentation mutant strains

A: 未经诱变处理的 NSD35 叶状体; B: 紫色的叶状体; C: 红色和绿色相嵌合的叶状体; D: 从上往下: 翠绿色的叶状体、黄色的叶状体、紫色的叶状体、红色的叶状体; E: 黄色的叶状体; F: 褐绿色的叶状体; G: 色素突变体的色度值(横坐标为 a 值; 纵坐标为 b 值)。

A: Gametophytic blades of NSD35 without treatment; B: Gametophytic blades of purple; C: Gametophytic blades of red and green. D: From top to bottom: Gametophytic blades of emerald green, yellow, purple, red; E: Gametophytic blades of yellow; F: Gametophytic blades of brownish green; G: Value of chroma between the pigment mutants (Abscissa represent the a value; Ordinate represents the b value).

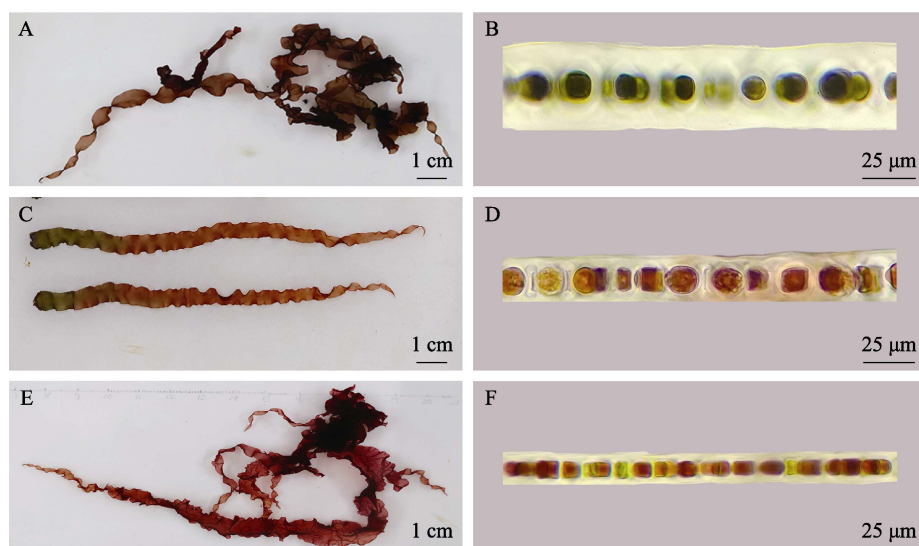


图4 厚度突变体藻体

Fig.4 Gametophytic blades of thickness mutant strains isolated from NSD35

A: 厚叶型突变体叶状体; B: 厚叶型突变体单层细胞厚度; C: 对照组叶状体;

D: 对照组单层细胞厚度; E: 薄叶型突变体叶状体; F: 薄叶型突变体单层细胞厚度。

A: Blade of thick leaf mutant; B: Thickness of cell from thick leaf mutant; C: Blade without mutagenic treatment; D: Thickness of cell without mutagenic treatment; E: Blade of thin leaf mutant. F: Thickness of cell from thin leaf mutant.

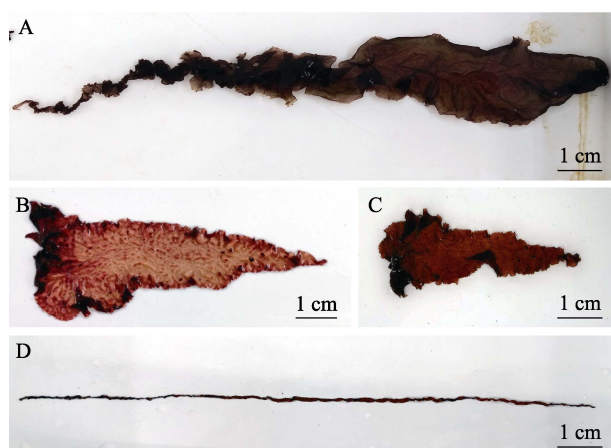


图5 宽度突变体藻体

Fig.5 Gametophytic blades of width mutant strains isolated from NSD35

A~C: 宽叶型突变体; D: 窄叶型突变体

A~C: Wide leaf mutant; D: Narrow leaf mutant

0.834、0.595 和 0.561; 宽度与日增重率呈显著正相关($P<0.05$), 相关系数为 0.489; 而宽度与长宽比呈极显著负相关, 相关系数为 0.743。鲜重与日增宽率、日增重率呈极显著正相关, 相关系数分别为 0.739 和 0.724; 与颜色的相关系数为 0.520, 呈显著负相关。日增长率与日增宽率、日增重率及长宽比呈极显著正相关, 相关系数分别为 0.572、0.712 和 0.675。日增宽率与日增重率相关系数为 0.908, 呈极显著正相关。

日增宽率与叶形态呈显著正相关, 与叶状体中部厚度呈显著负相关。日增重率与藻体叶型呈显著正相关。叶状体不同部位之间的厚度呈极显著正相关, 尖端厚度与叶形态呈显著负相关; 而藻体尖端厚度与锯齿、扭曲呈显著相关, 相关系数分别为 0.364 和 0.464。藻体的叶型与藻体质量性状中的锯齿程度呈极显著负相关, 相关系数为 0.553。藻体的扭曲程度与藻体老化程度呈正相关, 相关系数为 0.457。藻体的基部形状与各性状间均没有显著相关性(图 6)。总体而言, 质量性状与数量性状之间的显著相关性较低, 数量性状之间显著相关性较高。

2.4.3 单株藻体的聚类分析 对 F_1 代藻体表型性状进行 z-score 标准化处理后, 采用组间连接法, 区间欧式距离进行系统聚类。由图 7 可知, 坛紫菜叶状体 F_1 代在遗传距离为 20 处, 可将 21 个单株聚类为 4 个类群。第 I 类有 5 株, 其特点是藻体颜色偏红; 第 II 类有 6 株, 特点是叶状体较宽、生物量大; 第 III 类有 2 株, 特点是日均增长快、藻体较薄; 第 IV 类有 8 株, 特点是长而窄的叶状体。

3 讨论

人工诱变育种可以快速获得大量突变体, 是新质创制的有效途径之一。其中, γ 射线诱变方法易操作、安全, 已被广泛应用于紫菜育种中(付峰等, 2018)。

表 3 坛紫菜表型性状及 Kolmogorov-Smirnov 检验结果
Tab.3 Phenotypic character and Kolmogorov-Smirnov test results of *N. haitanensis*

指标 Index	处理组 Treatment	平均值 Mean	标准差 SD	最小值 Min	最大值 Max	变异系数 CV/%	变异系数差 Difference of variation coefficient /%
长度 Length /cm	F ₁	46.86	9.80	21.38	60.75	20.91	7.10
	CK	54.08	7.47	47.00	63.50	13.81	
宽度 Width /cm	F ₁	0.72	0.32	0.49	1.84	44.45	29.25
	CK	0.79	0.12	0.65	1.00	15.20	
鲜重 Fresh weight /g	F ₁	0.186	0.070	0.074	0.376	37.77	16.24
	CK	0.232	0.050	0.176	0.294	21.53	
日增长率 LGR /%	F ₁	16.13	1.63	10.94	18.02	10.12	4.04
	CK	17.11	1.04	15.44	18.55	6.08	
日增宽率 WRG /%	F ₁	8.72	1.27	5.80	11.03	14.58	5.85
	CK	8.56	0.75	7.32	9.24	8.73	
日增重率 FWGR /%	F ₁	26.73	2.87	19.92	31.47	10.73	5.54
	CK	29.11	1.51	27.32	31.61	5.19	
长宽比 Length-breadth ratio	F ₁	71.24	22.85	20.49	109.81	32.08	21.02
	CK	65.74	7.27	56.67	78.75	11.06	
基部厚度 Thickness of the base	F ₁	30.96	6.22	21.63	41.25	20.10	16.26
	CK	31.79	1.22	30.00	32.50	3.84	
中部厚度 Thickness of the centre	F ₁	21.78	2.56	16.83	27.60	11.74	7.61
	CK	22.86	0.94	22.50	25.00	4.13	
尖端厚度 Thickness of the tip	F ₁	19.28	1.68	16.56	21.83	8.74	4.22
	CK	20.89	0.94	20.00	22.50	4.52	
颜色 Color	F ₁	5.38	3.20	1.00	11.00	59.49	28.89
	CK	2.57	0.79	1.00	3.00	30.60	
基部形状 Form of base section	F ₁	1.57	0.68	1.00	3.00	43.03	43.03
	CK	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	
叶型 Leaf form	F ₁	1.19	0.40	1.00	2.00	33.80	33.80
	CK	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	
锯齿 Size of saw tooth	F ₁	2.52	1.03	1.00	4.00	40.83	27.60
	CK	2.86	0.38	2.00	3.00	13.23	
扭曲 Twist	F ₁	1.24	0.44	1.00	2.00	35.25	2.18
	CK	1.14	0.38	1.00	2.00	33.07	
老化 Maturity	F ₁	1.24	0.44	1.00	2.00	35.25	-2.70
	CK	1.29	0.49	1.00	2.00	37.95	

选择最佳诱变条件是利用 γ 射线诱变从而成功获得突变体的关键。本研究以 5 个辐照强度(700、900、1100、1300 和 1500 Gy), 对坛紫菜不同藻体进行诱变, 通过对细胞死亡率及细胞突变率进行综合分析, 以确定最适诱变剂量。结果显示, 色素变异细胞的数量随诱变剂量的增加呈先增加后降低的趋势(图 2), 与严兴洪等(2005)的研究结果相似。此外, 突变体 F₁ 代变异幅度大于对照组, 且除尖端厚度以外, F₁ 代其他性状的变异系数均大于 10%而小于 90%, 属于中度变异(刘继龙等, 2018), 这说明 γ 射线诱变能获得较好的诱变效果, 且诱变效果强于紫外线诱变(Chen *et al*,

2016)和化学诱变(李勇斌, 2006), 且无需添加任何化学品、无二次污染, 具有高效、清洁、低成本、操作方便等优点, 因此, γ 射线诱变方法在紫菜未来的诱变育种中仍有较广阔的应用前景(丁洪昌等, 2019)。

通过诱变进行育种的首要目标是获得差异明显的表型性状, 表型性状鉴定是育种工作中的基础工作(张丰收等, 2020)。相较高等植物而言, 紫菜叶状体外形简单, 其形态特征主要包括叶长、叶宽、叶厚及叶色(童冠文, 2010; Xu *et al*, 2012; 黄林彬等, 2017; 仵燕青等, 2016; 柳佩娟等, 2008)。藻体长度、宽度和厚度等性状和紫菜的产量密切相关, 而藻体颜色是影

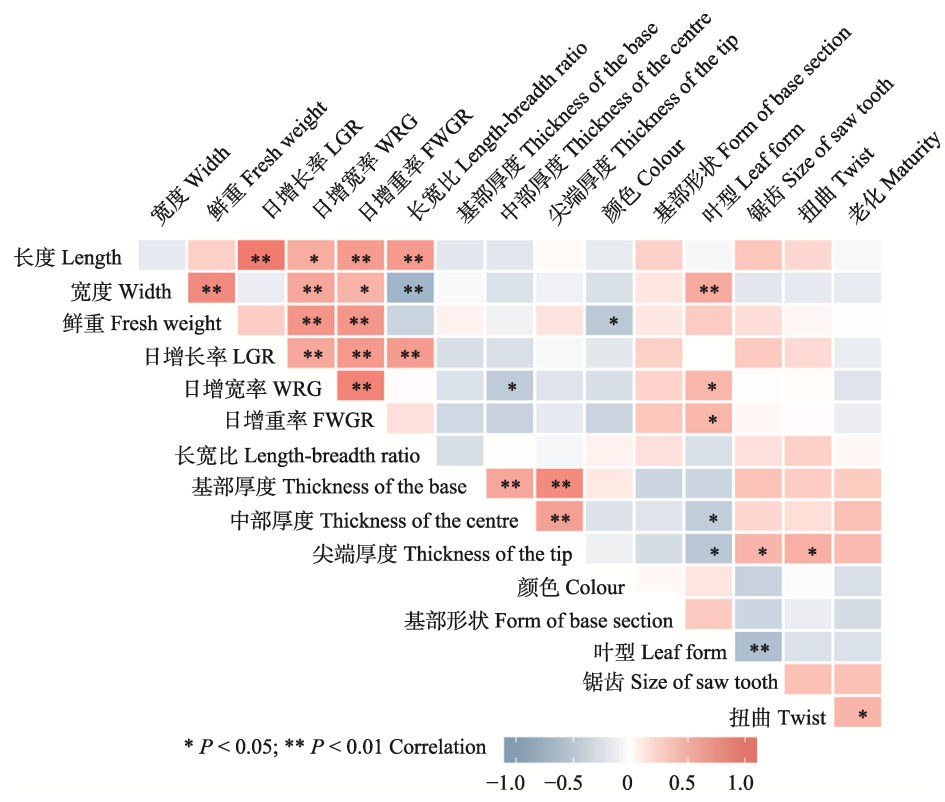


图 6 坛紫菜突变体叶状体表型性状的相关性分析
Fig.6 Correlation of phenotypic character of blades of *N. haitanensis*

*表示差异显著($P<0.05$); **表示差异极显著($P<0.01$)
* indicates significant difference at $P<0.05$; ** indicates significant difference at $P<0.01$

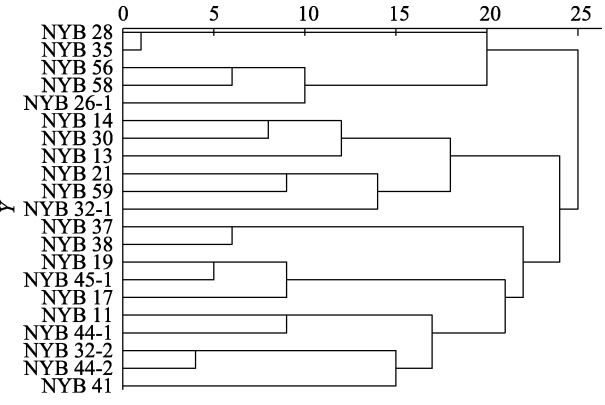


图 7 坛紫菜突变体 F_1 代单株聚类分析树状图
Fig.7 Cluster analysis of F_1 generation of *N. haitanensis*

响其品质的主要指标之一(Hwang *et al.*, 2019)。本研究通过对坛紫菜突变体 F_1 代中 21 个株系的长、宽、鲜重、厚度、颜色等 14 个表型性状进行分析发现,突变群体中诱变效应最为明显的性状是颜色,其变异系数达 59.49%。这与以往研究结果一致,多个研究组利用不同的诱变方式获得的紫菜突变体大多都是色素突变体(赵爽等, 2019; 张倩等, 2019; 李琳等, 2006), 紫菜易产生色素突变体, 说明调控藻体颜色

的基因经过诱变后最易发生突变。而紫菜的叶状体颜色主要与藻红蛋白、藻蓝蛋白和叶绿素 *a* 的含量及比例相关(Zhang *et al.*, 2014), 往往藻胆蛋白含量高的藻体颜色深、鲜亮, 符合市场需求(羌玺等, 2021)。此外, 由于坛紫菜的减数分裂发生在壳孢子的前 2 次分裂期间, 之后最初 4 个细胞发育成了线性四分体, 导致形成嵌合叶片, 而不同色素突变体可以作为遗传标记来区分嵌合叶片的每个部分, 从而便于获得纯系藻体。

与颜色性状突变不同, 坛紫菜 F_1 代的长、宽、鲜重和厚度数值均小于对照组, 偏向于负向变异。例如, 经过诱变后共获得薄叶型藻体 17 个、厚叶型藻体 4 个。紫菜藻体的厚度影响其口感, 并限制其加工方法, 进而影响紫菜附加值的提升(Ding *et al.*, 2019; 全汉锋等, 2012)。条斑紫菜藻体薄, 更适合自动化加工, 其初级产品可进行附加值更高的二次加工(如寿司), 而坛紫菜藻体厚而宽, 一般用于半机械化或手工生产附加值低的产品, 如紫菜饼(何培民等, 2018)。因此, 选育藻体薄的坛紫菜新品系是育种的主要目标之一(Ding *et al.*, 2020)。本研究获得的突变体中, 藻体薄的品系的中部厚度仅有 16 μm 左右, 相较于新品

种“闽丰2号”(藻体中部厚度约为 21 μm)更薄(梁艳等, 2009)。作为对比, 一些传统养殖品种在第3次采收时藻体厚度已达到 60 μm , 严重影响其口感和后期加工(何培民等, 2018)。研究发现, 藻体的厚度性状遗传较稳定, 藻体的厚度主要与细胞壁厚度和胶质腔厚度相关(Gao *et al.*, 2021; 童冠文等, 2010)。魏鹏华(2021)研究表明, NAD 糖依赖性差向异构酶(GME)基因的表达量与琼胶含量显著相关, 进而调控坛紫菜藻体的厚度, 但其具体调控机制仍有待深入研究。而本研究筛选的厚度突变体为坛紫菜厚度性状的遗传调控机制解析提供了难得的实验材料。此外, 不同突变体表型性状之间具有非常紧密的关联性, 对不同性状进行相关性分析, 从中找出变异规律, 可辅助坛紫菜的育种工作, 例如, 选择长和薄的藻体就有可能选育出高产、优质的坛紫菜新品系。

4 结论

本研究通过 γ 射线照射处理坛紫菜叶状体获得不同突变体, 之后利用酶解单克隆技术获得再生突变体, 最终筛选出 67 个突变体株系。并基于 14 个表型性状, 对其中 21 个株系的 F₁ 代进行了相关性和聚类分析, 以期为坛紫菜遗传育种研究以及优良新品种选育提供材料支撑。

参 考 文 献

- CAO J, WANG J P, WANG S C, *et al.* *Porphyra* species: A mini-review of its pharmacological and nutritional properties. *Journal of Medicinal Food*, 2016, 19(2): 111–119
- CHANG J H, LI Y H. The applying the technology of artificial induced mutation in plant improvement. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2002, 25(S1): 14–16 [常金华, 李玉华. 诱变技术在植物遗传改良中的应用. *河北农业大学学报*, 2002, 25(S1): 14–16]
- CHEN H M, CHU J S, CHEN J J, *et al.* Insights into the ancient adaptation to intertidal environments by red algae based on a genomic and multiomics investigation of *Neoporphyra haitanensis*. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 39(1): msab315
- CHEN S S, DING H C, YAN X H. Isolation and characterization of an improved strain of *Porphyra chauhanii* (Bangiales, Rhodophyta) with high-temperature resistance. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 3031–3041
- DING H C, LIU C J, YAN X H. Selection and characterization of an improved strain (ST-2) of *Pyropia haitanensis* by ⁶⁰Co- γ ray irradiation. *Aquaculture Research*, 2019, 50(9): 2388–2397
- DING H C, WANG T G, ZHANG P, *et al.* High-temperature resistance of the thin-blade strain of *Pyropia haitanensis* and its pilot cultivation in mariculture farm. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(4): 2261–2270
- DING H C, YAN X H. Advances in *Pyropia* (formerly *Porphyra*) genetics and breeding. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 592–603 [丁洪昌, 严兴洪. 紫菜遗传育种研究进展. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 592–603]
- Fishery administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs. *China Fishery Statistics Yearbook 2021*. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [农业农村部渔业渔政管理局. 2021 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- FU F, SUI Z H, SUN L Q, *et al.* Research advance on the algal mutation breeding technologies. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(10): 58–63 [付峰, 隋正红, 孙利芹, 等. 藻类诱变育种技术研究进展. *生物技术通报*, 2018, 34(10): 58–63]
- GAO J, YANG S, TANG K, *et al.* GmCCD4 controls carotenoid content in soybeans. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4): 801–813
- GREENE E A, CODOMO C A, TAYLOR N E, *et al.* Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, 2003, 164(2): 731–740
- HE P M, ZHANG Z Y, ZHANG X C, *et al.* *Seaweed cultivation*. Beijing: Science Press, 2018 [何培民, 张泽宇, 张学成, 等. 海藻栽培学. 北京: 科学出版社, 2018]
- HUANG L B, YAN X H. Genetic analysis of major economic traits in *Pyropia yezoensis* using double haploid population. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(12): 1847–1857 [黄林彬, 严兴洪. 条斑紫菜双单倍体群体主要经济性状的遗传分析. *水产学报*, 2017, 41(12): 1847–1857]
- HWANG E K, YOTSUKURA N, PANG S J, *et al.* Seaweed breeding programs and progress in eastern Asian countries. *Phycologia*, 2019, 58(5): 484–495
- KONG F L. *Plant quantitative genetics*. China Agricultural University Press, 2006 [孔繁玲. 植物数量遗传学. 北京: 中国农业大学出版社, 2006]
- LEE H J, CHOI J I. Enhancing temperature tolerance of *Pyropia tenera* (Bangiales) by inducing mutation. *Phycologia*, 2019, 58(5): 496–503
- LI L, YAN X H. Isolation and characterization of a green type mutant in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(1): 30–35 [李琳, 严兴洪. 坛紫菜绿色突变体的分离与特性分析. *上海水产大学学报*, 2006, 15(1): 30–35]
- LI Y B. Effects of MNNG on growth and development in thalli of *Porphyra haitanensis* and analysis of the different protein expression in the mutants. Master's Thesis of Xiamen University, 2006 [李勇斌. MNNG 对坛紫菜叶状体细胞生长发育的影响与坛紫菜突变品系间的差异蛋白质研究. 厦门大学硕士研究生学位论文, 2006]

- LIANG Y, XU Y, CHEN C S, *et al.* Research on the main economic traits of the new strain of high quality *Porphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(4): 108–116 [梁艳, 徐燕, 陈昌生, 等. 坛紫菜优质新品系(Q-1)主要经济性状的研究. *渔业科学进展*, 2009, 30(4): 108–116]
- LIANG Y, YAN Y Y, LAI Q X, *et al.* Researching advances in microalgal mutation breeding. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2020, 50(6): 19–32 [梁英, 闫译允, 赖秋璇, 等. 微藻诱变育种研究进展. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(6): 19–32]
- LIANG Y. Research on main economic traits and DNA sequence analysis of the new pure *Porphyra haitanensis* Lines. Master's Thesis of Jimei University, 2009 [梁艳. 坛紫菜新品系纯系主要经济性状的研究及 DNA 序列分析. 集美大学硕士研究生学位论文, 2009]
- LIANG Z Q. Preliminary study on genetic breeding of *Porphyra haitanensis*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2004 [梁志强. 坛紫菜遗传育种的初步研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2004]
- LIU J L, LIU L, MA X Y, *et al.* Spatial variability of soil salt in different soil layers at different scales. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2018, 26(2): 305–312 [刘继龙, 刘璐, 马孝义, 等. 不同尺度不同土层土壤盐分的空间变异性研究. *应用基础与工程科学学报*, 2018, 26(2): 305–312]
- LIU P J, XIE C T, CHEN C S, *et al.* Preliminary study on different pigment mutants of *Porphyra haitanensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2008, 29(4): 78–83 [柳佩娟, 谢潮添, 陈昌生, 等. 坛紫菜不同色素突变体的初步研究. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 78–83]
- QI B, RU X X, JIA Z Z, *et al.* Radiation intensities affect important agronomic characters of soybean M₁ generation. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(12): 40–45 [齐波, 汝玄玄, 贾召召, 等. 不同辐射强度对大豆 M₁ 代重要农艺性状的影响. *中国农学通报*, 2019, 35(12): 40–45]
- QIANG X, WANG L J, NIU J F, *et al.* Research progress of phycobiliproteins from seaweed. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080019 [羌玺, 王立军, 牛建峰, 等. 海藻来源藻胆蛋白研究进展. *食品工业科技*, 2021, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080019]
- QUAN H F, WANG X C, ZHAN Z Y, *et al.* Studies on the improvement of full-automatic *Prophyra haitanensis* processing equipment and its technology optimization. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(1): 122–128 [全汉锋, 王兴春, 詹照雅, 等. 坛紫菜全自动加工设备及工艺的改进. *渔业科学进展*, 2012, 33(1): 122–128]
- SHAO Y J. Analysis of definitions about qualitative and quantitative trait. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2006(4): 55–57 [邵元健. 质量性状和数量性状含义的辨析. *生物学杂志*, 2006(4): 55–57]
- TONG G W. Research progress on economic traits of *Porphyra yezoensis*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2010(11): 343–345 [童冠文. 条斑紫菜经济性状研究进展. *现代农业科技*, 2010(11): 343–345]
- WANG C Q, YAN X H, HUANG L B, *et al.* Characterization of an improved strain (SF-2) of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and its pilot cultivation in mariculture farm. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(11): 1658–1667 [王长青, 严兴洪, 黄林彬, 等. 坛紫菜优良品系“申福 2 号”的特性分析与海区中试. *水产学报*, 2011, 35(11): 1658–1667]
- WEI P H. Preliminary study on regulation mechanism of algal thickness in *Pyropia haitanensis*. Master's Thesis of Jimei University, 2021 [魏鹏华. 坛紫菜藻体厚度调控机理的初步研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2021]
- WU Y Q, XIE C T, XIE X X, *et al.* Analysis on the variation patter of phenotypic traits of *Pyropia haitanensis* germplasms. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(3): 173–180 [仵燕青, 谢潮添, 谢小雪, 等. 坛紫菜种质品系表型性状的变异规律分析. *渔业研究*, 2016, 38(3): 173–180]
- XIE X X. Construction of *Pyropia haitanensis* core germplasm repositories. Master's Thesis of Jimei University, 2014 [谢小雪. 坛紫菜核心种质库的构建. 集美大学硕士研究生学位论文, 2014]
- XU Y, HUANG L, JI D H, *et al.* Construction of a dense genetic linkage map and mapping quantitative trait loci for economic traits of a doubled haploid population of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 228
- XU Y, XIE C T, CHEN C S, *et al.* Genetic analyses of six quantitative traits of a doubled haploid population of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(1): 89–96
- YAN X H, LIANG Z Q, SONG W L, *et al.* Induction and isolation of artificial pigmentation mutants in *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(2): 166–172 [严兴洪, 梁志强, 宋武林, 等. 坛紫菜人工色素突变体的诱变与分离. *水产学报*, 2005, 29(2): 166–172]
- YAN X H, LV F, LIU C J, *et al.* Selection and characterization of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2010, 22(4): 511–516
- YE J. The screening of mutants and construction of rice mutant population for variety ‘9311’ of Rice (*Oryza sativa* L.). Master's Thesis of Zhejiang University, 2006 [叶俊. 水稻“9311”突变体的筛选和突变体库的构建. 浙江大学硕士研究生学位论文, 2006]
- YUAN K, ZHANG W, WEN H W, *et al.* EMS-induced mutagenesis and phenotypic variation analysis in wheat variety Jimai 22. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 979–988 [袁凯, 张伟, 温宏伟, 等. EMS 诱导济麦 22 突变体库的构建及表型变异分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4): 979–988]

- ZHANG F S, WANG Q. Research progresses in the plant breeding of radiation mutation. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2020, 48(6): 39–49 [张丰收, 王青. 植物辐射诱变育种的研究进展. 河南师范大学学报(自然科学版), 2020, 48(6): 39–49]
- ZHANG Q, DING H C, YAN X H, *et al.* Isolation and characterization of pigmentation mutants of *Pyropia crispata* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 526–534 [张倩, 丁洪昌, 严兴洪, 等. 皱紫菜色素突变体的分离与特性分析. 上海海洋大学学报, 2019, 28(4): 526–534]
- ZHANG T, LI J F, MA F, *et al.* Study of photosynthetic characteristics of the *Pyropia yezoensis* Thallus during the cultivation process. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 859–865
- ZHANG T, LI Y F, MA L, *et al.* Lateral floret 1 induced the three-florets spikelet in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(37): 9984–9989
- ZHANG T, WEN H W, YUAN K, *et al.* Construction of ethyl methane sulfonate mutant library of Jinmai 47 and preliminary analysis of quality characteristics of high generation mutants. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*. 2021, 35(8): 1731–1739 [张婷, 温宏伟, 袁凯, 等. 晋麦 47 EMS 突变体库的构建及高代突变材料品质性状的初步分析. 核农学报, 2021, 35(8): 1731–1739]
- ZHANG X M, XUE Y G. Research progress of soybean mutant library construction. *Soybean Science*, 2016, 35(2): 345–350 [张小明, 薛永国. 大豆突变体库构建研究进展. 大豆科学, 2016, 35(2): 345–350]
- ZHANG X C, QIN S, MA J H, *et al.* The genetics of marine algae. Beijing: China Agriculture Press, 2005 [张学成, 秦松, 马家海, 等. 海藻遗传学. 北京: 中国农业出版社, 2005]
- ZHAO S, DING H C, LIU Z J, *et al.* Induction and isolation of pigmentation mutant in *Pyropia suborbiculata kjellman* (Bangiales, Rhodophyta). *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(2): 114–122 [赵爽, 丁洪昌, 刘长军, 等. 圆紫菜人工色素突变体的诱导与分离. 海洋学报, 2019, 41(2): 114–122]

(编辑 冯小花)

Mutagenesis and Blade Phenotypic Traits of *Neoporphyra haitanensis* F₁ Lines

ZHANG Yichi^{1,2,3}, WANG Wenlei^{1,2,3}, XU Yan^{1,2,3}, XU Kai^{1,2,3}, JI Dehua^{1,2,3},
CHEN Changsheng^{1,2,3}, XIE Chaotian^{1,2,3①}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 2. Fujian Engineering Research Center of Aquatic Breeding and Healthy Aquaculture; Fujian Provincial Development and Reform Commission, Xiamen, Fujian 361021, China; 3. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract *Neoporphyra haitanensis* is a traditional coastal aquaculture species in China; it is rich in essential amino acids, minerals, and vitamins. It is not only beneficial economically, but also adjusts the ecosystem. However, fine varieties of *N. haitanensis* are lacking even with the enlargement and extension of the *N. haitanensis* growing area. Since humans began breeding *N. haitanensis*, most produced strains have been domesticated from wild *N. haitanensis* collected from rocks. The germplasm collection and usage is considered the bottleneck issue that often causes *N. haitanensis* quality degradation. Therefore, it is important to breed new varieties. Selective breeding, cross-breeding, and mutation breeding are among the most common methods used to breed new *N. haitanensis* varieties. Mutation breeding is a quick, simple, and convenient genetic tools. For several decades, natural means to induce genetic diversity have been exploited to breed new varieties, as the naturally occurring mutations are insufficient. One of the most important genetic breakthroughs was the invention of artificial methods to induce mutations. Physical mutagenesis is a safer and more efficient procedure than chemical mutagenesis. To obtain artificial mutants, *N. haitanensis* (NSD35) gametophytes were treated with different γ -ray irradiation intensities (700 Gy, 900 Gy, 1100 Gy, 1300 Gy, and 1500 Gy). After culture recovery, the results showed

① Corresponding author: XIE Chaotian, ctxie@jmu.edu.cn

that gametophytic cell death increased with the irradiation escalation, with more than 90% cell viability after low radiation dose treatment (700 Gy and 900 Gy). With doses more than 1100 Gy, the cell viability decreased, in which the NSD35 cellular space became larger and a few middle cells died, although no obvious change was observed in tip cells. After induction, the cell morphology changed with higher radiation doses (1300 Gy and 1500 Gy). Some cells exhibited microscopic features, such as enlarged size and alternation from irregular cell shape to circular for some cells. Notably, the cell death rate decreased systematically from the blade base to its tip and from that to its center. Microscopic examination revealed that the number of mutant cells increased and then decreased with the radiation dose rise. The pigmented mutant cells frequency was higher in low radiation doses, further increasing with the rise in irradiation from 700 Gy to 1300 Gy. Nonetheless, the pigmented mutant cells frequency decreased with the highest dose of 1500 Gy. The best mutagenic effect was observed in gametophytes treated with 1300 Gy as they had the largest number of pigmented mutant cells. Cells cultured *in vitro* were obtained by enzymatic hydrolysis and individual regeneration. Preliminary screening of 67 mutants was performed to construct the mutant library, and 45 pigmented mutant strains, 51 morphological mutants, and 11 other mutants were obtained. Most of the mutants showed two or more mutations of phenotypic character. Twenty-one F_1 generation cell lines were screened, and 14 traits (length, width, fresh weight, daily length growth rate, daily width growth rate, daily weight growth rate, length-breadth ratio, base thickness, center thickness, tip thickness, color, base section form, leaf form, saw tooth size, twist, and maturity) were analyzed by correlation analysis and system analysis. The coefficients of variation results showed significant phenotypic differences between F_1 and control cells. The F_1 coefficients of variation ranged from 8.74% to 59.49%, revealing a moderate variability. Correlation analysis also showed that most of the traits had significant correlations. There was no significant correlation between the length and width or fresh weight, while a significant positive correlation was observed between the width and leaf fresh weight ($P < 0.01$). Significant positive correlations were also found between quantitative traits, while there was no correlation between qualitative and quantitative traits. These allow indirect selection to improve breeding efficiency. Cluster analysis showed that at the Euclidean distance of 20, all 21 individuals analyzed were clustered into four groups. Overall, the phenotypic traits of different groups were significantly different. Mutants are critical materials for studying the genetic regulation of mechanisms involved in the control of economically important *N. haitanensis* traits. Pigmented mutants are a dominant-marker trait used for breeding that have high value for theoretical research and practical applications. Our study identified many pigmented mutants that can be used to study relevant biological mechanisms. Nevertheless, the variation coefficients of four quantitative characters (length, width, fresh weight, and thickness) of the F_1 *N. haitanensis* generation were less than those of the control group and were biased towards negative variation. For example, more thin leaf mutants were obtained after the gamma rays' treatment. It is interesting as a thin *N. haitanensis* is more suitable for automatic processing, and its primary products can be reprocessed with higher added value. In conclusion, after being treated with γ -ray, the *N. haitanensis* blades were guided to variation enabling the selection and cultivation of new strains, from which strains with improved traits strains were selected. This study provides interesting materials for accelerating the *N. haitanensis* breeding research and the selection of excellent varieties.

Key words *Neoporphyra haitanensis*; Gamma ray; Enzymolysis; Mutant; Clustering analysis