

研究报告



出芽短梗霉细胞多形性及影响细胞分化因素探索

刘小胖¹ 王红岩² 张宁^{*1} 李炳学²

1 沈阳农业大学生物科学技术学院 辽宁 沈阳 110866

2 沈阳农业大学土地与环境学院 辽宁 沈阳 110866

摘要:【背景】出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是在生活史中有酵母状细胞生长阶段,并合成黑色素的一种黑酵母(Black yeast),具有典型的细胞多形性,可分化形成酵母状细胞(Yeast-like cell, YL)、膨大细胞(Swollen cell, SC)、厚垣孢子(Chlamydospore, CH)、菌丝(Hyphae, HY)、念珠状菌丝(Monilioid hyphae, MH)、有隔膜膨大细胞(Septate swollen cell, SSC)、分生组织状结构(Meristematic structure, MS),其中膨大细胞既可以作为生长的细胞类型,也可分化为其他的细胞类型。出芽短梗霉的形态分化是可控的,调控因子有 pH、温度、营养条件等。【目的】探究不同的氧气浓度、温度、盐浓度、营养水平对出芽短梗霉细胞形态的影响。【方法】利用显微镜、美兰染色等技术观察不同条件对出芽短梗霉细胞形态的影响。【结果】在完全无氧的试管底部菌体不能生长;在高层半固体表层(高氧气浓度),酵母状细胞(YL)在营养丰富的生长初期出芽繁殖,在养分匮乏的培养后期诱导酵母状细胞(YL)经过膨大细胞(SC)形成厚垣孢子(CH)并合成黑色素;在营养丰富的生长初期,半固体试管浅表层和中间层(微好氧)低浓度氧气诱导 YL 经过 SC 形成 HY 侵入性生长。养分差异对菌体细胞多形性分化影响显著,环境适宜养分丰富(Yeast extract peptone dextrose medium, YPD),以 YL 生长,不需要分化成 HY;环境适宜养分不丰富(Potato dextrose agar, PDA),分化成 SC 或 HY 以适应或逃离环境;环境不适宜养分匮乏时(Malt extract agar, MEA),SC 或 HY 分化成 CH 或 MH 进入休眠阶段。10% NaCl 胁迫降低菌体生长速度,抑制色素合成、HY 和 MH 的形成,并且细胞主要以 YL 生长繁殖。在相同质量浓度(10%)的 KCl 或 Na₂SO₄ 渗透胁迫条件下,细胞多形性表型均为 YL 发达, HY 及 MH 被抑制,说明高渗胁迫阻止了酵母状细胞向菌丝和厚垣孢子的分化。温度实验中,SC 比 YL 耐高温,MS 比 SC 耐高温。【结论】营养状态对出芽短梗霉细胞分化影响最大。

关键词: 出芽短梗霉, 细胞分化, 细胞多形性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31271818); National Key Research and Development Program of China (2017YFD200807-3); Natural Science Foundation of Liaoning Province (2015020763); Shenyang Key Science-technology Research and Development Program (F17-150-3-00)

***Corresponding author:** Tel: 86-24-88487163; E-mail: zhangning_66@163.com

Received: 17-06-2018; **Accepted:** 15-11-2018; **Published online:** 19-02-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31271818); 国家重点研发计划(2017YFD200807-3); 辽宁省自然科学基金(2015020763); 沈阳市重点科技研发计划(F17-150-3-00)

***通信作者:** Tel: 024-88487163; E-mail: zhangning_66@163.com

收稿日期: 2018-06-17; **接受日期:** 2018-11-15; **网络首发日期:** 2019-02-19

Exploration of cell polymorphisms and factors influencing cell differentiation of *Aureobasidium pullulans*

LIU Xiao-Pang¹ WANG Hong-Yan² ZHANG Ning^{*1} LI Bing-Xue²

¹ College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

² College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

Abstract: [Background] *Aureobasidium pullulans* belongs to “black yeast” and can synthesize melanin. *A. pullulans* displays characteristic polymorphic cell types, such as yeast-like cell (YL), swollen cell (SC), chlamydospore (CH), hyphae (HY), monilioid hyphae (MH), septate swollen cell (SSC), meristematic structure (MS). The swollen cell can be further differentiated into chlamydospore, monilioid hyphae, septate swollen cell and meristematic structure. The differentiation of *A. pullulans* can be regulated by various factors such as pH, temperature and nutritional conditions. **[Objective]** To study the effects of different oxygen density, temperature, osmotic pressure, pH value and nutrition level on the morphology of *A. pullulans* cells. **[Methods]** The microscopic techniques and methylene blue staining were used to observe the effects of different conditions on cell morphology of *A. pullulans*. **[Results]** Growth of *A. pullulans* was not observed under completely anaerobic condition. Under high oxygen condition, the yeast-like cells budded at the early nutrient-rich stage. However, once the nutrient was gradually used up, the yeast-like cells started to form swollen cell and then to chlamydospore. Under low oxygen condition, the yeast-like cell grew into HY through SC at the beginning of incubation when nutrients are rich. The different nutrient concentration had significant effects on the polymorphic differentiation of *A. pullulans*. Yeast-like cells were the main types of cells in the yeast extract peptone dextrose medium (YPD) medium with high nutrition and optimal ambient conditions. The YL cell differentiated into SC or HY to adapt to or escape the environment in the potato dextrose agar (PDA) medium. The malt extract agar (MEA) medium was nutrient deficient, therefore the SC or HY differentiated into dormant cell CH or MH. The 10% NaCl depressed the growth rate of *A. pullulans* and inhibited the synthesis of melanin. The effect of 10% KCl or 10% Na₂SO₄ on the cell differentiation of YL was the same as 10% NaCl, which suggests osmotic stress prevented the differentiation of yeast-like cells into hypha or chlamydospore. The SC was more resistant to high temperature than YL, but less resistant than MS. **[Conclusion]** Nutrition levels are the key factor regulating cell morphogenesis of *A. pullulans*.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, Cell differentiation, Cell polymorphisms

出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)是一种世界性分布的酵母状真菌,由于其产生黑色素因此俗称为黑酵母^[1]。出芽短梗霉具有复杂的生活史,有酵母状细胞(Yeast-like cell, YL)、膨大细胞(Swollen cell, SC)、有隔膜膨大细胞(Septate swollen cell, SSC)、厚垣孢子(Chlamydospore, CH)、菌丝(Hyphae, HY)等^[2-3]多种细胞形态,这些多形性细胞之间可以相互转变,属于真核细胞分化现象。在出芽短梗霉的生活史中,可以产生重油^[4]、普鲁兰多糖^[5-6]、苹果酸^[5,7-8]、 β -葡聚糖^[9]、黑色素、马索亚内酯^[10]、酸性漆酶^[11]。出芽短梗霉的细胞形态不同产物也会不同^[5-7],为了获得需要的产物,

系统研究出芽短梗霉在不同条件下的分化规律很有必要。

不同条件对出芽短梗霉细胞形态影响的研究主要在 20 世纪七八十年代,集中在酵母-菌丝体^[12-13]和酵母-厚垣孢子^[14-15]两形性转变两个方面。出芽短梗霉酵母和菌丝体形态的转变受许多环境因素影响,有菌株特异性,在液体培养基和固体培养基中表现很不相同^[12]。Moragues 等^[16]研究在无外加碳源的情况下, n-Alkanol 可以诱导酵母状细胞向菌丝体转化。Madi 等^[17]发现外源添加 Ca²⁺可以抑制酵母状细胞向菌丝体的转化,若限制供应 Ca²⁺,菌丝体的比例增加。出芽短梗霉还具有由酵母状细

胞分化形成厚垣孢子的特点, Brown 等^[18]研究发现氮源种类可以调控细胞分化, 当以铵类为氮源时, 细胞形态以酵母状细胞为主, 以硝态氮为氮源时, 主要是酵母状细胞和厚垣孢子, 且厚垣孢子细胞壁加厚^[18]并在胞壁中大量积累黑色素^[19]。Bermejo 等^[14]研究发现, pH 6.0 时出芽短梗霉以酵母状细胞生长繁殖, 不形成膨大细胞和厚垣孢子。厚垣孢子由培养基不利环境诱导, pH 降到 3.0 以下是形成厚垣孢子的必需条件^[14,20]。孔维甲等^[21]研究发现, 在最适 pH 条件下出芽短梗霉生长繁殖以酵母状细胞和膨大细胞为主, 证明膨大细胞是菌体形态转化的中心环节。有研究发现假丝酵母和白色念珠菌在不同的 pH 条件下会有酵母细胞和菌丝体的相互转化以适应特定的环境^[22], 在环境 pH 不适时酵母状细胞分化为假菌丝, 当环境 pH 适宜时假菌丝可以出芽产生后代^[23]。

出芽短梗霉 NG 是本实验室从草莓果实分离得到的, 具有较强的吸附和定殖能力, 可以抑制草莓灰霉病。作为高产普鲁兰多糖的菌株, 其在不同的培养基中发酵液颜色不同, 菌体的颜色也不同。在菌体发酵过程中还会产生酸性漆酶类物质^[11], 可降解染料和氯酚^[24]等物质。本文主要研究了营养水平和温度、氧气、渗透压等环境条件影响细胞多形性分化的规律, 确定调控出芽短梗霉细胞分化的重要环境因子, 从而建立出芽短梗霉细胞分化的调控模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

出芽短梗霉 NG, 本实验室保藏菌株。

1.1.2 培养基

种子培养基 YND (g/L): 葡萄糖 20.0, NaNO_3 6.4, 酵母浸粉 0.2, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 6.0±0.5。

土豆培养基 PDA (g/L): 葡萄糖 20.0, 去皮土豆 200.0, pH 自然。

YAD 培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, 酵母浸粉

0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 1.0, pH 6.0±0.5。

产糖培养基 YPD (g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 20.0, 酵母浸粉 10.0, pH 6.0±0.5。

麦芽糖培养基 MEA (g/L): 麦芽浸膏 20.0, pH 6.0±0.5。

以上所有培养基, 固体培养基均加 2% 的琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨、麦芽浸膏、磷酸二氢钾、硫酸镁等均是国产分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

台式恒温振荡器, 上海精宏实验设备有限公司; 恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 光学显微镜, 奥林巴斯公司; 紫外可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; pH 计, 赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 种子液培养

将 PDA 斜面于 28 °C 活化 24 h 的菌种接种到 YND 液体培养基, 180 r/min 振荡培养 24 h 作为预种子液, 以体积比 1% 接种 YND 液体培养基, 180 r/min 振荡培养 24 h 成为种子液。

1.2.2 菌落培养特征

将 PDA 斜面于 28 °C 活化 24 h 的菌种划线法或点接法接种到 PDA、MEA 等平板表面, 28 °C 倒置培养 7 d, 每天观察菌落特征。

1.3 细胞多形性分化及其影响因素

探究不同条件对出芽短梗霉细胞多形性影响时, 所有液体培养的菌液取 100 μL 制片, 若菌体浓度过大, 稀释到适当浓度, 然后再取 100 μL 制片, 然后在显微镜的视野里随机选取 100 个单细胞进行细胞形态观察和大小测定。用显微镜拍照, 记录菌体形态, MiE 软件(Olympus)测量细胞大小。

1.3.1 氧气浓度

将 OD_{560} 约 3.0 的液体种子 100 μL , 用移液管混匀法接种到 10 mL 高层半固体 PDA (0.5% 琼脂) 试管中, 28 °C 静置培养 7 d。在高层半固体表层(高

氧气浓度)、中间层(微好氧)、深层(低氧气浓度)分别取样制成药 1 cm×1 cm 琼脂块,每天用显微镜观察氧气浓度对菌体细胞多形性分化的影响。

1.3.2 营养条件

将 OD_{560} 约 3.0 的液体种子 100 μ L, 涂抹法接种于高营养水平的 YPD、中等程度的养分水平的 PDA、低营养水平的 MEA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 静置培养。每天观察菌落形态特征, 用显微镜拍照, 记录菌体形态。

1.3.3 盐胁迫

在 PDA 固体培养基中添加 0 (对照)、1%、5%、10% 的 NaCl 或 10% KCl 和 10% Na_2SO_4 , 制备平板。将 OD_{560} 约 3.0 的液体 100 μ L, 涂抹法接种于固体平板(9 cm)表面, 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d。在表层取样制成药 1 cm×1 cm 琼脂块, 每天用显微镜观察盐胁迫对菌体细胞多形性分化的影响。

1.3.4 温度

将 OD_{560} 约 3.0 的液体种子 100 μ L 接种于 5 mL PDA 液体培养基, 分别于 28 (对照)、32、34 $^{\circ}$ C 控温 180 r/min 振荡培养 24 h。取样 100 μ L 制片, 显微镜观察温度对菌体细胞多形性分化的影响。在显微镜的视野里每样品随机选取 100 个单细胞, 记

录各种细胞的数量(美兰染色区分死活细胞, 分别计数), 每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 出芽短梗霉细胞多形性

出芽短梗霉菌株均有典型的细胞多形性特征, 具有酵母状细胞、膨大细胞、厚垣孢子和菌丝(表 1)。

2.2 菌落培养特征

出芽短梗霉 NG 在固体 PDA 培养基上, 1–2 d 菌落中心乳白色光滑湿润, 粘稠易挑起, 边缘菌丝发达(图 1A)。3 d 后菌落中心变黑, 菌落边缘菌丝也变黑。在 MEA 平板上, 由于营养不如 PDA 丰富, 出芽短梗霉 NG 菌落边缘菌丝发达, 菌落中心在培养 1–2 d 不湿润粘稠, 不易挑起。在 1 d 后菌丝迅速变黑(图 1B)。在 YAD 平板上, 出芽短梗霉 NG 菌落干燥不湿润, 边缘菌丝不发达。1–2 d 菌落为脏白色, 3 d 后变为黄色, 7 d 后逐渐转为暗黑色(图 1C)。在 YND 平板上, 出芽短梗霉 NG 菌落特征与在上述其他培养基上特征显著不同。7 d 内菌落保持乳白色光滑湿润, 粘稠易挑起, 边缘菌丝不发达, 无色素合成(图 1D)。

表 1 出芽短梗霉多形性细胞特性

Table 1 Characteristics of various polymorphic cells of *A. pullulans*

Characteristics cell type	Polymorphism size (μ m)	Thickening of cell wall	Melain	Physiological function
酵母状细胞	椭圆或长圆	—	—	生长
Yeast like (YL)	Ellipse or long round (8.28 ± 1.01) \times (3.76 ± 0.71)			Growth
膨大细胞	圆或长圆	—	—	生长
Swollen cell (SC)	Round or long round (10.8 ± 1.21) \times (8.76 ± 1.54)			Growth
有隔膜膨大细胞	短链状	—	—	抗逆
Septate swollen cell (SSC)	Short chain			Resistance
厚垣孢子	圆形	+	+	休眠
Chlamydospore (CH)	Round (10.93 ± 1.08) \times (8.98 ± 1.39)			Dormancy
真菌丝	丝状	—	—	扩展
Hyphae (HY)	Filaments			Spread
念珠状菌丝	长念珠状	+	+	休眠
Monilioid hyphae (MH)	Long monilioid			Dormancy
分生组织结构	分生组织状	—	—	抗逆
Meristematic structure (MS)	Meristematic			Resistance

注: +: 有; -: 没有.

Note: +: Have; -: No.

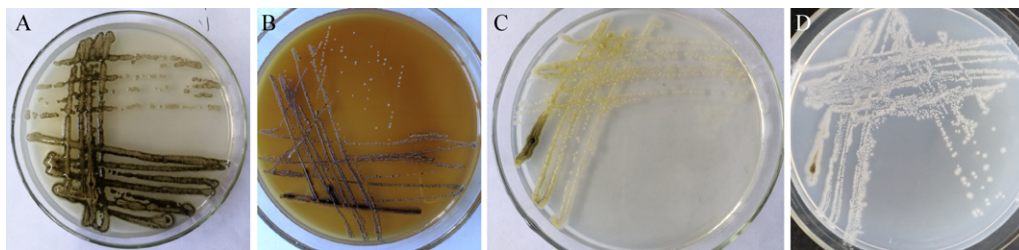


图1 出芽短梗霉菌落培养特征

Figure 1 Characteristics of colony of *A. pullulans*

注: A: PDA 平板; B: MEA 平板; C: YAD 平板; D: YND 平板.

Note: A: PDA; B: MEA; C: YAD; D: YND.

2.3 不同条件对细胞形态的影响

2.3.1 氧气浓度

出芽短梗霉 NG 属于兼性好氧真菌。在高层半固体表层(高氧气浓度), 酵母状细胞在营养丰富的生长初期(1–2 d)出芽繁殖, 在培养后期(3 d)养分匮乏诱导 YL 经过 SC 形成 CH 并合成黑色素(图 2A)。在营养丰富的生长初期(1–2 d), 高层半固体试管浅表层和中间层(微好氧)低浓度氧气诱导 YL 经过 SC 形成 HY 侵入性生长(图 2B 和 2C)。中间层比浅表层氧气浓度低, HY 更发达, 利于菌株逃离厌

氧环境。

2.3.2 营养条件

在高营养水平的 YPD 平板上, 出芽短梗霉 NG 以 YL 生长繁殖为主, 7 d 后也很少形成休眠的 CH, 菌落边缘 HY 不发达(图 3A)。在中等程度的养分水平的 PDA 平板上, 先以 YL 生长繁殖为主, 1 d 后就有大量 SC 和 CH 发育, 同时有 HY 出现在菌落边缘(图 3B)。在低营养水平的 MEA 平板上, 不能以 YL 为主生长繁殖, 1 d 后形成发达的 HY, 7 d 后形成 MH 进入休眠(图 3C)。

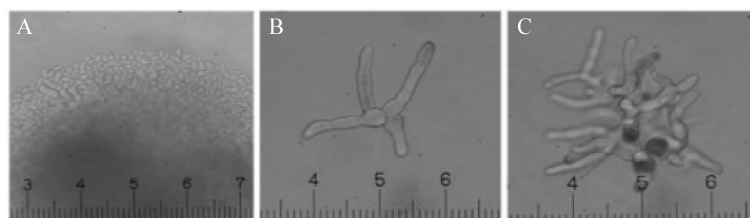


图2 氧气浓度对出芽短梗霉细胞分化的影响

Figure 2 Cell differentiation of *A. pullulans* affected by oxygen concentration

注: A: 表层; B: 浅表层; C: 中间层.

Note: A: Surface layer; B: Subsurface layer; C: Mesosphere.

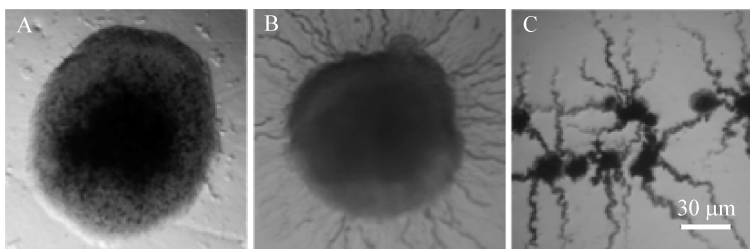


图3 营养条件对出芽短梗霉菌落形态的影响

Figure 3 Morphology of *A. pullulans* colonies affected by nutrition level

注: A: YPD 上不形成菌丝; B: PDA 菌落边缘菌丝分化; C: MEA 菌丝状菌落.

Note: A: No hyphae (HY) generate on YPD; B: HY generate at colony edge on PDA; C: HY type colony on MEA.

2.3.3 盐胁迫

出芽短梗霉 NG 在 1% NaCl 平板上生长无影响; 5% NaCl 平板上菌落变黑延迟 24 h; 在 10% NaCl 平板上生长延迟 24 h, 菌落不变黑, 菌体可以生长繁殖形成乳白色光滑的酵母状菌落(图 4D)。菌体以酵母状细胞为主, 可形成部分膨大细胞, 无厚垣孢子和菌丝形成。以 10% NaCl 平板上的细胞接种在 PDA 平板, 菌落变黑的性状恢复。

10% NaCl 胁迫降低菌体生长速度, 抑制色素合成。10% NaCl 部分抑制 HY 及 MH 形成, 细胞以 YL 为主生长繁殖(图 4D)。在相同质量浓度(10%)的 KCl 或 Na₂SO₄ 渗透胁迫条件下, 细胞多形性表型均为 YL 发达, HY 及 MH 被抑制, 说明高渗胁迫阻止了酵母状细胞向菌丝和厚垣孢子的

分化(图 5B 和 C)。

2.3.4 温度

出芽短梗霉 NG 在 28 °C PDA 液体培养以 YL 生长繁殖(图 6A), YL 及其芽孢占活细胞总数 $97.13\% \pm 1.33\%$, 仅有少量分化成 SC ($2.87\% \pm 1.33\%$)。在 32 °C YL 分化为 SC, SC 横隔分裂形成 SSC 或出芽形成 SCB (图 6B), SC 和 SCB 占活细胞比例达 $79.09\% \pm 7.76\%$, YL 仅有 $18.92\% \pm 8.92\%$ 。在 34 °C 高温胁迫条件下, SC 或 SSC 多向分裂形成 MS (图 6C), MS 成为主要细胞类型(占 $86.37\% \pm 3.76\%$)抵抗逆境。YL 的死亡率随温度升高而升高, 在 28、32、34 °C 分别为 36.50%、75.93% 和 94.23%; SC 的死亡率始终保持在 30% 以下(图 7B)。

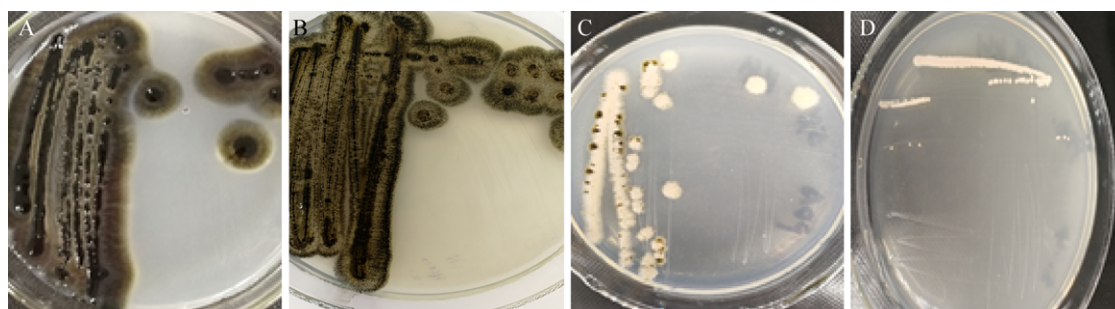


图 4 盐胁迫下出芽短梗霉菌落特征

Figure 4 Characteristics of colony of *A. pullulans* under salt stress

Note: A: PDA; B: 1% NaCl; C: 5% NaCl; D: 10% NaCl.

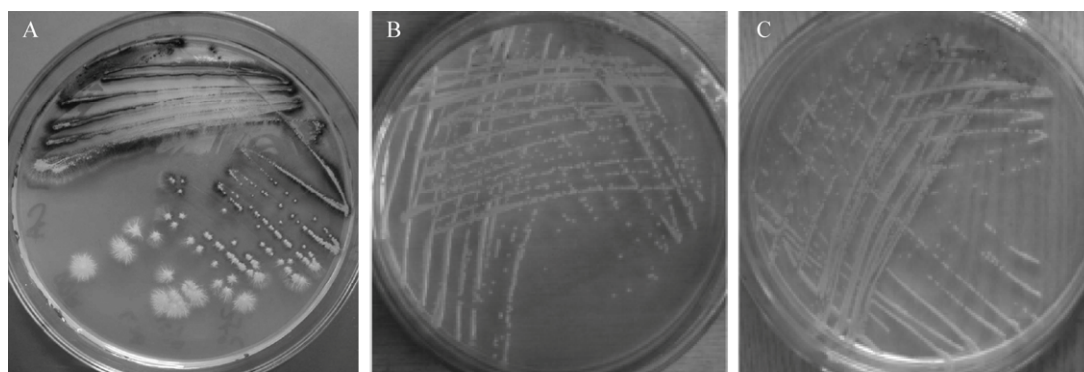


图 5 高渗胁迫影响出芽短梗霉细胞分化

Figure 5 Cell differentiation of *A. pullulans* affected by osmotic pressure

Note: A: PDA; B: 10% KCl; C: 10% Na₂SO₄.

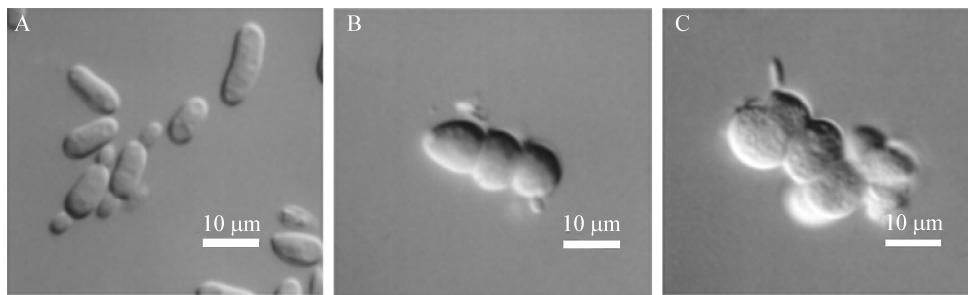


图 6 高温胁迫影响出芽短梗霉细胞分化

Figure 6 Cell differentiation of *A. pullulans* affected by high temperature stress

注: A: 酵母状细胞 28 °C 出芽生殖; B: 膨大细胞 32 °C 出芽或横隔分裂; C: 34 °C 形成分生组织状结构. 标尺: 10 μm.

Note: A: Yeast like (YL) budded at 28 °C; B: Swollen cell budded or septated at 32 °C; C: MS was formed at 34 °C. Bar: 10 μm.

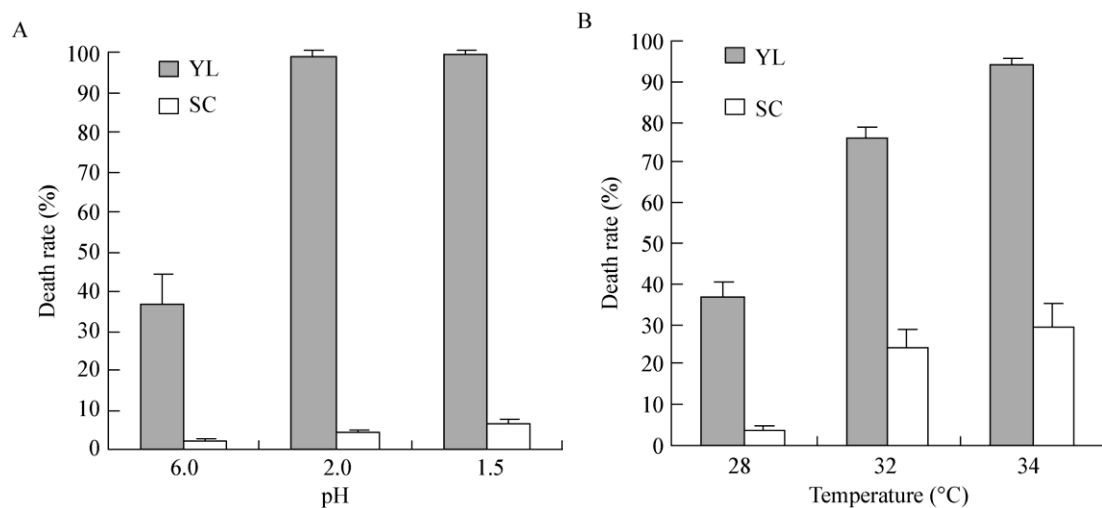


图 7 pH (A)或高温(B)胁迫对细胞死亡率的影响

Figure 7 The cell death rate of yeast cell and swollen cell under acid stress (A) or high temperature stress (B)

注: *: $P < 0.005$; **: $P < 0.0005$, 以 pH 6.0 或 28 °C 为对照.

Note: *: $P < 0.005$; **: $P < 0.0005$, compared to pH 6.0 or 28 °C respectively.

3 讨论与结论

出芽短梗霉 NG 的细胞形态转变具有一定的规律性(图 8), 在固体平板上, 与培养基接触的 YL 细胞因氧气浓度不足经 SC 分化为 HY, 营养不充足(MEA)促进 SC 向 HY 分化。在液体培养过程中, 氧气浓度相对充足, 菌株 NG 较少有菌丝分化出现。10% NaCl、10% KCl 或 10% Na₂SO₄ 胁迫(图 5)降低菌体生长速度, 抑制黑色素合成、HY 及 MH 的形成, 细胞以 YL 为主生长繁殖。在高温或酸性胁迫条件下出芽短梗霉 NG 形成分生组织结构(图 6), 使菌体以群体方式生长抵抗高温逆

境, 而一般的真菌中只有孢子和厚垣孢子抗性较强^[25]。多形性变化与 pH 密切相关^[6], 当 pH 为 6.0 时, 出芽短梗霉 NG 以酵母状细胞生长繁殖, 不形成膨大细胞和厚垣孢子^[6,14]。厚垣孢子在对数生长期末由培养基不利环境诱导, pH 降到 3.0 以下是形成厚垣孢子的必需条件^[14,20]。酵母状细胞经由膨大细胞转变成厚垣孢子, 厚垣孢子细胞壁加厚^[18], 并在胞壁中大量积累黑色素^[19]。

环境酸碱度^[6]和营养水平对细胞分化的诱导作用表现一定的规律。营养匮乏和环境酸化(pH≤3.0)双重不利条件下, 不论在固体平板上或在

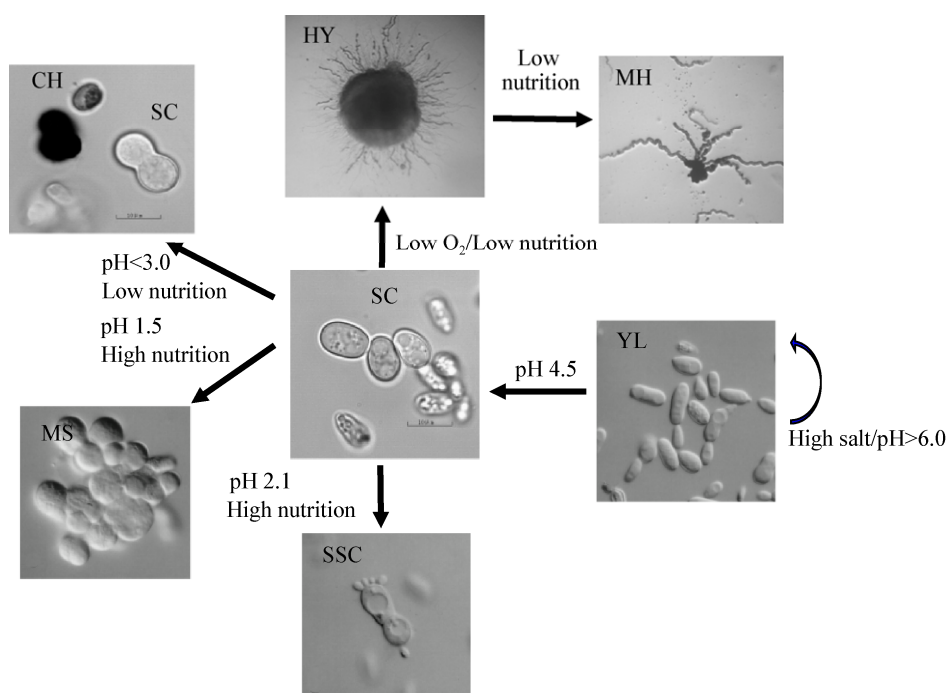


图 8 出芽短梗霉细胞多形性及影响因素^[6]

Figure 8 Cell polymorphisms and factors influencing cell differentiation of *A. pullulans*^[6]

培养液中, 出芽短梗霉细胞均分化为休眠孢子 CH 或 MH。在固体平板上, pH>6.0 时(YND 平板), YL 不分化。环境 pH 4.5 可以诱导 YL 分化成 SC, 此时即使同时营养物匮乏, 也并不继续分化形成 CH。环境 pH 和营养水平是诱导细胞分化的主要因子^[6,21], 使得深入研究出芽短梗霉细胞分化成为可能。

在出芽短梗霉 NG 的多种细胞形态中, 厚垣孢子^[26]产生黑色素, 黑色素^[27]能够帮助出芽短梗霉抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等多种逆境。本实验中养分匮乏诱导膨大细胞 SC 分化为休眠的厚垣孢子, 合成大量黑色素。出芽短梗霉 NG 在 10% NaCl 条件下黑色素合成受抑制^[27]。赵博等^[28]发现出芽短梗霉黑色素具有一定的抗氧化能力。Yu 等^[29]研究发现出芽短梗霉对重金属的吸附能力与其黑色素分泌有关。因此, 出芽短梗霉在重金属污染的治理和在抗氧化方面具有广泛应用前景。

出芽短梗霉作为产普鲁兰多糖的重要菌株, 在发酵后期会伴随有黑色素的产生, 这对普鲁兰多糖的纯化造成一定的困难^[30]。如果能有效地控制细胞

向厚垣孢子分化, 从而有效地减少黑色素的分泌, 对工业生产无色素污染普鲁兰多糖具有重要意义。

国内外系统开展培养条件对出芽短梗霉分化规律影响的研究还很少。由于出芽短梗霉遗传背景还不清楚, 关于出芽短梗霉细胞分化的研究还没有深入到分子水平。本研究找到了控制细胞分化的主要影响因素, 可以通过精确调节环境条件控制细胞分化, 从而获得 YL、SC 或 CH 3 种类型细胞, 分别研究它们的生理生化特点、细胞结构和代谢产物。对分离获得的不同种类的细胞进行转录组测序比较分析, 有助于从分子水平上揭开出芽短梗霉细胞分化的奥秘。

REFERENCES

- [1] de HG. A key to the anamorph genera of yeastlike archi- and euascomycetes[A]//The Yeasts: A Taxonomic Study[M]. 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998: 123-125
- [2] Ramos S, García Acha I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1975, 64(1): 129-135, IN8-IN9
- [3] Pechak DG, Crang RE. An analysis of *Aureobasidium pullulans* developmental stages by means of scanning electron microscopy[J]. Mycologia, 1977, 69(4): 783-792

- [4] Nagata N, Nakahara T, Tabuchi T. Fermentative production of poly(β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp.[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(4): 638-642
- [5] Campbell BS, Siddique ABM, McDougall BM, et al. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production?[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 232(2): 225-228
- [6] Li BX, Zhang N, Peng Q, et al. Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(2): 293-300
- [7] Wu YL, Ma X. Preparation and application of poly-malic acid[J]. China Brewing, 2012, 31(4): 14-17 (in Chinese)
吴艳丽, 马霞. 聚苹果酸的发酵制备及其应用[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 14-17
- [8] Wei PL, Cheng C, Lin M, et al. Production of poly(malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: kinetics and process economics[J]. Bioresource Technology, 2016, 224: 581-589
- [9] Kang BK, Yang HJ, Choi NS, et al. Production of pure β -glucan by *Aureobasidium pullulans* after pullulan synthetase gene disruption[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(1): 137-142
- [10] Luepongattana S, Thaniyavarn J, Morikawa M. Production of massoia lactone by *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 isolated from the Gulf of Thailand and its fragrant biosurfactant properties[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(6): 1488-1497
- [11] Wang HJ, Kong WJ, Jin JZ, et al. Extracellular acidic laccase by *Aureobasidium pullulans*[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(2): 17-20 (in Chinese)
王慧娟, 孔维甲, 靳建忠, 等. 出芽短梗霉胞外酸性漆酶[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 17-20
- [12] Gadd GM, Cooper LA. Strain and medium-related variability in the yeast-mycelial transition of *Aureobasidium pullulans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1984, 23(1): 47-49
- [13] Park D. Inorganic nitrogen nutrition and yeast-mycelial dimorphism in *Aureobasidium pullulans*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1982, 78(3): 385-388
- [14] Bermejo JM, Dominguez JB, Goñi FM, et al. Influence of pH on the transition from yeast-like cells to chlamydo spores in *Aureobasidium pullulans*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1981, 47(5): 385-392
- [15] Bermejo JM, Dominguez JB, Goñi FM, et al. Influence of carbon and nitrogen sources on the transition from yeast-like cells to chlamydo spores in *Aureobasidium pullulans*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1981, 47(2): 107-119
- [16] Moragues MD, Estevez JJ, Rementería A, et al. Effect of *n*-alkanols on acidification curves of *Aureobasidium pullulans* suspensions[J]. Experimental Mycology, 1994, 18(1): 1-6
- [17] Madi N, McNeil B, Harvey LM. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21(2): 102-107
- [18] Brown RG, Hanic LA, Hsiao M. Structure and chemical composition of yeast chlamydo spores of *Aureobasidium pullulans*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1973, 19(2): 163-168
- [19] Dominguez JB, Goñi FM, Uruburu F. The transition from yeast-like to chlamydo spore cells in *Pullularia pullulans*[J]. Microbiology, 1978, 108(1): 111-117
- [20] Park D. Low pH and the development of large cells in *Aureobasidium pullulans*[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1984, 82(4): 717-720
- [21] Kong WJ, Xu Q, Jin JZ, et al. Environment pH to induce polymorphism cell differentiation of *Aureobasidium pullulans*[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(2): 7-12 (in Chinese)
孔维甲, 徐琼, 靳建忠, 等. 环境 pH 诱导出芽短梗霉细胞多形化[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 7-12
- [22] Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, et al. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(6): 291-300
- [23] Lamb TM, Mitchell AP. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(2): 677-686
- [24] Zhao L. Characterization of laccase activity substance of *Aureobasidium pullulans* (UVMU3-1) and their degradation in chlorophenol[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese)
赵乐. 出芽短梗霉(UVMU3-1)漆酶活性物质性质分析及其降解氯酚的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2017
- [25] Wollenzien U, de Hoog GS, Krumbein W, et al. *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 71(3): 281-288
- [26] Gadd GM. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1980, 9(3): 237-240
- [27] Li BX, Li Y. Yeast like fungi producing melanin[J]. Microbiology China, 2008, 35(11): 1791-1796 (in Chinese)
李炳学, 李颖. 产黑色素酵母状真菌[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1791-1796
- [28] Zhao B, Qiao CS, Wang JM, et al. Study on antioxidant activities of melanin of *Aureobasidium pullulans*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(6): 108-112 (in Chinese)
赵博, 乔长晟, 汪建明, 等. 出芽短梗霉黑色素的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(6): 108-112
- [29] Yu XH, Gu ZX, Shao R, et al. Study on adsorbing chromium (VI) ions in wastewater by *Aureobasidium pullulans* secretion of melanin[C]//Advanced Materials Research. Trans Tech Publications, 2011, 156: 1378-1384
- [30] Kachhawa DK, Bhattacharjee P, Singhal RS. Studies on downstream processing of pullulan[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 52(1): 25-28