

基于转录组分析紫色红曲霉全局性转录调控因子 McrA 的功能

潘妍妍, 杨季学, 于宗训, 胡佳燕, 蒋冬花*

浙江师范大学 生命科学学院, 浙江 金华

潘妍妍, 杨季学, 于宗训, 胡佳燕, 蒋冬花. 基于转录组分析紫色红曲霉全局性转录调控因子 McrA 的功能[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 284-300.

PAN Yanyan, YANG Jixue, YU Zongxun, HU Jiayan, JIANG Donghua. Transcriptome analysis reveals the function of the global transcriptional regulator McrA in *Monascus purpureus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(1): 284-300.

摘要: 红曲霉作为传统发酵食用菌因其丰富的次级代谢产物广泛应用于酿酒、食品着色剂和药品等行业。McrA 是在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中发现的全局性转录调控因子, 具有调控丝状真菌生长发育和次级代谢的作用。前期, 实验室已找到并克隆了紫色红曲霉(*Monascus purpureus*)中的 *mcrA* 基因。【目的】基于转录组分析 $\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 差异表达基因, 探究 *mcrA* 基因的功能。【方法】利用同源重组的方法构建 $\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 菌株, 观察其在不同培养基上的菌落和显微形态, 测定红曲色素和桔霉素产量, 并进行转录组测序分析差异表达基因涉及的代谢通路。【结果】敲除株 $\Delta mcrA$ 的红曲色素和桔霉素产量下降。转录组测序结果显示, $\Delta mcrA$ 菌株有 111 个基因上调, 47 个基因下调。 $\Delta mcrA$ 菌株差异基因涉及的代谢通路主要有糖酵解、丙酮酸代谢、脂肪酸合成、酪氨酸代谢等。*trpC:mcrA* 菌株有 1 199 个基因上调, 867 个基因下调。*trpC:mcrA* 差异基因涉及的代谢通路主要有色氨酸代谢、蔗糖和淀粉代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、脂肪酸降解等。【结论】McrA 作为全局性转录调控因子, 敲除和过表达会影响糖类、脂质、氨基酸相关代谢通路, 进而影响次级代谢产物产量。

关键词: 紫色红曲霉; 全局性转录调控因子 McrA; 次级代谢产物; 调控基因

资助项目: 国家自然科学基金(31270061, 31570013); 国家级大学生创新创业训练计划(202410345060)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270061, 31570013) and the National College Students Innovation Training Program (202410345060).

*Corresponding author. E-mail: jdh@zjnu.cn

Received: 2025-07-02; Accepted: 2025-09-03; Published online: 2025-09-24

Transcriptome analysis reveals the function of the global transcriptional regulator McrA in *Monascus purpureus*

PAN Yanyan, YANG Jixue, YU Zongxun, HU Jiayan, JIANG Donghua*

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang, China

Abstract: *Monascus*, as a genus of edible fungi used in fermentation, are widely used in various industries such as wine making, food colorants, and pharmaceuticals due to their abundant secondary metabolites. McrA, a global regulator discovered in *Aspergillus nidulans*, has the function of regulating the growth and secondary metabolism of filamentous fungi. We had identified and cloned *mcrA* in *Monascus purpureus* in the previous study. **[Objective]** On the basis of transcriptome analysis, we mined the differentially expressed genes (DEGs) of $\Delta mcrA$ and *trpC:mcrA* strains to explore the function of *mcrA*. **[Methods]** The knockout strain $\Delta mcrA$ and overexpression strain *trpC:mcrA* of *M. purpureus* were constructed by homologous recombination. The colonies and microscopic morphology on different media were observed. The yields of *Monascus* pigments and citrinin were determined. The metabolic pathways involving DEGs were analyzed by transcriptome sequencing. **[Results]** The yields of *Monascus* pigments and citrinin of $\Delta mcrA$ decreased. Transcriptome sequencing results showed that the $\Delta mcrA$ strain up-regulated 111 genes and down-regulated 47 genes. The metabolic pathways involving the DEGs of $\Delta mcrA$ were mainly glycolysis, pyruvate metabolism, fatty acid synthesis, tyrosine metabolism and so on. The *trpC:mcrA* strain up-regulated 1 199 genes and down-regulated 867 genes. The main metabolic pathways involving the DEGs of *trpC:mcrA* were tryptophan metabolism, sucrose and starch metabolism, arginine and proline metabolism, fatty acid degradation, etc. **[Conclusion]** McrA is a global transcriptional regulator, and the knockout and overexpression of its gene will affect carbohydrate, lipid, and amino acid-related metabolic pathways, thus affecting the production of secondary metabolites.

Keywords: *Monascus purpureus*; global transcriptional regulator McrA; secondary metabolite; regulatory genes

紫色红曲霉是一类有益的丝状真菌，同时具有无性和有性^[1] 2种繁殖方式。无性繁殖通过产生分生孢子进行，有性繁殖则通过产生子囊孢子实现。红曲霉能产生丰富的次级代谢产物^[2-3]，包括红曲色素、桔霉素、莫纳可林 K 等。红曲色素(*Monascus* pigments)是一类氮杂环丙酮类化合物，其合成途径与聚酮化合物类似，由黄色素、橙色素和红色素组成。早在 2013 年，谢娜娜^[4]在红色红曲霉中克隆出控制红曲色素的

相关基因簇，该基因簇长度约 50 kb，由 17 个基因组成，被命名为 *MpigA-MpigQ*。其中，*MpigA* 为聚酮合酶^[5]，敲除该基因后红曲霉菌株 M7 不再产生红曲色素，但桔霉素产量提高了 2.8 倍，说明该基因为红曲色素合成的关键基因，且对桔霉素的合成有一定影响。*MpigB* 基因是 Zn(II)₂cys₆ 型转录因子，研究表明缺失株不再产生红曲色素，而将由 *trpC* 强启动子驱动的 *MpigB* 基因导入缺失株后发现菌株恢复了产

生红曲色素的能力,证实了 *MpigB* 基因是红曲色素合成的关键基因^[6]。*MpigC* 介导的 ω -2 还原是合成红曲色素吡喃二酮双环的前提条件^[7]。*MpigD* 为酰基转移酶,研究表明其参与色素产物聚酮化合物中间体的形成^[8-9]。敲除 *MpigE* 基因后,菌株只产生少量红色素和 4 种黄色素,不再产生橙色素^[10]。*MpigF* 为还原酶基因,该基因失活会导致橙色素合成能力下降,但对黄色素合成无影响^[11]。*MpigG* 编码酯酶结构域蛋白,相关研究表明其在聚酮化合物合成中的作用主要是使吡喃环闭合;敲除该基因对色素种类无影响,但黄色素产量下降^[12]。*MpigH* 是还原酶基因,在紫色红曲霉中敲除该基因后导致黄色素产量下降约一半,橙色素和红色素产量上升,说明该基因主要控制黄色素合成^[13]。*MpigJ* 和 *MpigK* 为同一个脂肪链合成酶基因簇编码的脂肪链合成酶 MpFAS2 的异二聚体,其中 *MpigJ* 为 α 亚基, *MpigK* 为 β 亚基,敲除该基因后发现菌株不再产生红曲色素,而是积累了大量中间化合物,主要是红曲松 A,说明该基因在红曲色素的产生中不可或缺^[14]。*MpigL* 是锚定蛋白,主要负责色素转运,敲除该基因后发现生长 3-7 d 时与野生型相比黄色素产量下降,后期 9-11 d 黄色素产量与野生型相当^[15]。*MpigM* 是 P450 单加氧酶,敲除该基因后导致代谢产物改变,红曲色素不再产生^[16]。*MpigN/O* 敲除后发现发酵液中检测不到红曲色素,只有色素合成的前体物质^[17],说明 *MpigN/O* 是红曲色素合成的必要条件。敲除 *MpigQ* 后菌株无明显变化^[4]。除此之外,研究发现同时缺失 *MpigJ-MpigR* 8 个基因后菌株产生大量黄色素,为苯甲醛衍生物,证实该物质为红曲色素中间体^[18]。

McrA 作为全局性转录调控因子,在构巢曲霉中发现敲除 *mcrA* 基因会导致分生孢子数量下降,影响孢子活力,次级代谢产物杂色曲霉素产量上升,同时增加了一些未知次级代谢产物的种类^[19]。在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中发现 *mcrA* 敲除株菌落颜色由黑色变成黄色,对次级代谢产

物进行鉴定的结果表明 3 种化合物中有 2 种产量上升,1 种产量下降,说明其参与菌株次级代谢产物产量和种类等方面的调控^[20]。2020 年,在温曲霉(*Aspergillus wentii*)中利用 CRISPR-Cas9 技术敲除 *mcrA* 基因,激活了沉默的基因簇,增加了次级代谢产物的产量^[21]。目前,已经在紫色红曲霉和黄曲霉中找到了 *mcrA* 基因,发现其与构巢曲霉有较高同源性,生物信息学分析表明 *mcrA* 基因长 1 356 bp,其中含有 3 个外显子和 2 个内含子,编码 410 个氨基酸,与构巢曲霉序列比对蛋白相似性高达 64%^[22-23]。预测结果显示, McrA 属于亲水蛋白,可能位于细胞核,基因含有 54 个潜在的磷酸化位点;可能存在 5 个转录因子结合位点;蛋白结构大部分为无规则卷曲,整体结构较松散。本研究通过构建紫色红曲霉 *mcrA* 敲除株和过表达株,对其进行生长代谢分析及转录组测序,研究 *mcrA* 基因在紫色红曲霉中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

紫色红曲霉 Mp-21 从市售红曲米中分离得到。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司,农杆菌感受态细胞 AGL-1 购自上海唯地生物技术有限公司。

pCB1003 质粒用于克隆潮霉素基因;敲除载体 pKO1B 质粒由浙江大学农业与生物技术学院王政逸教授惠赠;过表达载体质粒 pCAMBIA3300 购自长沙艾碧维生物科技有限公司。pSlient-Dual1 质粒用于克隆新霉素抗性基因 *neo* 与 *trpC* 启动子基因,该质粒购自武汉森灵生物科技有限公司。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯葡萄糖培养液(PDB)、Luria-Bertani 培养基(LB)、诱导培养基(IM)、共培养诱导培养基(Co-IM)、麦芽提取物琼脂培养基(MEA)、25% 甘油硝酸

盐琼脂培养基(G25N)、察氏酵母膏琼脂培养基(CYA)、酵母浸粉蔗糖培养基(YES)等, 其配方和配制方法参考文献[24]。

1.3 主要试剂和仪器

LA Taq DNA Polymerase、*Kpn* I、*Hind* III、T4 DNA ligase、PrimeSTAR HS DNA Polymersae、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR、HotStart 2×SYBR Green qPCR Master Mix、新霉素, 合肥海博莱生物技术有限公司。*Taq* PCR Master Mix、AxyPrep DNA Gel Extraction Kit、DL1000 DNA marker、DL2000 DNA marker、DL5000 DNA marker、DL10000 DNA marker, 北京科奥科技有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司。

1.4 *mcrA* 敲除载体的构建

挑取紫色红曲霉 Mp-21 的菌丝, 使用 DNA 提取试剂盒获得 DNA 作为模板。根据 *mcrA* 基因序列, 在 MycoCosm 中找到 *mcrA* 基因上下游序列, 利用 Primer 5 软件设计克隆 *mcrA* 基因 5' 侧翼及 3' 侧翼、潮霉素基因的引物, 具体设计原理参考文献[25], 引物具体序列见表 1。*mcrA*-5F、*mcrA*-3R 引物分别带有 *Kpn* I、*Hind* III 酶切位点, *mcrA*-5R 和 *mcrA*-3F 分别带有部分潮霉素序列。PCR 反应体系 (25 μ L): DNA 模板 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, *LA Taq* DNA Polymerase

(5 U/ μ L) 0.25 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 10×*LA* PCR Buffer 2.5 μ L, 无菌水 15.75 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 57 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。参考文献[24]的方法将 *mcrA* 基因 5' 侧翼、*hph*、*mcrA* 基因 3' 侧翼进行连接, 将连接产物割胶回收进行测序验证。用限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 同时切割 *mcrA* 敲除盒和 pKO1B 载体, 使其具有相同的黏性末端, 再用 T4 DNA 连接酶连接 2 个片段, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行验证, 得到 pKO1B-*mcrA* 敲除载体, 将其转化至农杆菌 AGL-1。

1.5 *mcrA* 过表达载体的构建

具体原理及方法与敲除载体构建相似, 利用 Primer 5 软件设计克隆 *mcrA* 5' 侧翼、*neo* 基因、*trpC* 基因、*mcrA* 基因编码区及 3' 侧翼的引物。引物具体序列见表 2, *2mcrA*-5F、*2mcrA*-3R 分别带有 *Kpn* I、*Hind* III 的酶切位点, *2mcrA*-5R 带有部分 *neo* 基因序列, *trpC* 启动子带有部分 *neo* 基因序列, *2mcrA*-3F 带有部分 *trpC* 启动子序列。利用 PCR 技术扩增出构建 *mcrA* 基因过表达盒的 4 个片段。PCR 体系与敲除载体构建一致, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。先将 *mcrA* 5'、*neo*、*trpC* 3 个片段按照三片融合法连接, 将连接产物与第 4 个

表1 构建*mcrA*基因敲除盒所用引物

Table 1 Primers used to construct *mcrA* gene knockout cassette

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Primer usage
<i>mcrA</i> -5F	<i>GGGGTACCCCAGAACTAAATTACGAATCGGGTC</i>	For the amplification of 5' flanking region
<i>mcrA</i> -5R	<i>GCTCCTTCAATATCATCTTCTCTCGATTTCTGAACATACCTTTTCGTGC</i>	
<i>mcrA</i> -3F	<i>TAGAGTAGATGCCGACCGAACAAAGACAATAAACTTCTCGGGATGACGCC</i>	For the amplification of 3' flanking region
<i>mcrA</i> -3R	<i>CCAAGCTTGGGAGACGCTCAAGCATGAACACGAC</i>	
<i>hph</i> -F	<i>CGAGAGAAGATGATATTGAAGGAGC</i>	For the amplification of <i>hph</i> gene
<i>hph</i> -R	<i>TCTTGTTTCGGTCCGCATCTACTCTA</i>	

斜体字母为限制性内切酶*Kpn* I、*Hind* III的酶切位点

The italic letters are the restriction enzyme sites of *Kpn* I and *Hind* III.

表2 构建*mcrA*基因过表达盒所用引物Table 2 Primers for construction of *mcrA* gene overexpression cassette

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Primer usage
<i>2mcrA</i> -5F	<i>CCAAGCTTGGTTACATCCTTCCCAGTTCCCGTTTT</i>	For the amplification of <i>mcrA</i> gene and 5' flanking region
<i>2mcrA</i> -5R	<i>CGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGACAGTCCAAGACCGTGACGAAAG</i>	
<i>2mcrA</i> -3F	<i>TGACTTACCTATTCTACCCAAGCATCGATGTCATCGTCCCTACAAATGTCCAGC</i>	
<i>2mcrA</i> -3R	<i>GGGTACCCGAAAACAAAATGAAGAACAACATCGCA</i>	For the amplification of <i>mcrA</i> gene and 3' flanking region
<i>trpC</i> -F	<i>TCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGACGACGTAACTGAGATTGAA</i> GG	
<i>trpC</i> -R	<i>ATCGATGCTTGGGTAGAATAGGTAAGTCA</i>	
<i>neo</i> -F	<i>ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG</i>	For the amplification of <i>neo</i> gene
<i>neo</i> -R	<i>TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGA</i>	

斜体字母为限制性内切酶*Hind* III、*Kpn* I的酶切位点

The italic letters are the restriction enzyme sites of *Kpn* I and *Hind* III.

片段进行连接，割胶回收后得到 *mcrA* 基因过表达盒，将其割胶回收后进行测序验证。用限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 同时切割 *mcrA* 敲除盒和 pCAMBIA3300 载体，使其具有相同的黏性末端，再用 T4 DNA 连接酶连接 2 个片段，将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，挑取单菌落进行验证，得到 pCAM-*mcrA* 过表达载体，将其转化至农杆菌 AGL-1。

1.6 农杆菌介导的红曲霉转化

将含有 pKO1B-*mcrA* 和 pCAM-*mcrA* 的农杆菌用 LB 液体培养基(含 50 μ g/mL Kana)在 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 16 h，5 000 r/min 离心 5 min 后用 IM 培养基稀释至 $OD_{600}=0.5$ ，再放置摇床中诱导培养 6 h。取在 PDA 上生长 15 d 左右的紫色红曲霉 Mp-21，用灭菌后的纯水将孢子冲洗下来，用擦镜纸过滤菌丝后使用血球计数板计数，用诱导后的农杆菌菌液将孢子浓度稀释至 10^5 个/mL，充分混匀后涂布在含玻璃纸的 IM 固体培养基上 28 $^{\circ}$ C 共培养 3 d。等待孢子萌发后，分别用含有潮霉素和新霉素的 PDA 培养基接种转化子，对能稳定生长的转化子进行 PCR 和 RT-qPCR 验证是否为目标菌株，验证引物见表 3，将 *mcrA* 敲除株命名为 $\Delta mcrA$ ，*mcrA* 过表达株命名为 *trpC:mcrA*。

表3 RT-qPCR实验所用引物

Table 3 Primers used in RT-qPCR experiments

Primer names	Primer sequences (5'→3')
β -actin-F	TCTGGCACCACACATTCTACAA
β -actin-R	CGAAGACGATCTGGGTCATCT
<i>mcrA</i> -F	TCCACTGAGCCAGACCGT
<i>mcrA</i> -R	GAGGAAGACGGTAAGGGT

1.7 菌落表型观察

取培养 10 d 后的野生型 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA*，用无菌水将孢子冲下，孢子稀释至 10^5 个/mL 后分别点接于 PDA、MA、G25N 和 CYA 培养基上，培养 10 d 后拍照记录菌落表型。另取 100 μ L 孢子混悬液涂布接种于 PDA 平板上，在第 6 天取灭菌后的载玻片斜插入菌落内，培养到 7 d 取载玻片用显微镜观察子囊孢子、分生孢子和菌丝的形态。

1.8 红曲色素产量测定

将等量 100 μ L 野生型 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 的孢子悬液分别接种至预先灭菌的 PDB 培养基中，随后在 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下进行摇瓶发酵，分别取发酵 3、5、7、9、11、13、15 d 的发酵液，过滤后的菌丝置于烘箱干燥 72 h，记录菌丝的质量。取 1 mL 发酵液加

9 mL 70% 的乙醇, 在 40 °C、200 r/min 摇床中萃取 2 h, 采用分光光度计在 410、470、505 nm 波长处分别测定黄色素、橙色素、红色素的吸光度值, 三者相加即为红曲色素的吸光度值。

1.9 桔霉素产量测定

取野生型 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 分别发酵 3、5、7、9、11、13、15 d 的发酵液, 超声破碎(功率 300 W, 30 min)后 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.25 μ m 滤膜过滤, 得到样品。将分析纯甲苯、乙酸乙酯、甲酸, 按照 7:3:1 比例混合, 取 1 mL 萃取液与样品混合, 用涡旋混匀。用注射器吸取上清液, 经滤膜过滤后装入色谱瓶中。磷酸用蒸馏水稀释调整 pH 值至 2.5, 将色谱纯乙腈、磷酸超声除气 30 min, 作为用于高效液相色谱仪测定桔霉素含量的流动相。流动相比比例为乙腈:磷酸=75:25, 检测波长为 331 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温 30 °C。色谱柱为 C18 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, Agilent 公司)。

1.10 转录组测序分析 *mcrA* 调控基因

挑取野生型 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA*

3 种菌株的菌丝接种于 PDA 固体培养基, 28 °C 培养 15 d 后, 用 5 mL 无菌水将孢子冲洗下来, 取 200 μ L 孢子悬液涂布于 PDA 固体培养基上, 培养 7 d 后提取 RNA 进行转录组测序(上海伟寰生物科技有限公司), 每种菌株设置 3 个重复, 对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 的筛选及鉴定

以 $\Delta mcrA$ 基因组为模板, 采用 *mcrA*-5F、*mcrA*-3R 为引物进行扩增, 得到 3 886 bp 的片段; 以野生型 Mp-21 基因组为模板, 同样使用 *mcrA*-5F、*mcrA*-3R 为引物进行扩增, 得到 3 359 bp 的片段(图 1A)。以 *trpC:mcrA* 基因组为模板, 用 2*mcrA*-5F、2*mcrA*-3R 为引物进行扩增得到 4 473 bp 的片段; 以野生型 Mp-21 基因组为模板, 用 2*mcrA*-5F、2*mcrA*-3R 为引物进行扩增, 得到 3 305 bp 的片段(图 1B)。

将野生型 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3 种菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后, 采用 RT-qPCR 检测 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 这 3 种菌株中 *mcrA* 基因的表达量(图 2)。在 $\Delta mcrA$ 中未检测

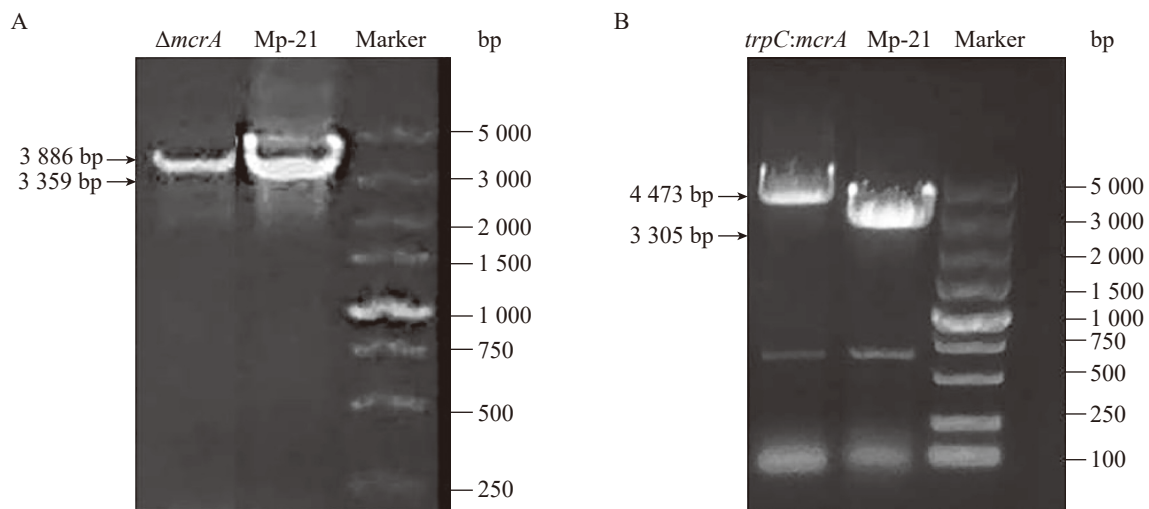


图1 *mcrA*基因敲除株和过表达株的验证。A: *mcrA*基因敲除株验证; B: *mcrA*过表达株验证。

Figure 1 Verification of *mcrA* gene knockout and overexpression strains. A: Verification of *mcrA* gene knockout strain; B: Verification of *mcrA* gene overexpression strain.

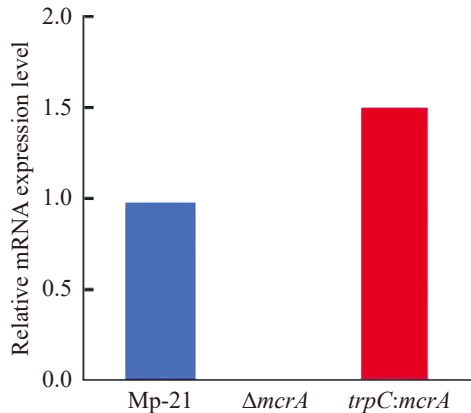


图2 RT-qPCR检测Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA*中*mcrA*基因的表达量

Figure 2 The expression level of *mcrA* gene in Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA* was detected by RT-qPCR.

到*mcrA*基因的表达，在*trpC:mcrA*中检测到的*mcrA*基因表达量是Mp-21中的1.5倍。

2.2 菌落表型和显微结构

如图3所示，野生型Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3种菌株在PDA、MA、CYA、G25N 4种培养基上菌丝颜色和菌落形态均有较大差异，在PDA培养基上可见3种菌株的菌落形态相似，均呈现绒毛地毯状，肉眼可见*trpC:mcrA*菌株的菌丝颜色最深。在MA培养基上，Mp-21

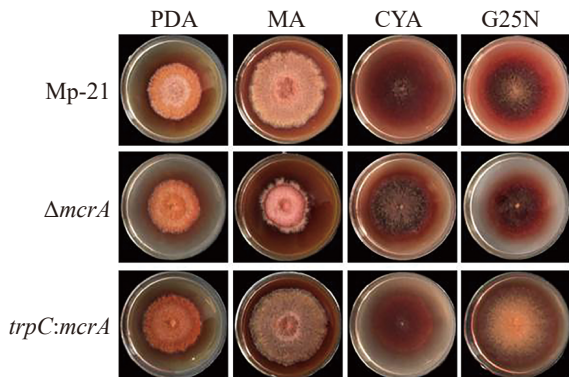


图3 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3种菌株在4种培养基上的菌落表型

Figure 3 Colony morphology of Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA* on four kinds of media.

与*trpC:mcrA*的菌丝颜色相似，呈浅橘色，而 $\Delta mcrA$ 呈现粉红色。在CYA培养基上，Mp-21与*trpC:mcrA*的菌丝形态相似，菌丝量较少；三者相比， $\Delta mcrA$ 的菌丝最多。在G25N培养基上，Mp-21与*trpC:mcrA*的菌丝颜色相似，呈现橘红色，而 $\Delta mcrA$ 的菌丝偏白。这说明敲除*mcrA*基因会影响菌株的表型，该结果与黑曲霉中敲除*mcrA*基因后表型发生改变的结果一致。

如图4所示，Mp-21、 $\Delta mcrA$ 菌株中能观察到分生孢子和闭囊壳，而*trpC:mcrA*中未观察到闭囊壳存在，3种菌株的分生孢子形态存在差异，Mp-21的分生孢子无间隔，依次在菌丝顶端产生，菌丝顶端多数为1个或者2个。 $\Delta mcrA$ 菌株的分生孢子量较少，且孢子中间有间隔，类似菌丝串珠状。*trpC:mcrA*菌株一条菌丝顶端多的可见3-4个串生分生孢子，且孢子间无间隔。结合之前在构巢曲霉中的研究结果：*mcrA*的缺失导致分生孢子数量减少，无性发育激活因子*brlA*的mRNA水平降低。这表明*mcrA*基因对孢子形成有一定的调控作用。

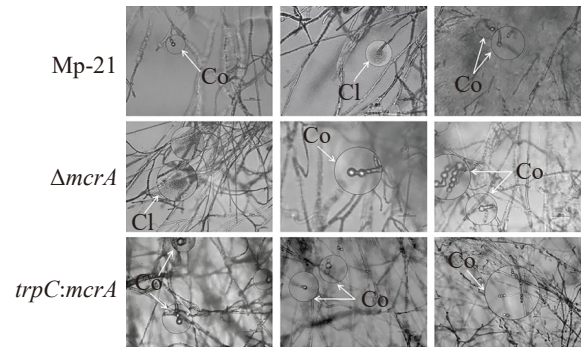


图4 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3种菌株的显微形态。白色箭头指向分生孢子和闭囊壳。Co: 分生孢子; Cl: 闭囊壳。 $\Delta mcrA$ 的分生孢子形态与其他2种菌株不同。

Figure 4 Microscopic morphology of Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA*. White arrows point to conidium spores and cleistothecium. Co: Conidium; Cl: Cleistothecium. The conidial morphology of $\Delta mcrA$ was different from that of the other two strains.

2.3 *mcrA* 基因调控红曲色素的合成

图 5 展示了发酵 3、5、7、9、11、13、15 d 的红曲色素产量。Mp-21 与 $\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 菌株的红曲色素产量有显著差异性。在发酵过程中 $\Delta mcrA$ 的红曲色素产量均低于 Mp-21 菌株, 而 *trpC:mcrA* 的红曲色素产量均高于 Mp-21。峰值为第 13 天, 此时 $\Delta mcrA$ 相对 Mp-21 的红曲色素产量降低 66%; 第 9 天, *trpC:mcrA* 相对 Mp-21 的红曲色素产量增加 40%。这表明 *mcrA* 基因敲除会使红曲色素产量下降, 过表达 *mcrA* 基因会使红曲色素产量上升, 即 *mcrA* 基因会影响红曲色素的合成。这与黑曲霉中的研究结果类似: *mcrA* 的缺失导致部分次级代谢产物衣康酸衍生物产量下降。

2.4 *mcrA* 基因调控桔霉素的合成

如图 6 所示, Mp-21、 $\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 这 3 种菌株的桔霉素产量存在显著差异。Mp-21 菌株发酵液中桔霉素在第 5 天开始产生, 在 13–15 d 时发酵液中桔霉素产量变化不大, 推测此时菌株生长已逐渐缓慢, 基本停止产生桔霉素。在发

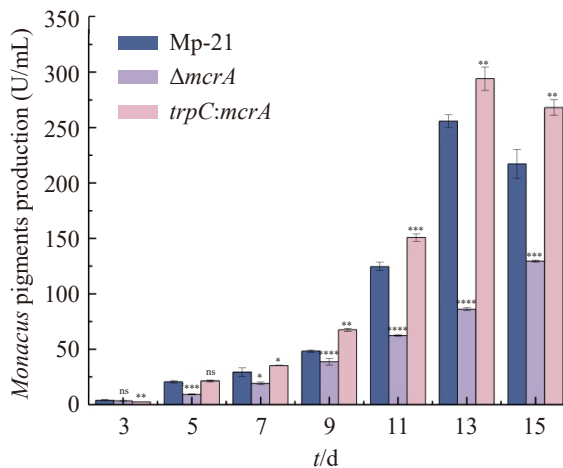


图5 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3种菌株发酵液中红曲色素产量比较

Figure 5 Comparison of *Monascus* pigment production in the fermentation broth of three strains: Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA*. ns: No significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

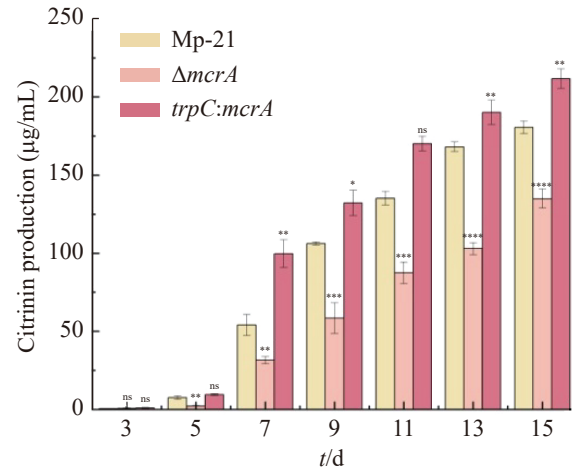


图6 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 3种菌株发酵液中桔霉素产量比较

Figure 6 Comparison of citrinin production in the fermentation broth of three strains: Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA*. ns: No significant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

酵过程中, $\Delta mcrA$ 菌株发酵液的桔霉素产量始终低于 Mp-21 菌株, 而 *trpC:mcrA* 菌株发酵液的桔霉素产量均高于 Mp-21 菌株。第 9 天, 与 Mp-21 相比 $\Delta mcrA$ 菌株发酵液的桔霉素产量下降 45%; 第 11 天, *trpC:mcrA* 菌株相对 Mp-21 菌株的桔霉素产量增加了 26%。这表明 *mcrA* 基因缺失会导致桔霉素产量下降, 而过表达则会使桔霉素产量上升。

2.5 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 菌株的转录组分析

2.5.1 转录组数据质量评估

收集 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA* 这 3 种菌株的菌丝, 每种菌株设置 3 个生物学重复, 提取 RNA 后进行转录组测序。为保证数据质量, 在信息分析前对低质量数据进行过滤, 从而得到测序数据。结果显示 Q20 超过 96.8%, Q30 超过 90.8%, G+C 含量在 50.31%–52.90% 之间, 说明测序所得数据质量较好, 碱基组成较为平衡, 可进行转录组分析。

2.5.2 差异表达基因分析

本研究采用重复样本进行差异表达分析, 根据差异分析结果筛选显著差异基因, 筛选标准为 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$, Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 比较组中共有 158 个基因的转录水平发生显著变化, 其中 111 个基因显著上调, 47 个基因显著下调。Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 比较组中共有 2 066 个基因的转录水平发生显著变化, 其中 1 199 个基因显著下调, 867 个基因显著上调。Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 、Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 的差异基因火山图如图 7 所示, 红色和蓝色分别代表上调基因和下调基因, 图中每个点代表一个基因, 基因位置越靠近两端表示差异程度越大。

2.5.3 GO 富集分析

GO (gene ontology) 是基因功能的国际标准分类体系, 它采用一套随研究动态更新的标准词汇来描述物种的基因和蛋白质功能, 主要包含 3 个本体, 即生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 、

Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 两组的差异基因 GO 富集情况类似。在生物过程方面, 差异基因主要富集在细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process); 在细胞组分方面, 差异基因主要富集在细胞 (cellular)、细胞解剖实体 (cellular anatomical entity)、细胞内 (intracellular); 在分子功能方面, 差异基因主要富集在催化活性 (catalytic activity)、运输活性 (transport activity)、结合 (binding)。

生物过程方面, 两组差异基因富集的通路 top 20 如图 8 所示, Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 差异基因富集的通路主要涉及一元羧酸代谢、小分子分解代谢、醇代谢、碳水化合物代谢、脂肪酸代谢等有机物的分解代谢过程。Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 差异基因富集的通路主要是一些酶以及物质跨膜转运过程, 例如氧化还原酶、ATP 酶、乙醛脱氢酶、转移酶、甘油三酯脂肪酶, 以及 L-氨基酸跨膜转运活性、硫化物跨膜转运、蛋白跨膜转运。由此可见, 两组差异基因富集的通路不同。

细胞组分方面, Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 差异基因

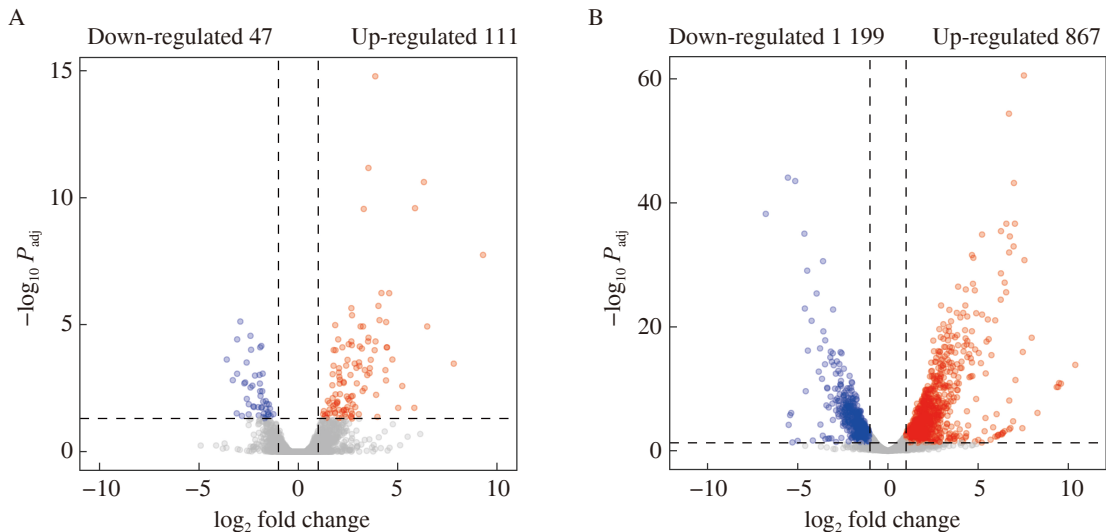


图7 差异表达基因火山图。A: Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 的差异表达基因火山图; B: Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 的差异表达基因火山图。图中蓝色点代表下调基因, 红色点代表上调基因。

Figure 7 Differentially expressed gene volcano map. A: Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ differential expression gene volcano map; B: Mp-21 vs. *trpC:mcrA* differential expression gene volcano map. Each blue point in the figure represents a down-regulated gene, and each red point represents an up-regulated gene.

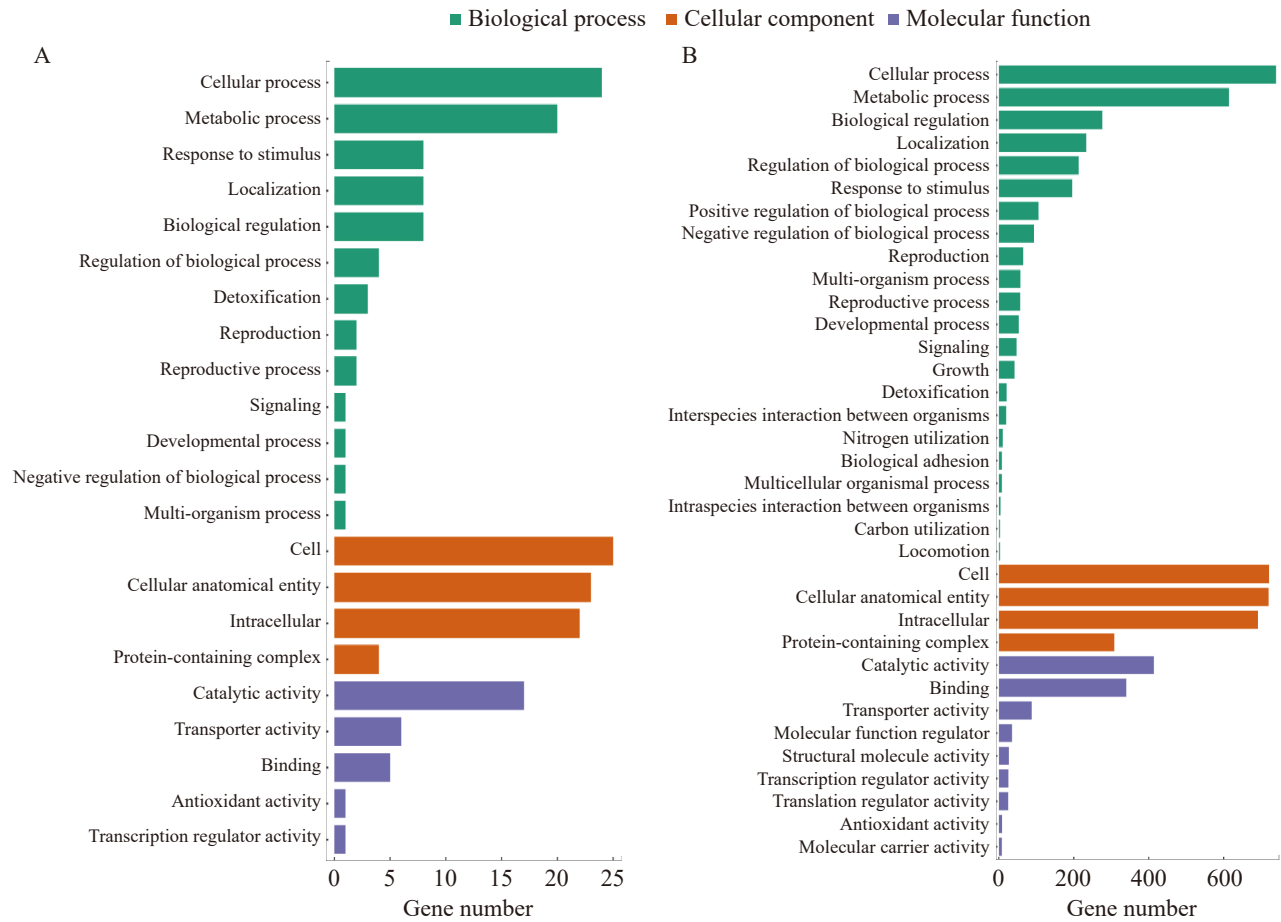


图8 GO富集分析。A: Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 的GO富集分析图; B: Mp-21 vs. $trpC:mcrA$ 的GO富集分析图。
Figure 8 GO enrichment analysis. A: GO enrichment analysis of differentially expressed genes of Mp-21 vs. $\Delta mcrA$; B: GO enrichment analysis of differentially expressed genes of Mp-21 vs. $trpC:mcrA$.

富集最多的细胞组分是膜区域, 如线粒体外膜、细胞器外膜、质膜、原生质膜等。Mp-21 vs. $trpC:mcrA$ 差异基因富集最多的组分包括线粒体的基质、蛋白复合体、外膜、内膜、拟核, 此外还有核糖体、质膜。两组差异基因富集的细胞组分均含膜区域。

在分子功能方面 Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 差异基因主要涉及酰基转移酶、水解酶、葡萄糖苷酶等。这些酶的作用主要是分解含糖化合物、糖蛋白、脂肪、蛋白质分解, 将大分子变成小分子, 以便于小分子进入不同的能量代谢途径并被重新利用。Mp-21 vs. $trpC:mcrA$ 差异基因主要涉及氧化还原酶、RNA 结合、RNA 解旋酶、RNA 依

赖的 ATP 酶等。可见, 两组差异基因的分子功能不同。

2.5.4 KEGG 富集分析

京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据资源库。分析表明 Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 差异基因显著富集的前 20 条通路主要是糖酵解、丙酮酸代谢、丁酸代谢、酪氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、甘氨酸代谢、苏氨酸代谢、丝氨酸代谢等。Mp-21 vs. $trpC:mcrA$ 差异基因富集的通路主要有真核生物中核糖体的合成、色氨酸代谢、丙酮酸代谢、酪氨酸代谢、淀粉和蔗糖的代谢、糖

酵解、精氨酸代谢、脯氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等。从图 9 可以看出，两组差异基因均涉及糖酵解、氨基酸代谢等通路。

2.5.5 *mcrA* 基因调控红曲色素、桔霉素合成机制分析

红曲色素和桔霉素合成的原料是乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 的来源主要是

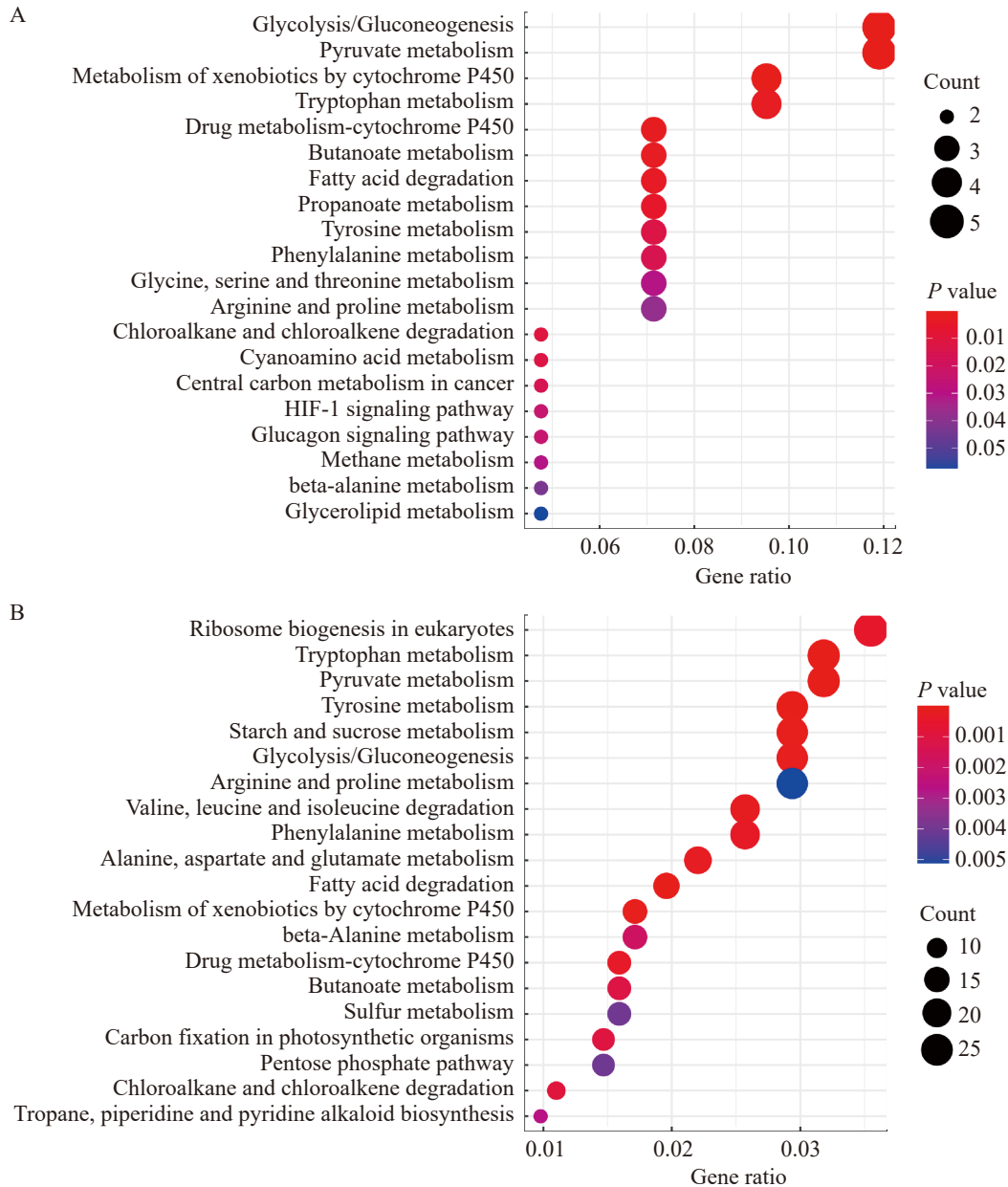


图9 Mp-21、 $\Delta mcrA$ 、*trpC:mcrA*差异表达基因的KEGG通路富集分析。圆点大小代表通路富集的基因数量，圆点颜色对应不同的P值。

Figure 9 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes of Mp-21, $\Delta mcrA$, and *trpC:mcrA*. The dot size represents the number of genes enriched in the pathway, and the dot color corresponds to different P values.

碳代谢、脂代谢和氨基酸代谢。在糖酵解中丙酮酸在丙酮酸脱氢酶的作用下生成乙酰辅酶 A, 乙酰辅酶 A 在乙酰辅酶 A 羧化酶的作用下生成丙二酰辅酶 A^[26](图 10)。Mp-21 vs. $\Delta mcrA$ 组 KEGG 富集分析结果显示, 丙酮酸脱氢酶(MPDQ006259)、乙醇脱氢酶(MPDQ004385)下调, 其中乙醇脱氢酶的作用是催化乙醇转变为乙醛和乙酰辅酶 A, 推测这 2 个基因下调导致乙酰辅酶 A 产量下降, 进而使红曲色素、桔霉素合成受阻。脂代谢分析显示脂肪酸降解和脂肪代谢 2 条代谢途径呈上调趋势, 而脂肪酸合成酶(MPDQ003997)下调, 该酶主要催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 的合成^[27], 生成红曲色素的前体物质, 再通过氧化还原反应生成黄色素, 黄色素再与含氮化合物反应生成红色素^[28]。前期实验发现, 敲除

色素相关 *MpigE* 基因后转录组测序结果显示影响了碳代谢和乙酰辅酶 A 相关基因^[29]。推测由于乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 产量下降, 为维持正常生命活动, 细胞通过上调脂肪酸降解和脂肪代谢来产生更多乙酰辅酶 A, 同时下调脂肪酸合酶以减少乙酰辅酶 A 的消耗。氨基酸代谢中苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸代谢上调, 推测是因为乙酰辅酶 A 不足, 导致这 3 种氨基酸分解途径上调以产生乙酰辅酶 A^[30]和 α -酮戊二酸, 从而维持乙酰辅酶 A 的产量(图 10)。Mp-21 vs. *trpC:mcrA* 组 KEGG 富集分析显示, 淀粉与蔗糖代谢途径中葡萄糖苷酶(MPDQ004385)、 α -淀粉酶(MPDQ003346)上调, 将淀粉、多糖分解为葡萄糖, 通过糖酵解快速生成丙酮酸, 再转化为乙酰

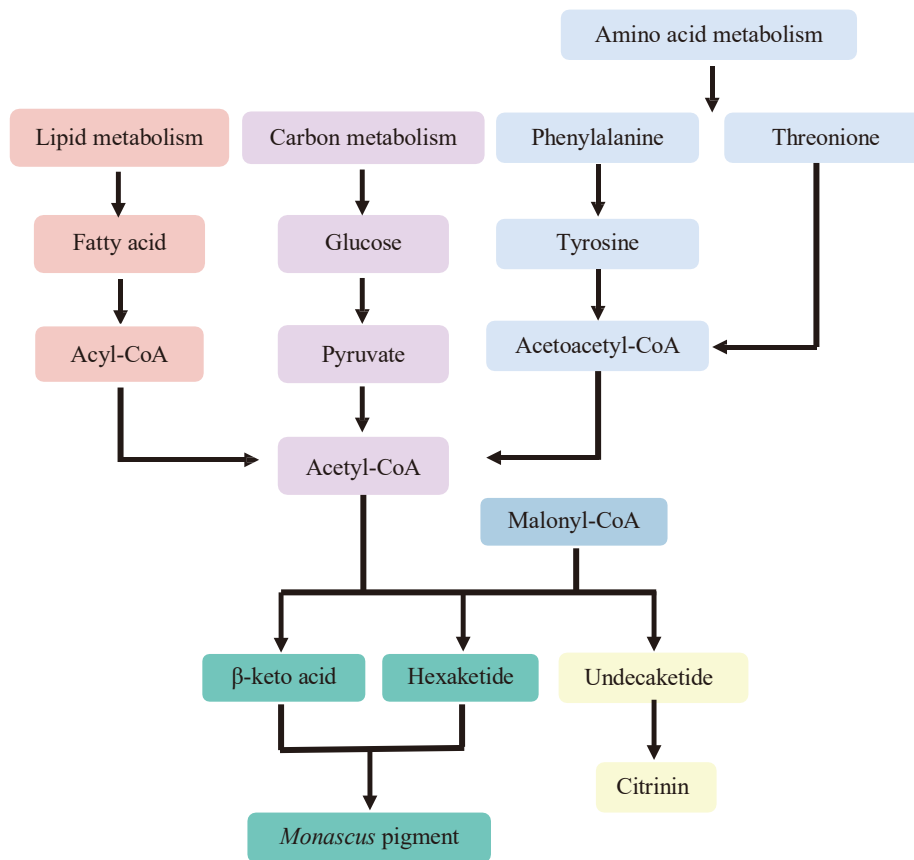


图10 *mcrA*基因调控红曲色素、桔霉素合成示意图

Figure 10 The schematic diagram of *mcrA* gene regulating *Monascus* pigment and citrinin synthesis.

辅酶 A, 为色素合成提供充足前体。TCA 代谢通路中琥珀酸脱氢酶(MPDQ006075)、柠檬酸合酶(MPDQ001957)、异柠檬酸脱氢酶(MPDQ003844)、磷酸烯醇式丙酮酸激酶(MPDQ003437)等酶下调, 推测这减少了乙酰辅酶 A 进入线粒体氧化, 导致更多乙酰辅酶 A 进入聚酮合成途径, 促进色素的生成。除上述提及的 2 种酶外, 乳酸脱氢酶(MPDQ007354)、乙醇脱氢酶(MPDQ4863)上调, 这 2 种酶催化的反应产物均含有乙酰辅酶 A, 因此这 2 个酶编码的基因上调也增加了乙酰辅酶 A 的产量。同时, 在上调的差异基因中还发现红曲色素基因簇中 PKS 聚酮合酶(MPDQ005614)、*MpigM* (MPDQ006013)、桔霉素聚酮合酶(MPDQ003567)、桔霉素合成基因簇 MFS 转运蛋白(MPDQ003566)、桔霉素合成基因 *ctnF* (MPDQ002184)、组氨酸磷酸酶(MPDQ002184)等色素合成基因上调, 也会导致 *trpC:mcrA* 菌株的红曲色素、桔霉素产量上升。

2.5.6 *mcrA* 基因调控分生孢子数量机制分析

cAMP 信号转导途径在真菌的次生代谢方面发挥重要作用, 其原理主要是碳代谢产生的环磷酸腺苷(cAMP)结合蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA), 释放其催化亚基, 磷酸化分生孢子发育的调控因子 *brlA*, 促进其转录^[31]。在稻瘟病菌中额外添加 cAMP 可使分生孢子产量增加 2 倍^[32]。研究表明稻瘟病菌中 MoSom1 和 MoCdt 是 cAMP-PKA 途径下游的转录因子, 缺失其中任何一个都会使菌株丧失产孢和附着孢形成能力, 外源添加 cAMP 能部分恢复该能力, 酵母双杂实验也证实 MoSom1 与 PKA 的催化亚基 CpkA 互作^[33-34]。除此之外, 细胞周期调节因子 MoLKH1^[35]通过调控细胞分裂和细胞骨架影响 cAMP, 导致分生孢子形成异常。cAMP 来源于糖酵解代谢途径产生的 ATP, ATP 激活腺苷酸环化酶, 催化 ATP 转化为 cAMP, *trpC:mcrA* 组 KEGG 富集分析显示糖酵解代谢通路上调, 推测这是 *trpC:mcrA* 菌株分生孢子数量增加的原因。

研究表明, 真菌利用甲基柠檬酸循环将丙酰辅酶 A 转化为丙酮酸, 最终生成乙酰辅酶 A^[36]。乙酰辅酶 A 作为三羧酸循环的原料, 是分生孢子合成的能量来源, 也是孢子发育的重要碳源, 还是聚酮类、萜类等次级代谢产物的合成前体^[37-38], 这些化合物也会调控孢子发育。乙酰辅酶 A 作为组蛋白乙酰化的乙酰基供体, 通过修饰组蛋白 H3 调控孢子形成相关基因, 进而影响孢子的形成^[39]。在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中添加乙酰辅酶 A 前体可使烟曲霉孢子数量增加 1.5 倍^[40]。黄曲霉的乙酰辅酶 A 羧化酶正调节分生孢子和硬化体的形成, 敲除该基因后产孢量显著下降^[41]。另一项研究表明, 在高淀粉培养基培养黄曲霉能上调乙酰辅酶 A 合成基因的表达^[42]。这说明乙酰辅酶 A 代谢途径与孢子形成密切相关, 因此推测 *trpC:mcrA* 菌株碳代谢相关途径上调, 生成更多乙酰辅酶 A 导致分生孢子数量增加。除上述原因外, 在 *trpC:mcrA* 组差异基因中还有分生孢子发育的核心调控因子 FlibB (MPDQ001666)、分生孢子形成特异性蛋白(MADQ001390)、分生孢子蛋白(MPDQ003955)、分生孢子特异性蛋白(MPDQ005836)、分生孢子色素生物合成酶(MPDQ007930)等分生孢子相关基因上调, 但其如何调控分生孢子的数量尚不明确。

2.5.7 *mcrA* 基因调控的代谢通路

$\Delta mcrA$ 和 *trpC:mcrA* 菌株的 KEGG 富集分析结果显示, *mcrA* 基因除了影响图 9 中提及的代谢通路影响, 还影响其他次级代谢产物的合成、细胞的生长发育等代谢通路(表 4)。*mcrA* 基因作为全局调控因子不仅调控红曲色素、桔霉素等代谢产物, 还影响多个代谢途径, 由于代谢通路中还有许多蛋白功能尚不明确, 因此 *mcrA* 调控代谢通路的机制未知, 但转录组测序结果为 *mcrA* 基因功能研究提供了新的思路, 后续可通过这些分析结果进一步研究。

表4 *mcrA*基因调控的代谢通路Table 4 Metabolic pathways regulated by *mcrA* gene

KEGG class	Pathway
Biosynthesis of other secondary metabolites	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis Isoquinoline alkaloid biosynthesis Ascorbate and aldarate metabolism
Cell growth and death	Meiosis-yeast
Energy metabolism	Methane metabolism Carbon fixation pathways in prokaryotes Nitrogen metabolism Oxidative phosphorylation
Folding, sorting and degradation	Protein processing in endoplasmic reticulum
Lipid metabolism	Fatty acid degradation Glycerolipid metabolism Fatty acid biosynthesis
Membrane transport	ABC transporters
Metabolism of cofactors and vitamins	One carbon pool by folate Nicotinate and nicotinamide metabolism Pantothenate and CoA biosynthesis
Metabolism of terpenoids and polyketides	Terpenoid backbone biosynthesis
Nucleotide metabolism	Purine metabolism Pyrimidine metabolism
Signal transduction	HIF-1 signaling pathway MAPK signaling pathway-fly Two-component system FoxO signaling pathway
Transport and catabolism	Lysosome Peroxisome
Xenobiotics biodegradation and metabolism	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 Drug metabolism-cytochrome P450 Chloroalkane and chloroalkene degradation

3 讨论与结论

紫色红曲霉拥有丰富的次级代谢产物, 包括洛伐他汀类及其衍生物、 γ -氨基丁酸、红曲色素等。在对紫色红曲霉进行次级代谢产物分离时发现, 部分代谢产物还具有抗氧化能力和抑制 α -葡萄糖苷酶和淀粉酶的作用^[43-44]。研究表明丝状真菌的次级代谢产物是一个复杂的、受多因素影响的调控网络。为充分利用红曲霉资源, 增加红曲色素的产量, 近年来人们进行了

多种尝试^[45], 如选育高产红曲色素、低产桔霉素的菌种, 优化培养基条件^[46]。红曲霉的代谢受培养(如温度、培养基等)和一些基因的影响。如 Velvet 蛋白家族中的 *veA* 基因^[47]、*laeB* 基因^[48]均属于全局性调控转录因子。新型全局性调控转录因子 *LaeB* 在构巢曲霉中影响杂色曲霉素的合成及次级代谢, 在黄曲霉中影响黄曲霉毒素的合成^[49]及生长速度和形态。其中, *mcrA* 缺失株在构巢曲霉中可上调至少 10 个与次级代

谢产物相关的基因簇，在土曲霉(*Aspergillus terreus*)和卡氏青霉(*Penicillium canescens*)中改变其次级代谢产物谱，说明 *mcrA* 基因与丝状真菌的次级代谢产物密切相关，本研究也进一步证实了这一点。

除此之外，*mcrA* 菌株转录组测序中还有许多假定蛋白，在紫色红曲霉色的生长发育中起着重要的作用，后续也可围绕这些蛋白展开研究，挖掘更多有效信息，对 *mcrA* 的基因功能会有更深了解。

作者贡献声明

潘妍妍：研究构思和设计、实验操作、论文撰写；杨季学：数据收集和处理、实验协助；于宗训：实验协助、论文修改；胡佳燕：实验协助；蒋冬花：获取基金、项目管理、论文审阅和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HOUBRAKEN J, de VRIES RP, SAMSON RA. Chapter four modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2014, 86: 199-249.
- [2] WANG PR, CHEN DF, JIANG DH, DONG XM, CHEN PP, LIN YX. Alkali extraction and *in vitro* antioxidant activity of *Monascus mycelium* polysaccharides[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 51(7): 1251-1259.
- [3] PATAKOVA P. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(2): 169-181.
- [4] 谢娜娜. 红色红曲菌 M-7 产色素基因簇克隆、解析及代谢途径探讨[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
XIE NN. Identification and exploration of pigment gene cluster and metabolic pathway in *Monascus ruber* M-7[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [5] 谢娜娜, 张乙平, 陈福生. 红色红曲菌 M7 中色素聚酮合酶基因敲除突变体的鉴定[J]. *微生物学报*, 2015, 55(7): 863-872.
XIE NN, ZHANG YP, CHEN FS. Identification of a pigment-polyketide synthase gene deleted mutant of *Monascus ruber* M7[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(7): 863-872 (in Chinese).
- [6] XIE NN, LIU QP, CHEN FS. Deletion of pigR gene in *Monascus ruber* leads to loss of pigment production[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(9): 1425-1432.
- [7] BIJINU B, SUH JW, PARK SH, KWON HJ. Delineating *Monascus* azaphilone pigment biosynthesis: oxidoreductive modifications determine the ring cyclization pattern in azaphilone biosynthesis[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(103): 59405-59408.
- [8] BALAKRISHNAN B, KARKI S, CHIU SH, KIM HJ, SUH JW, NAM B, YOON YM, CHEN CC, KWON HJ. Genetic localization and *in vivo* characterization of a *Monascus* azaphilone pigment biosynthetic gene cluster[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6337-6345.
- [9] WINTER JM, SATO M, SUGIMOTO S, CHIOU G, GARG NK, TANG Y, WATANABE K. Identification and characterization of the chaetoviridin and chaetomugilin gene cluster in *Chaetomium globosum* reveal dual functions of an iterative highly-reducing polyketide synthase[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(43): 17900-17903.
- [10] LIU QP, XIE NN, HE Y, WANG L, SHAO YC, ZHAO HZ, CHEN FS. *MpigE*, a gene involved in pigment biosynthesis in *Monascus ruber* M7[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 285-296.
- [11] BALAKRISHNAN B, PARK SH, KWON HJ. Inactivation of the oxidase gene *mppG* results in the selective loss of orange azaphilone pigments in *Monascus purpureus*[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2017, 60(4): 437-446.
- [12] LI L, CHEN FS. Effects of *mrigG* on development and secondary metabolism of *Monascus ruber* M7[J]. *Journal of Fungi*, 2020, 6(3): 156.
- [13] BALAKRISHNAN B, PARK SH, KWON HJ. A reductase gene *mppE* controls yellow component production in azaphilone polyketide pathway of *Monascus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(1): 163-169.
- [14] BALAKRISHNAN B, KIM HJ, SUH JW, CHEN CC, LIU KH, PARK SH, KWON HJ. *Monascus* azaphilone pigment biosynthesis employs a dedicated fatty acid synthase for short chain fatty acyl moieties[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2014, 57(2): 191-196.
- [15] 刘姣. 红色红曲菌 M7 中 3 个色素转运基因的克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
LIU J. Identification and functional analysis of three pigment transport genes in *Monascus ruber* M7[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [16] BALAKRISHNAN B, CHEN CC, PAN TM, KWON HJ. *Mpp7* controls regioselective Knoevenagel condensation during the biosynthesis of *Monascus* azaphilone pigments[J]. *Tetrahedron Letters*, 2014, 55(9): 1640-1643.
- [17] 周彦怡. 红色红曲菌 M7 色素合成相关基因 *MpigM* 和 *MpigN/O* 功能的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
ZHOU YY. Functional preliminary analysis of gene *MpigM* and *MpigN/O* involved in pigment biosynthesis of *Monascus ruber* M7[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).

- [18] LIU J, ZHOU YX, YI T, ZHAO MM, XIE NN, LEI M, LIU QP, SHAO YC, CHEN FS. Identification and role analysis of an intermediate produced by a polygenic mutant of *Monascus* pigments cluster in *Monascus ruber* M7[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 7037-7049.
- [19] LEE MK, SON YE, PARK HS, ALSHANNAQ A, HAN KH, YU JH. Velvet activated McrA plays a key role in cellular and metabolic development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 15075.
- [20] 李执. 全局调控因子 McrA 调控下的 *Aspergillus niger* CBS 513.88 的表型及次级代谢产物研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
- LI Z. Insight into the phenotype and secondary metabolites of *Aspergillus niger* CBS 513.88 under the control of global regulator McrA[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019 (in Chinese).
- [21] 付亚娟, 陈红豆, 高梦迪, 许笑晴, 张慧敏, 张文静. 黄曲霉转录因子 AfMcrA 的克隆及功能预测[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(20): 46-52.
- FU YJ, CHEN HD, GAO MD, XU XQ, ZHANG HM, ZHANG WJ. Cloning and function prediction of transcription factor AfMcrA in *Aspergillus flavus*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(20): 46-52 (in Chinese).
- [22] 潘妍妍, 王嘉琦, 杨孙玉悦, 蒋冬花. 紫色红曲霉 Mp-21 *MpMcrA* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. *微生物学杂志*, 2023, 43(3): 11-18.
- PAN YY, WANG JQ, YANG SY, JIANG DH. Cloning and bioinformatics analysis of mp-21 *MpMcrA* gene from *Monascus purpureus*[J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 43(3): 11-18 (in Chinese).
- [23] YUAN B, KELLER NP, OAKLEY BR, STAJICH JE, WANG CCC. Manipulation of the global regulator *mcrA* upregulates secondary metabolite production in *Aspergillus wentii* using CRISPR-Cas9 with *in vitro* assembled ribonucleoproteins[J]. *ACS Chemical Biology*, 2022, 17(10): 2828-2835.
- [24] 潘妍妍, 邵嘉朱, 蒋冬花. 单羧酸转运蛋白 MpMch2 调控紫色红曲霉的性发育及代谢产物的产生[J]. *微生物学报*, 2024, 64(9): 3436-3452.
- PAN YY, SHAO JZ, JIANG DH. Monocarboxylate transporter MpMch2 regulates the sexual development and metabolite production of *Monascus purpureus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(9): 3436-3452 (in Chinese).
- [25] HILGARTH RS, LANIGAN TM. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction[J]. *MethodsX*, 2020, 7: 100759.
- [26] CHAUDHARY V, KATYAL P, POONIA AK, KAUR J, PUNIYA AK, PANWAR H. Natural pigment from *Monascus*: the production and therapeutic significance[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(1): 18-38.
- [27] HE JT, JIA MX, LI W, DENG J, REN JL, LUO FJ, BAI J, LIU J. Toward improvements for enhancement the productivity and color value of *Monascus* pigments: a critical review with recent updates[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(26): 7139-7153.
- [28] LIU LJ, ZHAO JX, HUANG YL, XIN Q, WANG ZL. Diversifying of chemical structure of native *Monascus* pigments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3143.
- [29] 倪峰, 丁允章, 马静静, 王嘉琦, 蒋冬花. 基于 RNA-Seq 分析 MpigE 在红曲霉色素生物合成中的转录调控[J]. *微生物学报*, 2021, 61(3): 695-706.
- NI F, DING YZ, MA JJ, WANG JQ, JIANG DH. Unraveling MpigE involved in pigment biosynthesis in *Monascus purpureus* Mp-21 by RNA-Seq transcriptome profiling analyses[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(3): 695-706 (in Chinese).
- [30] 张斌, 黄丽萌, 王成涛, 尹胜. 氨基酸对紫红曲霉 Y66 中红曲色素合成影响的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2016, 27(8): 142-147.
- ZHANG B, HUANG LM, WANG CT, YIN S. Effect of amino acids on *Monascus* pigments biosynthesis in *Monascus purpureus* Y66[J]. *China Food Additives*, 2016, 27(8): 142-147 (in Chinese).
- [31] 杨峥. 玉米大斑病菌 STH-PDE 基因调控病菌菌丝形态建成及次级代谢机制的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2016.
- [32] 林福星, 李德葆. 稻瘟病菌分生孢子发芽和附着胞形成的影响因素研究[J]. *中国水稻科学*, 2001, 15(4): 291-297.
- LIN FC, LI DB. Factors affecting on conidium germination and its appressorium formation of *Magnaporthe grisea*[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15(4): 291-297 (in Chinese).
- [33] YAN X, LI Y, YUE XF, WANG CC, QUE YW, KONG DD, MA ZH, TALBOT NJ, WANG ZY. Two novel transcriptional regulators are essential for infection-related morphogenesis and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12): e1002385.
- [34] 尹梓屹. MAPK 蛋白激酶介导的细胞壁完整性通路协调 CAMP 途径与细胞自噬调控稻瘟病菌发育及致病力的机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- YIN ZY. MAPK-mediated cell wall integrity coordinates with CAMP pathway and autophagy to regulate growth and virulence of *Magnaporthe oryzae*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [35] XIE R, JIANG BX, CAO W, WANG SS, GUO M. The dual-specificity kinase MoLKH1-mediated cell cycle, autophagy, and suppression of plant immunity is critical for development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 214: 108879.
- [36] HUANG ZC, WANG Q, KHAN IA, LI Y, WANG J, WANG JY, LIU XH, LIN FC, LU JP. The methylcitrate cycle and its crosstalk with the glyoxylate cycle and tricarboxylic acid cycle in pathogenic fungi[J]. *Molecules*, 2023, 28(18): 6667.
- [37] GUO LK, LIU M, BI YJ, QI QS, XIAN M, ZHAO G. Using a synthetic machinery to improve carbon yield with acetylphosphate as the core[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5286.
- [38] SHEN XR, LEI CZ, ZHANG AX, WANG L, CHEN DH, QI LD, HU YL, CHEN GC, RAN HM, YIN WB. Stimulating novel and bioactive metabolite production by cocultivation of two fungi-*Aspergillus oryzae* and

- Epicoccum dendrobii*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(30): 16825-16834.
- [39] ZHANG YP, ZENG LB, HUANG XH, WANG YY, CHEN GS, MOSES M, ZOU Y, XIONG SC, XUE WW, DONG YM, TIAN YR, GUAN M, HU LF, YIN Z, ZHOU DS, HUANG XT, CHEN CB. Targeting epigenetic regulators to overcome drug resistance in the emerging human fungal pathogen *Candida auris*[J]. *Nature Communications*, 2025, 16(1): 4668.
- [40] 卫芸芸. 基于T-DNA随机插入的烟曲霉生长发育相关基因的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
WEI YY. Study on the growth and development related genes in *Aspergillus fumigatus* based on the random insertion of T-DNA[D]. Changchun: Jilin University, 2022 (in Chinese).
- [41] XIE R, ZHANG B, TUMUKUNDE E, ZHUANG ZH, YUAN J, WANG SH. Succinylated acetyl-CoA carboxylase contributes to aflatoxin biosynthesis, morphology development, and pathogenicity in *Aspergillus flavus*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 413: 110585.
- [42] LI X, JIANG YR, MA LX, MA XY, LIU Y, SHAN JH, MA K, XING FG. Comprehensive transcriptome and proteome analyses reveal the modulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on different crop substrates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1497.
- [43] 丁允章, 孔黎春, 张奕嘉, 蒋冬花. 紫色红曲霉Mp-21次级代谢产物抗氧化及抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(1): 103-118.
DING YZ, KONG LC, ZHANG YJ, JIANG DH. Antioxidation and inhibition of α -glucosidase activity of secondary metabolites of *Monascus purpureus* Mp-21[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 103-118 (in Chinese).
- [44] 丁允章, 倪峰, 赵鑫, 张奕嘉, 蒋冬花. 紫色红曲霉Mp-21胞内次级代谢产物的分离纯化与活性研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(7): 1997-2006.
DING YZ, NI F, ZHAO X, ZHANG YJ, JIANG DH. Separation, purification and bioactivity analysis of intracellular secondary metabolites from *Monascus purpureus* Mp-21[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(7): 1997-2006 (in Chinese).
- [45] 李培睿, 张晓伟, 曹依曼. 红曲霉桔霉素的检测和控制方法研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(3): 100-105.
LI PR, ZHANG XW, CAO YM. Progress on detection and control of *Monascus citrinin*[J]. *China Food Additives*, 2021, 32(3): 100-105 (in Chinese).
- [46] MARTINS TÁ, VENDRUSCOLO F. Enhancement of microbial pigment production from *Monascus ruber* by sodium octanoate addition[J]. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2020, 19(4): 445-456.
- [47] PALMER JM, THEISEN JM, DURAN RM, GRAYBURN WS, CALVO AM, KELLER NP. Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(1): e1003193.
- [48] PFANNENSTIEL BT, ZHAO XX, WORTMAN J, WIEMANN P, THROCKMORTON K, SPRAKER JE, SOUKUP AA, LUO XY, LINDNER DL, LIM FY, KNOX BP, HAAS B, FISCHER GJ, CHOERA T, BUTCHKO RAE, BOK JW, AFFELDT KJ, KELLER NP, PALMER JM. Revitalization of a forward genetic screen identifies three new regulators of fungal secondary metabolism in the genus *Aspergillus*[J]. *mBio*, 2017, 8(5): e01246-17.
- [49] 魏鹏霖. 黄曲霉调控因子LacB及孢子色素合成基因pks1功能的鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2019.
WEI PL. Functional identification of regulator LacB and pigment synthetic gene pks1 in *Aspergillus flavus*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2019 (in Chinese).