

• 药材与资源 •

黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族鉴定及花青素转运与积累相关候选基因筛选

许云章¹, 赵海豹², 吴鑫³, 殷恒霞¹, 武振中¹, 刘圆^{4*}, 李强峰^{5*}

1. 青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

2. 青海大学生态环境工程学院, 青海 西宁 810016

3. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016

4. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225

5. 青海大学林草学院, 青海 西宁 810016

摘要: 目的 基于黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* 全基因组数据, 系统鉴定 *LrMATE* 基因家族成员, 解析其结构特征、进化关系及在果实不同着色时期的表达模式, 并筛选可能参与花青素转运与积累的候选基因。方法 利用隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)检索和已知 MATE 蛋白序列比对鉴定黑果枸杞 *LrMATE* 家族成员, 并采用生物信息学方法对其蛋白理化性质、染色体定位、系统发育关系、基因结构、顺式作用元件及共线性关系进行分析; 结合果实不同发育阶段转录组数据和花青素含量变化, 通过基因表达量与花青素含量的相关性分析和 WGCNA 分析筛选花青素相关候选基因。结果 在黑果枸杞全基因组中共鉴定出 53 个 *LrMATE* 基因, 分布于 12 条染色体上。系统发育分析将其划分为 5 个亚家族, 其中第二亚家族成员最多, 共 19 个, 且部分成员与已报道参与植物次生代谢物转运的 MATE 蛋白聚类较近。结合果实不同发育阶段 *LrMATE* 基因表达模式、花青素含量变化及共表达分析结果, 推测 *LrMATE12*、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE27*、*LrMATE37* 和 *LrMATE38* 可能参与黑果枸杞果实着色过程中花青素的转运与积累。结论 系统解析了黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族的基本特征, 并筛选出 7 可能参与花青素转运与积累的候选基因, 为进一步阐明 *LrMATE* 基因介导黑果枸杞花青素积累的分子机制提供了重要候选基因资源, 也为黑果枸杞花青素等药用活性成分开发、果实品质改良及高花青素种质资源选育提供了理论依据。

关键词: 黑果枸杞; *MATE* 基因家族; 全基因组鉴定; 花青素积累; 候选基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)17-6921-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.022

Genome-wide identification of *LrMATE* gene family in *Lycium ruthenicum* and screening of candidate genes associated with anthocyanin transport and accumulation

XU Yunzhang¹, ZHAO Haibao², WU Xin³, YIN Hengxia¹, WU Zhenzhong¹, LIU Yuan⁴, LI Qiangfeng⁵

1. State Key Laboratory of Sanjiangyuan Ecology Co-established by Province and Ministry Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China

2. College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China

3. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

4. Key Laboratory of Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization of National Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610225, China

5. College of Forestry and Grassland Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: Objective Based on the whole-genome data of *Lycium ruthenicum*, this study aimed to systematically identify members of the *LrMATE* gene family, characterize their structural features, evolutionary relationships, and expression patterns during different fruit coloration stages, and screen candidate genes potentially involved in anthocyanin transport and accumulation. **Methods**

收稿日期: 2026-03-02

基金项目: 青海省科技厅基础研究计划项目(2024-ZJ-988)

作者简介: 许云章, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物次生代谢产物生物合成及其在品质形成与逆境适应中的作用机制。

E-mail: xuyunzhang239@126.com

*通信作者: 刘圆, 博士, 教授, 研究方向为民族药品种、品质评价及新药资源开发与利用。E-mail: 499769896@qq.com

李强峰, 硕士, 教授, 研究方向为林业生态学。E-mail: 1325985124@qq.com

Members of the *LrMATE* gene family were identified using hidden Markov model (HMM) searches and sequence alignment with known MATE proteins. Bioinformatics approaches were then used to analyze their physicochemical properties, chromosomal location, phylogenetic relationships, gene structures, *cis*-acting regulatory elements, and syntenic relationships. Combined with transcriptome data from different fruit developmental stages and changes in anthocyanin content, candidate genes related to anthocyanin accumulation were screened through correlation analysis between gene expression levels and anthocyanin content, as well as weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). **Results** A total of 53 *LrMATE* genes were identified in the *L. ruthenicum* genome and were unevenly distributed across 12 chromosomes. Phylogenetic analysis classified these genes into five subfamilies, among which subfamily II contained the largest number of members, with 19 genes. Some members of this subfamily clustered closely with previously reported MATE proteins involved in the transport of plant secondary metabolites. Based on the expression patterns of *LrMATE* genes during different fruit developmental stages, changes in anthocyanin content, and co-expression analysis, *LrMATE12*, *LrMATE15*, *LrMATE23*, *LrMATE26*, *LrMATE27*, *LrMATE37*, and *LrMATE38* were predicted to be involved in anthocyanin transport and accumulation during fruit coloration in *L. ruthenicum*. **Conclusion** This study systematically characterized the *LrMATE* gene family in *L. ruthenicum* and identified seven candidate genes potentially associated with anthocyanin transport and accumulation. These findings provide important candidate gene resources for further elucidating the molecular mechanisms through which *LrMATE* genes mediate anthocyanin accumulation in *L. ruthenicum*, and offer a theoretical basis for the development of anthocyanin-related medicinal active components, fruit quality improvement, and the breeding of high-anthocyanin germplasm resources.

Key words: *Lycium ruthenicum* Murr.; MATE gene family; genome-wide identification; anthocyanin accumulation; candidate genes

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 为茄科枸杞属多年生灌木, 是我国西北地区重要的药食两用植物资源。其成熟果实富含多酚、类黄酮、花青素等活性成分^[1]。其中花青素是黑果枸杞果实着色和品质形成的关键物质基础, 也是其区别于宁夏枸杞 *L. barbarum* Murr. 等红果枸杞的重要特征之一^[2]。已有研究表明, 黑果枸杞果实花青素含量可高达 82.58 mg/g, 显著高于蓝莓、黑莓、黑加仑等其他富花青素果实, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节等多种生物活性^[3-4]。因此, 解析黑果枸杞花青素积累的分子基础, 对于阐明其果实品质形成机制及特色资源开发利用具有重要意义。

花青素属于类黄酮次生代谢产物, 其合成主要发生于细胞质, 而稳定积累则依赖于后续的跨膜转运及液泡封存过程。目前认为, 植物花青素由细胞质向液泡的转运主要涉及液泡膜转运体介导的跨膜运输、GST 蛋白辅助转运及囊泡介导运输等途径^[5-6]。其中, MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 转运蛋白是一类广泛存在于植物中的跨膜转运蛋白, 通常具有多个跨膜螺旋结构, 可参与有机酸、碱性离子、次生代谢产物及外源有毒物质等多种底物的运输^[7]。近年来, 越来越多研究表明, 部分植物 MATE 家族成员与类黄酮化合物和花青素液泡转运密切相关。如拟南芥 *AtTT12* 已被证实参与原花青素/花青素相关代谢物向液泡的转运^[8]; 矮牵牛 *PhMATE1* 参与花青素转运, 并影响花色形成^[9]。葡萄风信子 *MaMATE11* 和 *MaMATE14* 能够参与花青素转运, 从而调控花瓣的颜

色^[10]。因此, 系统鉴定黑果枸杞 MATE 基因(*LrMATE*) 家族并筛选花青素转运相关候选基因, 对解析其果实着色分子基础具有重要意义。

目前, 黑果枸杞中 *LrMATE* 基因家族的组成、结构特征及其与花青素积累相关成员尚缺乏系统研究。因此, 本研究基于黑果枸杞基因组数据, 对 *LrMATE* 基因家族成员进行全基因组鉴定, 并结合系统发育关系、蛋白理化性质、基因结构、启动子顺式作用元件、共线性分析、果实不同发育阶段表达模式、花青素含量、qRT-PCR 验证及 WGCNA 共表达网络分析, 筛选与黑果枸杞果实花青素转运与积累相关的候选基因, 以期为后续功能验证及黑果枸杞花青素积累分子机制研究提供理论基础。

1 材料和试剂

1.1 材料

所用样品采自青海省海西蒙古族藏族自治州都兰县诺木洪农场(96°25'38.2"E, 36°26'23.7"N), 经西南民族大学刘圆教授鉴定为黑果枸杞 *L. ruthenicum* Murr. 的果实。参考已有黑果枸杞果实发育分期研究, 并结合果实外观形态、着色程度和果茎变化, 将果实划分为 5 个发育时期: S1 青果期: 开花后 10~14 d, 果实呈绿色; S2 转色期 I: 开花后 16~22 d, 约半数果面出现色素; S3 转色期 II: 开花后 23~29 d, 果面全部呈浅紫色; S4 未熟期: 开花后 30~37 d, 果实呈深紫色但尚未充分膨大; S5 成熟期: 开花后 38~45 d, 果实呈紫黑色, 充分成熟且形态饱满。果径测定结果显示, 各时期果实直径随发育进程整体增加, 其中

S5 果实直径高于 S4, 并与果实颜色和成熟状态共同作为区分 S4 和 S5 的形态依据。

选取长势一致、健康良好的 3 株黑果枸杞植株, 于植株向阳面枝条上采集不同发育时期果实样品。每个时期采集多颗果实, 去除宿存花萼后立即置于无 RNA 酶冻存管中, 经液氮速冻后保存, 用于后续试验。上述 5 个发育时期果实样品的转录组测序由本课题组前期委托上海欧易生物医学科技有限公司完成, 数据已上传至国家生物信息中心数据库 (NGDC, 登录号: CAR029153)。

1.2 试剂

RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司 (DP441); Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus, 11141ES60) 和 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (low rox plus, 11201ES08) 购自上海翊圣生物科技有限公司; 盐酸、甲醇、氯仿等均为分析纯。

2 方法

2.1 *LrMATE* 基因家族成员的鉴定及蛋白理化性质分析

基于 Liang 等^[11]发表的黑果枸杞基因组数据, 利用 TBtools v2.330 提取全基因组蛋白序列。采用隐马尔可夫模型检索和同源比对相结合的方法鉴定 *LrMATE* 基因家族成员。从 Pfam 数据库 (<https://pfam.xfam.org/>) 下载 MATE 保守结构域模型文件 PF01554, 以黑果枸杞全基因组蛋白序列为检索对象进行隐马尔可夫模型 (hidden markov model, HMM) 检索。同时, 从 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 下载拟南芥、烟草和马铃薯 MATE 蛋白序列, 作为查询序列与黑果枸杞全基因组蛋白序列进行同源比对。合并 2 种方法获得的候选序列并去除冗余后, 利用 NCBI CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行结构域验证, 剔除不含完整 MATE 结构域的序列, 最终获得黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族成员。

利用 ProtParam 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *LrMATE* 基因编码蛋白的氨基酸数目、相对分子质量、理论等电点和不稳定系数等理化性质; 采用 CELLO 在线工具 (<https://cello.life.nctu.edu.tw/>) 预测其亚细胞定位。

2.2 *LrMATE* 染色体定位分析及进化树构建

利用 TBtools v2.330 将 *LrMATE* 基因编号与黑

果枸杞 GFF 注释文件进行匹配, 提取染色体位置信息并进行可视化。拟南芥 MATE 蛋白序列下载自 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)。采用 MEGA11 对黑果枸杞和拟南芥 MATE 全长蛋白序列进行多重比对, 并基于邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, Bootstrap 重复 1 000 次, 其余参数为默认设置。根据拟南芥 MATE 家族分群结果对 *LrMATE* 成员进行亚群划分, 并利用 iTOL 在线工具 (<https://itol.embl.de/>) 美化系统发育树。

2.3 *LrMATE* 基因家族保守结构域、基序及基因结构分析

基于前述系统发育树, 对 *LrMATE* 基因家族成员的保守结构域、保守基序和基因结构进行综合分析。利用 NCBI CD-Search 在线工具预测 *LrMATE* 基因编码蛋白的保守结构域; 采用 MEME 在线程序 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 分析其保守基序, 最大基序数设置为 12, 其余参数为默认值。根据黑果枸杞基因组 GFF3 注释文件, 利用 TBtools v2.330 提取 *LrMATE* 基因结构信息, 并借助 TBtools 对系统发育关系、保守结构域、保守基序及基因结构进行综合可视化分析。

2.4 *LrMATE* 基因家族顺式作用元件分析

利用 TBtools 提取 *LrMATE* 基因起始密码子 (ATG) 上游 2 000 bp 序列作为候选启动子区域, 并将其提交至 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测顺式作用元件。对预测得到的顺式作用元件进行分类整理后, 采用 Origin2021 进行可视化展示。

2.5 *LrMATE* 基因家族共线性分析

采用 TBtools 中的 One Step MCScanX 模块进行黑果枸杞基因组内共线性分析, 并分别进行黑果枸杞与拟南芥、马铃薯和烟草的物种间共线性分析。利用 Dual Synteny Plot for MCScanX 和 Advanced Circos 模块可视化 *LrMATE* 基因家族共线性关系。提取共线性基因对后, 导入 Simple K_a/K_s Calculator (NG) 计算非同义替代率 (K_a)、同义替代率 (K_s) 及 K_a/K_s 值, 以评估 *LrMATE* 基因复制事件及其选择压力。

2.6 黑果枸杞果实不同发育时期花青素含量测定

参照 Li 等^[12]的方法并略作修改测定花青素含量。称取约 0.1 g 果实样品, 经液氮速冻后, 采用研磨仪在 55 Hz 条件下破碎 10~30 s。加入 600 μ L 1% HCl-甲醇溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 避光振荡提取过夜。随后加

入 400 μL 去离子水和 400 μL 氯仿,充分混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液分别测定 530 nm 和 657 nm 处的吸光度 (A)。花青素相对含量以 “($A_{530}-0.33\times A_{657}$)” 表示,每个样品测定 3 次。

2.7 *LrMATE* 基因家族的表达模式分析

基于本课题组前期获得的黑果枸杞果实 5 个发育时期转录组数据,提取 *LrMATE* 基因家族成员在各时期的表达量信息。以各时期 3 个生物学重复的平均表达量为基础,对 *LrMATE* 基因在果实发育过程中的表达模式进行分析,并利用欧易生物云平台 (https://cloud.oebiotech.com/#/bio/tools?cat_id=&tag_i

$d=\&search=$) 绘制表达热图。

2.8 候选基因的 qRT-PCR 验证

采用 RNAprep Pure 总 RNA 提取试剂盒提取不同发育时期果实总 RNA,并按 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒说明书合成第一链 cDNA。利用 DNAMAN 6.0 软件设计 qRT-PCR 引物(表 1),以黑果枸杞 *Actin* 为内参基因。qRT-PCR 反应采用 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行,反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。每个样品设 3 次技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算候选基因相对表达量。

表 1 *LrMATE* 基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences of *LrMATE* genes

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>LrMATE12</i>	ACTCGCTGCTATCTCCATTTC	AAGCTTGTCGCGATAATGTTC
<i>LrMATE23</i>	GTTCCATTGGGTGCTCTTCTA	GTTCGAGCGGTAATCCATATCA
<i>LrMATE26</i>	CATCGCGCTAACGTCCATTAT	GGCCTAGCTGTTCTCTTAGTA
<i>LrMATE27</i>	GTCCTCTTCGCTGGCTATTT	TTGACACTCGCACGCTTAT
<i>LrMATE30</i>	CATTCTCTCACGGTCTTATGG	AGCAAAGAGAGCGGGAATAAG
<i>LrMATE38</i>	GTGTGGCTGACCTTTCTACTT	TGCTTTGTAAACCTGCTCCT
<i>LrMATE40</i>	GAGGATGTAAGACGGGAACCTTG	GAACCCAGGTGGCCAATATAA
<i>LrMATE41</i>	TGGGAATATGGGCTGGAATG	GTTGCCTTCTCTGCCTCTTTA
<i>Actin</i>	GCACCACCAGAGAGGAAATATAG	TTCGTCGTACTCTGCCTTTG

2.9 数据处理及分析

所有数据采用 Excel 软件进行整理,差异显著性采用 t 检验进行分析,图表使用 Origin 2021 软件绘制。

3 结果与分析

3.1 *LrMATE* 基因家族鉴定和蛋白理化性质

通过同源比对和 HMM 相结合的方法,在黑果枸杞基因组中初步获得 72 条候选 MATE 蛋白序列。经 NCBI Batch CD-Search 进行保守结构域和序列完整性验证后,最终鉴定获得 53 个黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族成员。根据这些基因在染色体上的物理位置,分别命名为 *LrMATE1*~*LrMATE53*。

利用 ExPASy 在线工具 (<https://www.expasy.org/>) 对 53 个 *LrMATE* 蛋白的理化性质进行分析,结果见表 2。*LrMATE* 蛋白长度为 308~581 aa,其中 *LrMATE30* 最短,*LrMATE31* 最长;相对分子质量为 33 700~62 800。理论等电点为 5.51~9.24,其中酸性蛋白 23 个,碱性蛋白 30 个,表明该家族成员在电荷性质上存在一定差异。蛋白不稳

定系数为 22.73~43.92,其中仅 *LrMATE1*、*LrMATE18* 和 *LrMATE26* 大于 40,其余 50 个成员均预测为稳定蛋白。所有蛋白的脂肪系数为 107.15~128.11,GRAVY 为 0.441~0.828,均大于 0,说明 *LrMATE* 蛋白整体具有较强疏水性,符合其作为跨膜转运蛋白的结构特点。

亚细胞定位预测结果显示,*LrMATE* 家族蛋白主要定位于膜系统。其中,38 个成员定位于细胞膜,10 个成员同时定位于细胞膜和液泡膜,2 个成员定位于液泡膜,2 个成员定位于细胞膜和叶绿体,另有 1 个成员定位于细胞核。值得注意的是,*LrMATE32* 和 *LrMATE48* 被预测为单一液泡膜定位蛋白,可能与液泡膜转运功能有关;*LrMATE4* 则被预测定位于细胞核,其定位特征仍需进一步验证。上述结果表明,黑果枸杞 *LrMATE* 蛋白具有典型膜转运蛋白特征,可能参与了包括花青素在内的多种物质跨膜转运过程。

3.2 黑果枸杞 *LrMATE* 染色体定位和进化关系分析

对 53 个 *LrMATE* 基因进行染色体定位分析,

表 2 黑果枸杞 *MATE* 家族蛋白理化信息预测Table 2 Predicted physicochemical properties of *MATE* family proteins in *Lycium ruthenicum*

基因	<i>LrMATE</i> 名称	蛋白长度/aa	相对分子质量	理论等电点	不稳定系数	脂肪系数	亲疏水性	亚细胞定位预测
<i>Lr01g000185</i>	<i>LrMATE1</i>	498	55 193.83	8.49	43.92	107.15	0.441	细胞膜
<i>Lr01g000186</i>	<i>LrMATE2</i>	485	53 147.05	8.43	35.63	118.89	0.732	细胞膜
<i>Lr01g000225</i>	<i>LrMATE3</i>	493	53 838.59	6.66	34.00	115.60	0.730	细胞膜
<i>Lr01g000226</i>	<i>LrMATE4</i>	493	53 931.76	8.14	34.78	115.15	0.757	细胞核
<i>Lr01g002167</i>	<i>LrMATE5</i>	516	56 293.85	8.63	38.85	121.72	0.606	细胞膜
<i>Lr01g002222</i>	<i>LrMATE6</i>	501	54 538.35	5.53	30.01	124.39	0.755	细胞膜
<i>Lr01g002700</i>	<i>LrMATE7</i>	422	45 581.58	9.08	25.27	125.52	0.766	细胞膜、液泡膜
<i>Lr02g000670</i>	<i>LrMATE8</i>	495	53 963.78	7.90	27.05	115.88	0.642	细胞膜
<i>Lr02g001052</i>	<i>LrMATE9</i>	510	54 304.82	8.47	32.41	122.06	0.663	细胞膜
<i>Lr02g002751</i>	<i>LrMATE10</i>	498	54 376.17	8.43	30.81	119.64	0.711	细胞膜
<i>Lr02g004105</i>	<i>LrMATE11</i>	496	53 983.87	6.24	29.26	114.58	0.615	细胞膜
<i>Lr02g004820</i>	<i>LrMATE12</i>	487	53 681.44	6.70	33.21	114.15	0.675	细胞膜
<i>Lr02g004821</i>	<i>LrMATE13</i>	486	53 452.86	6.59	28.22	115.51	0.666	细胞膜
<i>Lr02g004965</i>	<i>LrMATE14</i>	547	60 079.08	8.26	35.00	111.06	0.496	细胞膜
<i>Lr03g000607</i>	<i>LrMATE15</i>	501	54 657.41	6.45	29.13	119.92	0.726	细胞膜、液泡膜
<i>Lr03g001192</i>	<i>LrMATE16</i>	518	57 478.97	8.81	35.55	116.72	0.601	细胞膜
<i>Lr03g001570</i>	<i>LrMATE17</i>	426	45 909.73	9.08	29.36	121.38	0.743	细胞膜
<i>Lr03g002314</i>	<i>LrMATE18</i>	524	57 271.99	8.70	40.57	116.55	0.555	细胞膜
<i>Lr03g002468</i>	<i>LrMATE19</i>	497	54 224.31	6.65	25.48	128.11	0.810	细胞膜
<i>Lr03g004151</i>	<i>LrMATE20</i>	495	53 955.99	6.66	29.46	121.11	0.674	细胞膜
<i>Lr03g004152</i>	<i>LrMATE21</i>	495	53 982.92	6.40	29.33	121.31	0.665	细胞膜
<i>Lr04g001759</i>	<i>LrMATE22</i>	506	55 575.33	6.52	30.02	108.36	0.591	细胞膜
<i>Lr04g002682</i>	<i>LrMATE23</i>	576	62 777.03	8.57	28.11	117.67	0.636	细胞膜、液泡膜
<i>Lr04g002793</i>	<i>LrMATE24</i>	503	54 979.72	5.77	30.90	120.95	0.739	细胞膜、液泡膜
<i>Lr04g003901</i>	<i>LrMATE25</i>	474	51 849.02	8.92	26.57	124.45	0.746	细胞膜
<i>Lr04g003964</i>	<i>LrMATE26</i>	510	56 598.09	8.27	43.22	120.51	0.560	细胞膜
<i>Lr05g002208</i>	<i>LrMATE27</i>	519	57 049.97	5.84	30.32	108.67	0.645	细胞膜
<i>Lr05g002212</i>	<i>LrMATE28</i>	517	56 427.42	6.93	27.20	114.74	0.669	细胞膜
<i>Lr05g003296</i>	<i>LrMATE29</i>	484	52 863.58	7.46	31.79	118.53	0.682	细胞膜
<i>Lr05g003298</i>	<i>LrMATE30</i>	308	33 698.14	8.06	36.04	121.30	0.828	细胞膜、液泡膜
<i>Lr06g001080</i>	<i>LrMATE31</i>	581	62 799.79	8.80	33.07	115.22	0.544	细胞膜
<i>Lr06g001861</i>	<i>LrMATE32</i>	544	58 672.10	9.18	30.31	109.82	0.519	液泡膜
<i>Lr06g003336</i>	<i>LrMATE33</i>	503	54 888.86	6.10	30.14	116.34	0.697	细胞膜
<i>Lr07g000043</i>	<i>LrMATE34</i>	470	51 000.22	8.67	28.73	115.21	0.572	细胞膜
<i>Lr07g000048</i>	<i>LrMATE35</i>	490	53 663.59	9.24	23.68	113.67	0.605	细胞膜
<i>Lr07g000049</i>	<i>LrMATE36</i>	478	51 855.27	6.71	32.24	115.33	0.608	细胞膜
<i>Lr08g001988</i>	<i>LrMATE37</i>	483	52 533.86	9.04	33.71	116.54	0.608	细胞膜
<i>Lr08g003090</i>	<i>LrMATE38</i>	569	62 551.59	8.51	31.27	121.18	0.651	细胞膜、叶绿体
<i>Lr08g003220</i>	<i>LrMATE39</i>	462	50 442.46	8.11	38.12	109.96	0.537	细胞膜
<i>Lr09g004014</i>	<i>LrMATE40</i>	514	56 587.90	6.36	35.41	122.22	0.608	细胞膜
<i>Lr10g000373</i>	<i>LrMATE41</i>	494	54 753.68	6.50	35.09	114.49	0.738	细胞膜
<i>Lr10g003121</i>	<i>LrMATE42</i>	490	53 465.31	6.11	34.10	122.00	0.717	细胞膜
<i>Lr10g003127</i>	<i>LrMATE43</i>	465	51 199.17	7.04	34.77	111.57	0.584	细胞膜
<i>Lr10g003624</i>	<i>LrMATE44</i>	405	43 890.94	9.09	22.73	118.12	0.669	细胞膜、液泡膜
<i>Lr11g001230</i>	<i>LrMATE45</i>	535	58 526.49	6.02	28.15	115.57	0.638	细胞膜、液泡膜
<i>Lr12g000756</i>	<i>LrMATE46</i>	542	57 980.91	6.46	33.16	115.79	0.597	细胞膜、叶绿体
<i>Lr12g001010</i>	<i>LrMATE47</i>	480	52 241.64	6.66	32.61	123.12	0.742	细胞膜、液泡膜
<i>Lr12g002751</i>	<i>LrMATE48</i>	523	55 595.25	8.74	33.86	119.77	0.634	液泡膜
<i>Lr12g002752</i>	<i>LrMATE49</i>	562	60 835.32	5.51	31.70	114.02	0.623	细胞膜、液泡膜
<i>Lr12g003143</i>	<i>LrMATE50</i>	471	51 470.03	7.53	27.90	127.73	0.733	细胞膜
<i>Lr12g003144</i>	<i>LrMATE51</i>	502	55 607.96	8.90	34.30	127.43	0.729	细胞膜
<i>Lr12g003145</i>	<i>LrMATE52</i>	479	52 179.82	8.74	31.80	126.22	0.724	细胞膜、液泡膜
<i>Lr12g003403</i>	<i>LrMATE53</i>	495	53 640.65	6.10	34.60	118.53	0.693	细胞膜

结果显示其不均匀地分布于 12 条染色体上(图 1)。其中, Chr12 上分布的基因数量最多, 共 8 个, 约占家族成员总数的 15.09%; Chr01、Chr02 和 Chr03 次之, 均含有 7 个基因。Chr09 和 Chr11 基因分布数量最少, 均只有 1 个。其余染色体上 *LrMATE* 基因数目为 3~5 个。从染色体分布格局看, *LrMATE* 基因在不同染色体上的分布具有明显不均衡性, 且部分成员呈现局部聚集分布特征。Chr01、Chr02、

Chr03 和 Chr12 上分布的 *LrMATE* 基因数量较多, 并多个成员位于染色体相邻或相近区域, 说明该家族成员在染色体上的分布并非随机形成。结合其局部集中分布特征推测, 基因复制或局部扩增事件可能参与了黑果枸杞 *LrMATE* 家族成员的扩张。

为明确黑果枸杞 *LrMATE* 蛋白的系统发育关系及其潜在功能, 将 53 个 *LrMATE* 蛋白与 56 个拟南芥 *MATE* 蛋白共同构建系统发育树(图 2)。根据

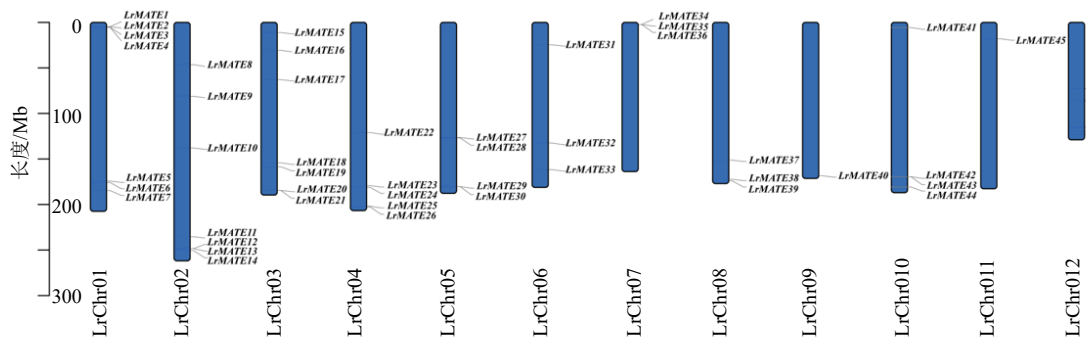
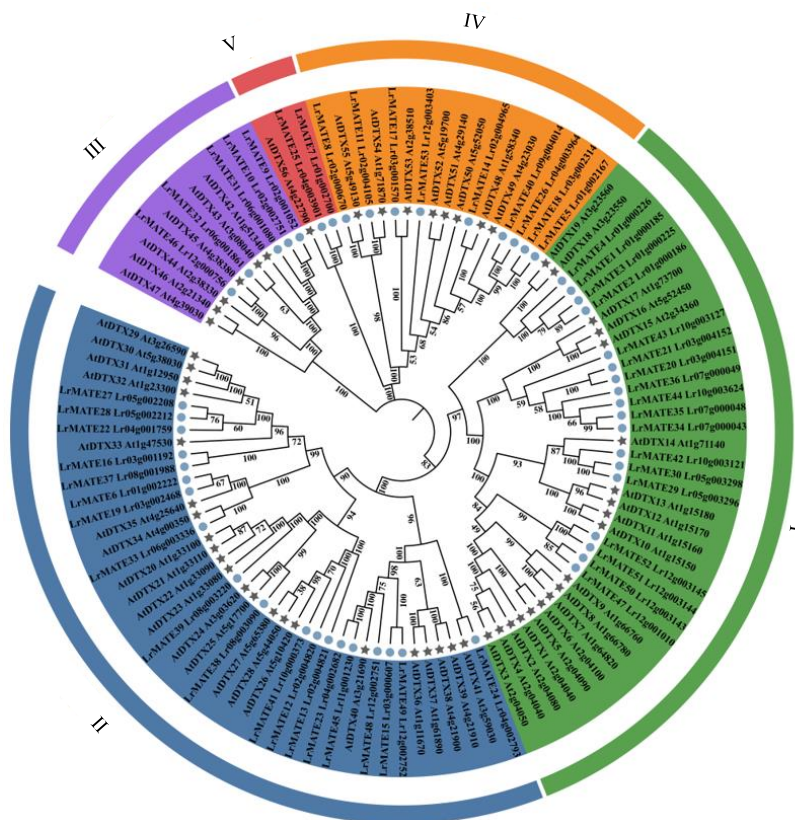


图 1 黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族成员染色体定位信息

Fig. 1 Chromosomal location of *LrMATE* gene family members in *L. ruthenicum*



不同颜色表示不同亚家族分组, 分支节点处数值表示 bootstrap 支持率。

Different colors represent different subfamily groups, and the numbers at branch nodes indicate bootstrap support values.

图 2 拟南芥与黑果枸杞蛋白系统发育树

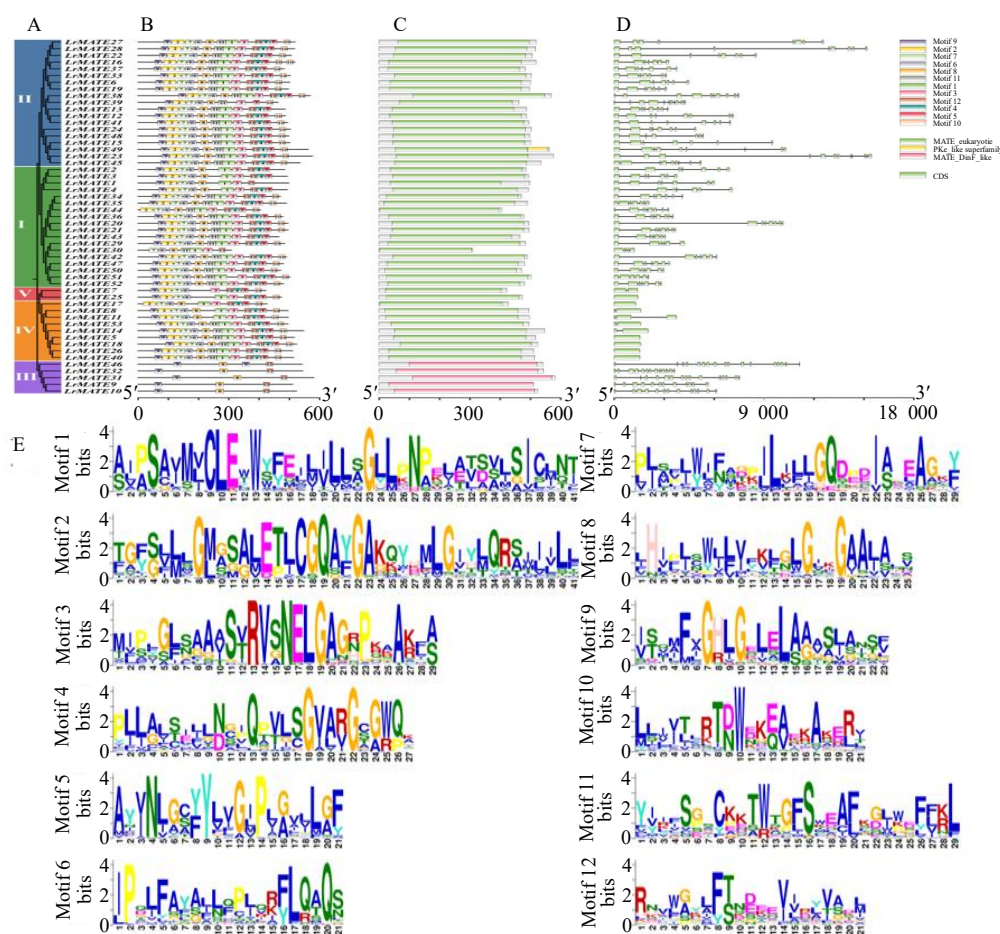
Fig. 2 Phylogenetic tree of MATE proteins from *A. thaliana* and *L. ruthenicum*

系统发育树拓扑结构及拟南芥 MATE 家族的分群特征, 109 个 MATE 蛋白可划分为 5 个亚家族 (Group I~V)。系统发育分析结果表明, 53 个 LrMATE 成员在各亚家族中的分布不均, 其中 Group II 和 Group I 成员较多, 分别含 19 个和 18 个; Group IV 含 9 个, Group III 含 5 个, Group V 仅含 2 个。表明黑果枸杞 LrMATE 家族在不同亚家族中的扩张程度存在明显差异, 提示其在进化过程中可能经历了不同程度的基因复制与功能分化。从聚类关系看, 多数 LrMATE 蛋白与拟南芥 MATE 蛋白在各亚家族内交错分布, 说明二者具有一定同源性和进化保守性。值得注意的是, 拟南芥中已报道参与花青素液泡转运的 AtTT12 (AtDTX41) 位于 Group II。该亚家族中, LrMATE24、LrMATE49、LrMATE15、LrMATE48、

LrMATE45 和 LrMATE23 与 AtTT12 聚为较近分支; LrMATE12、LrMATE13、LrMATE38、LrMATE6、LrMATE37、LrMATE28 和 LrMATE27 等成员亦归属于 Group II。结合 AtTT12 的液泡转运功能, 推测该亚家族中部分成员可能与黑果枸杞果实花青素跨膜转运和液泡积累有关。

3.3 LrMATE 基因家族的进化保守性与结构多样性分析

为明确黑果枸杞 LrMATE 家族成员的结构特征, 对 53 个 LrMATE 蛋白的保守基序、结构域组成及基因结构进行了综合分析 (图 3)。结果显示, 不同亚家族成员在保守基序组成、结构域类型和基因结构上存在一定差异, 而同一亚家族内成员整体较为相似, 表明该家族在进化过程中兼具结构保守性和多样性。



A-系统发育树; B-保守基序; C-保守结构域; D-基因结构; E-保守基序序列图。

A-phylogenetic tree; B-conserved motifs; C-conserved domains; D-gene structures; E-sequence logos of conserved motifs.

图 3 LrMATE 蛋白保守基序、结构域及基因结构分析

Fig. 3 Conserved motif, domain, and gene structure analyses of LrMATE proteins in *L. ruthenicum*

在 53 个 *LrMATE* 蛋白中共鉴定到 12 个保守基序, 分别命名为 Motif 1~Motif 12。多数 *LrMATE* 蛋白的基序组成较为保守, 其中 Motif 8、Motif 9、Motif 10 和 Motif 12 在绝大多数成员中均有分布, 其余基序在不同成员中的分布存在一定差异。Group I、Group II 和 Group IV 成员基序组成较丰富, 排列顺序相对一致; Group III 成员所含基序数目明显减少, 且基序组成与其他亚家族差异明显, 表明该分支在序列特征上已发生较明显分化。此外, *LrMATE46* 和 *LrMATE16* 中分别出现 Motif 9 和 Motif 10 的重复分布, 提示其局部序列结构可能具有一定特殊性。同一亚家族内成员通常具有相似的基序分布模式, 与系统发育分群结果基本一致, 进一步支持了该分群的可靠性。

结构域分析显示, 多数 *LrMATE* 蛋白含有典型的 MATE_eukaryotic 结构域, 主要分布于 Group I、Group II 和 Group IV, 与其较保守的基序组成基本一致; Group III 成员主要含有 MATE_DinF_like 结构域, 与其在系统发育树中的独立分支特征相吻合。值得注意的是, 个别成员除含有 MATE 核心结构域外, 还预测到其他附加结构域, 如 *LrMATE49* 含有 PKc_like superfamily 相关结构域, 提示其结构组成可能具有一定差异。

基因结构分析表明, *LrMATE* 家族成员的编码区组织形式存在明显差异。总体来看, 不同亚家族之间 CDS 片段数目、长度及分布模式差异较大, 而同一亚家族内部较为相似。如 *LrMATE27*、*LrMATE28* 和 *LrMATE23* 的基因跨度较大, CDS 片段较多, 结构相对复杂; 而 *LrMATE9*、*LrMATE10*、*LrMATE31* 等基因的 CDS 片段较少, 结构相对简单。部分同亚家族成员之间也存在结构差异, 如 *LrMATE30* 与 *LrMATE20*、*LrMATE21* 的 CDS 组成并不完全一致。

综上, 黑果枸杞 *LrMATE* 家族成员在保守基序、结构域组成和基因结构方面整体具有一定保守性, 但不同亚家族间仍表现出明显结构差异。该结果进一步支持了系统发育分群的合理性, 也为后续筛选花青素转运相关候选基因提供了结构生物学依据。

3.4 *LrMATE* 基因家族的启动子顺式作用元件分析

对黑果枸杞 *LrMATE* 基因起始密码子上游 2 000 bp 启动子序列进行顺式作用元件预测, 共鉴定到 93 种顺式作用元件。去除 TATA-box、CAAT-box 等基

础核心元件后, 将其归为转录调控、激素响应、逆境与胁迫响应、光响应、生长发育相关及其他元件 6 类。统计结果显示, 光响应元件占比最高, 为 26.6%; 其次为转录调控元件和激素响应元件, 分别占 26.5%和 22.0%; 逆境与胁迫响应元件占 18.6%, 生长发育相关元件和其他元件分别占 3.8%和 2.6% (图 4-A)。这一结果表明, *LrMATE* 基因家族的表达可能受到光信号、转录调控、激素信号及环境胁迫等多种因素的影响。

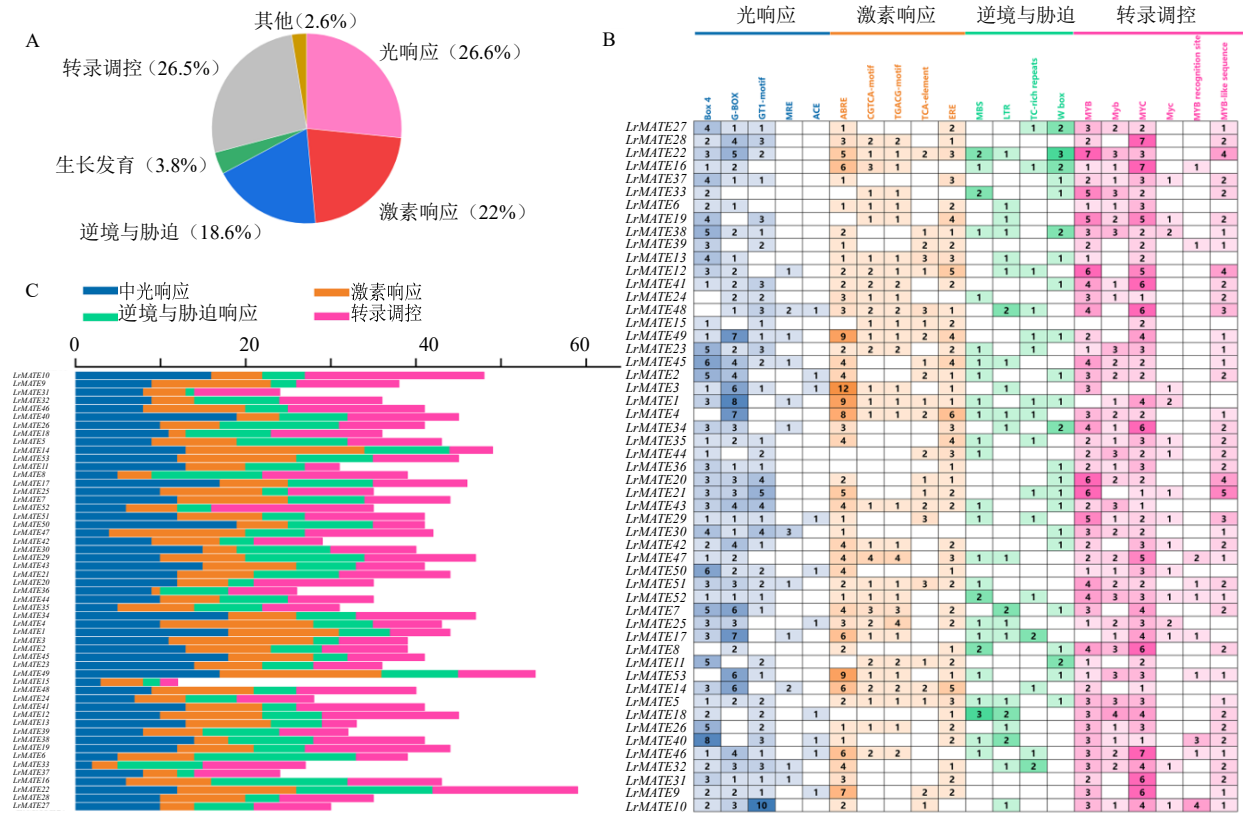
3.5 *LrMATE* 基因家族共线性分析

黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族物种内共线性分析共鉴定到 16 对共线性基因对 (表 3, 图 5), 且多数基因对分布于不同染色体之间, 表明片段复制可能是该家族扩张的重要方式。其中, *Lr06g004602* 和 *Lr11g003158* 因编码序列不完整, 仅在共线性分析中保留, 未纳入后续结构和系统发育分析。 K_a/K_s 分析显示, 所有共线性基因对的 K_a/K_s 值均小于 1, 范围在 0.095~0.308, 表明 *LrMATE* 家族在进化过程中主要受到纯化选择作用, 功能整体较为保守。基于 $\lambda=1.5\times 10^{-8}$ 估算, 共线性基因对的分化时间为 5.60~84.50 Mya (1 Mya = 1×10^6 年前), 其中 *LrMATE9/LrMATE10* 的分离时间最短, 为 5.60 Mya; *LrMATE19/LrMATE33* 最长, 为 84.50 Mya, 表明该家族扩张可能经历了多个复制时期。

进一步开展了黑果枸杞与拟南芥、马铃薯和烟草的种间共线性分析 (图 6)。结果显示, 黑果枸杞分别与拟南芥、马铃薯和烟草检测到 29、60 和 114 对 *LrMATE* 相关共线性基因对, 对应的 *LrMATE* 成员数分别为 21、37 和 37 个。与拟南芥相比, 黑果枸杞与马铃薯、烟草之间共线性基因对更多, 且涉及成员范围更广, 表明 *LrMATE* 家族在茄科植物中更为保守。部分 *LrMATE* 基因与多个外源同源基因形成共线性关系, 提示该家族在进化过程中可能经历了基因复制与扩张, 并在物种分化后得到了一定保留。

3.6 黑果枸杞果实不同发育阶段花青素转运相关候选 *LrMATE* 基因的筛选与验证

为筛选可能参与黑果枸杞果实花青素转运与积累的 *LrMATE* 基因, 本研究测定了 5 个发育时期果实花青素含量变化。结果显示, 随着果实发育成熟, 花青素含量总体呈持续升高趋势 (图 7-A、B)。S1 和 S2 阶段花青素含量较低, 二者差异不显著; 自 S3 阶段起显著升高, 并在 S4 和 S5 阶段快速积



A-顺式作用元件功能分类及比例; B-不同 *LrMATE* 基因启动子中代表性顺式作用元件的数量分布, 表格中数字表示对应元件的个数, 不同底色表示不同功能类别, 颜色深浅用于辅助显示同类元件数量差异; C-不同 *LrMATE* 基因启动子中光响应、激素响应、逆境与胁迫响应及转录调控相关元件的总数统计。

A-functional classification and proportions of *cis*-acting elements; B-distribution of representative *cis*-acting elements in the promoters of different *LrMATE* genes; The numbers in the cells indicate the number of corresponding elements, different background colors represent different functional categories, and the color intensity indicates differences in the number of elements within the same category; C-total numbers of light-responsive, hormone-responsive, stress-responsive, and transcriptional regulation-related elements in the promoters of different *LrMATE* genes.

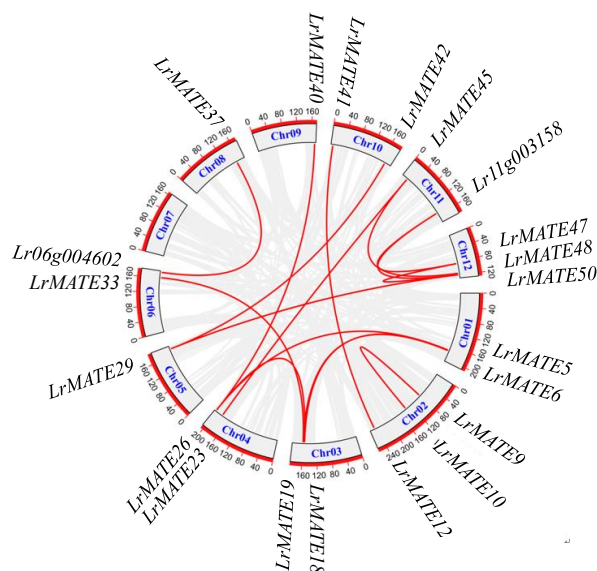
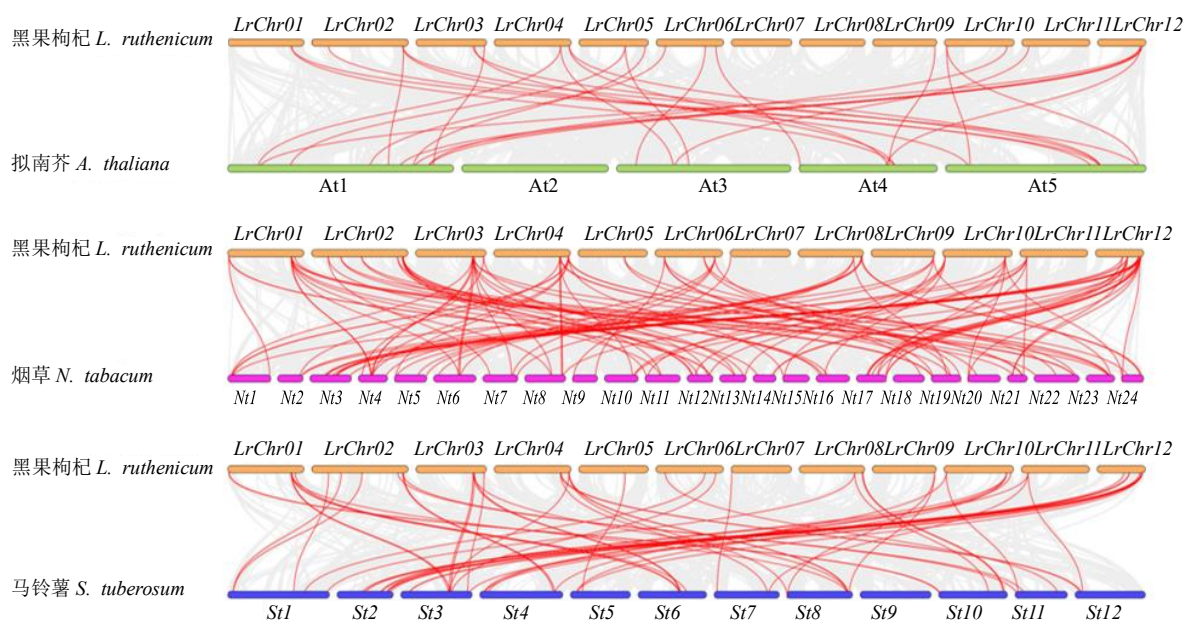
图 4 *LrMATE* 基因家族启动子顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of *cis*-acting elements in promoter regions of *LrMATE* gene family

表 3 基因对分离时间的估算

Table 3 Estimation of divergence time for gene pairs

基因对	K_a	K_s	K_a/K_s	分离时间/Mya	复制类型
<i>LrMATE5/LrMATE18</i>	0.099	0.857	0.115	28.57	片段复制
<i>LrMATE6/LrMATE19</i>	0.165	1.097	0.150	36.57	片段复制
<i>LrMATE5/LrMATE26</i>	0.204	1.358	0.150	45.27	片段复制
<i>LrMATE9/LrMATE10</i>	0.022	0.168	0.131	5.60	片段复制
<i>LrMATE12/LrMATE41</i>	0.227	1.907	0.119	63.57	片段复制
<i>LrMATE18/LrMATE26</i>	0.193	2.026	0.095	67.53	片段复制
<i>LrMATE19/LrMATE33</i>	0.299	2.535	0.118	84.50	片段复制
<i>LrMATE26/LrMATE40</i>	0.144	1.091	0.132	36.37	片段复制
<i>LrMATE23/LrMATE45</i>	0.141	0.910	0.155	30.33	片段复制
<i>LrMATE29/LrMATE42</i>	0.210	0.682	0.308	22.73	片段复制
<i>LrMATE29/LrMATE50</i>	0.360	1.296	0.278	43.20	片段复制
<i>Lr06g004602/LrMATE37</i>	0.222	0.754	0.295	25.13	片段复制
<i>LrMATE45/LrMATE48</i>	0.208	2.202	0.095	73.40	片段复制
<i>Lr11g003158/LrMATE50</i>	0.158	0.635	0.248	21.17	片段复制
<i>Lr11g003158/LrMATE47</i>	0.320	1.219	0.262	40.63	片段复制
<i>LrMATE47/LrMATE50</i>	0.255	1.129	0.226	37.63	片段复制

图 5 *LrMATE* 基因家族物种内共线性分析Fig. 5 Intraspecies synteny analysis of *LrMATE* gene family图 6 *LrMATE* 基因家族物种间共线性分析Fig. 6 Interspecies synteny analysis of *LrMATE* gene family

累, S5 阶段达到最高水平, 且显著高于其他时期, 表明 S3~S5, 尤其是 S4 和 S5 阶段, 是黑果枸杞果实花青素快速积累的关键时期。

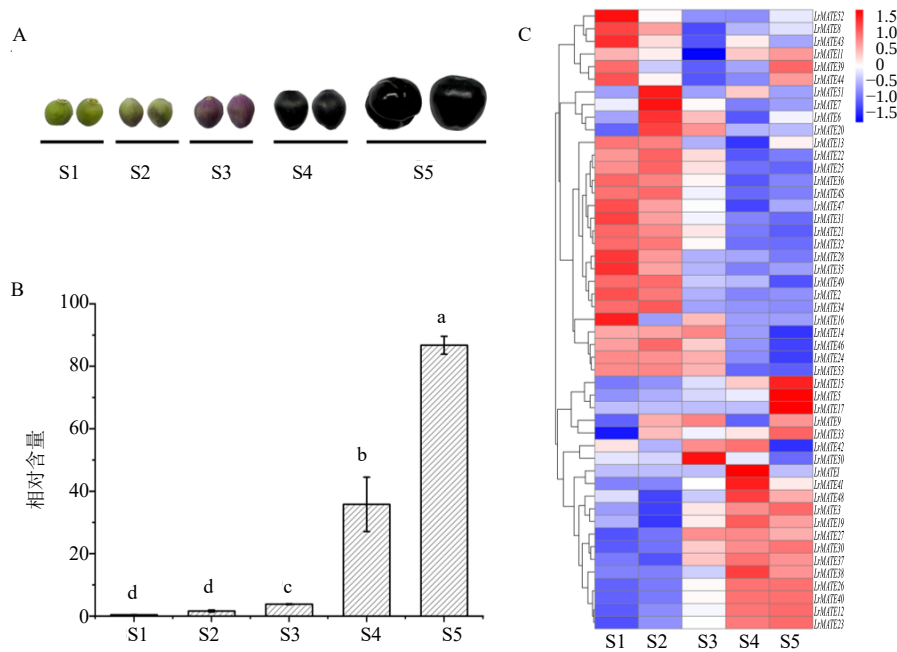
基于前期转录组数据, 进一步分析了 *LrMATE* 家族成员在黑果枸杞果实不同发育时期的表达模式 (图 7-C)。结果显示, 不同 *LrMATE* 基因呈现明显的阶段特异性表达特征。部分成员在果实发育早期表达量较高, 随后逐渐降低, 如 *LrMATE52*、*LrMATE8*、*LrMATE43* 等; 部分成员在果实转色后

期及成熟期表达量明显升高, 如 *LrMATE12*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE38*、*LrMATE40* 等。结合果实表型及花青素含量变化可知, 黑果枸杞花青素主要在 S4 和 S5 阶段快速积累, 因此, 在该阶段表达增强或维持较高表达水平的 *LrMATE* 成员可能与花青素转运及液泡积累过程有关。

综合系统发育关系、亚细胞定位预测、花青素积累动态及表达模式特征, 初步筛选出 10 个可能参与花青素转运与积累的候选基因, 包括

LrMATE12、*LrMATE19*、*LrMATE23*、*LrMATE27*、*LrMATE30*、*LrMATE37*、*LrMATE38*、*LrMATE40*、*LrMATE41* 和 *LrMATE48*。为验证 RNA-seq 表达数据的可靠性，根据候选基因表达丰度，选取 8 个候选 *LrMATE* 基因进行了 qRT-PCR 验证。结果显示，qRT-PCR 表达趋势与 RNA-seq 数据总体一致，二者相

关系数 (R^2) 为 0.68~1.00 (图 8)，表明转录组表达数据具有较高可靠性。其中，*LrMATE12*、*LrMATE23*、*LrMATE37*、*LrMATE38* 和 *LrMATE40* 在果实转色后期及成熟期表达明显增强，与花青素快速积累趋势基本一致，而 *LrMATE27* 和 *LrMATE41* 在 S1~S4 阶段表达量持续升高，成熟期开始下降，提示其也



A-黑果枸杞果实 5 个发育阶段的表型变化; B-不同发育阶段果实中花青素相对含量 (不同字母表示差异显著, $P < 0.05$); C-*LrMATE* 基因家族成员在不同发育阶段的表达模式热图。

A-Phenotypic changes in *L. ruthenicum* fruits during five developmental stages; B-anthocyanin content in fruits at different developmental stages, with different letters indicating significant differences ($P < 0.05$); C-heatmap showing the expression patterns of *LrMATE* gene family members at different developmental stages.

图 7 黑果枸杞果实不同发育阶段花青素含量变化及 *LrMATE* 基因表达模式分析

Fig. 7 Anthocyanin content and expression patterns of *LrMATE* genes during different developmental stages of *L. ruthenicum* fruits

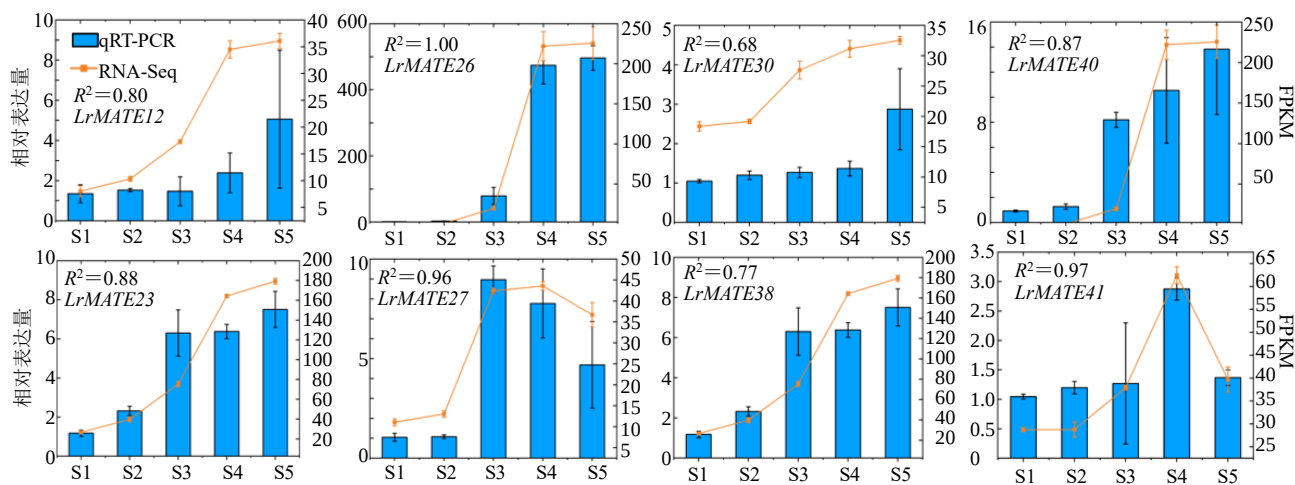
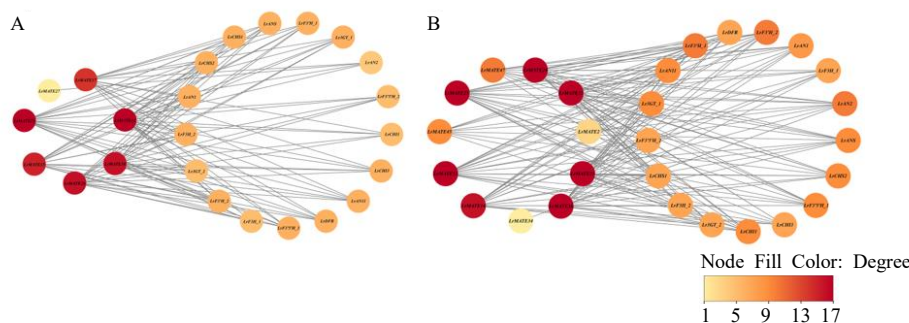


图 8 *LrMATE* 家族基因在黑果枸杞果实不同发育阶段的 qRT-PCR 分析

Fig. 8 qRT-PCR analysis of expression of *LrMATE* gene family members during different developmental stages of *L. ruthenicum* fruits



A-与花青素含量正相关的 *LrMATE* 基因共表达网络；B-与花青素含量负相关的 *LrMATE* 基因共表达网络。

A-Co-expression network of *LrMATE* genes showing positive correlations with anthocyanin content; B-co-expression network of *LrMATE* genes showing negative correlations with anthocyanin content.

图 9 *LrMATE* 基因与花青素生物合成相关基因的共表达网络分析

Fig. 9 Co-expression network analysis between *LrMATE* genes and genes related to anthocyanin biosynthesis

可能参与果实发育后期的花青素相关过程。

为进一步筛选与花青素积累密切相关的 *LrMATE* 成员，本研究以果实发育时期和花青素含量为表型数据，对转录组差异表达基因进行了 WGCNA 分析。结果共获得 8 个共表达模块，其中 darkturquoise 和 darkolivegreen 模块与花青素含量呈显著正相关，相关系数分别为 0.80 和 0.78；darkgreen 和 grey60 模块与花青素含量呈显著负相关，相关系数分别为-0.74 和-0.77。在正相关模块中共鉴定到 8 个 *LrMATE* 成员，包括 *LrMATE12*、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE27*、*LrMATE37*、*LrMATE38* 和 *LrMATE39*；负相关模块中鉴定到 11 个 *LrMATE* 成员，提示不同 *LrMATE* 基因与果实花青素积累可能存在不同关联模式。

进一步将上述与花青素含量显著相关的 *LrMATE* 基因与花青素生物合成结构基因及调控基因进行共表达相关性分析。结果显示，正相关模块中的 *LrMATE12*、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE37*、*LrMATE38* 与多个花青素结构基因及调控基因存在较强共表达关系，网络连接度较高；*LrMATE27* 主要与 MYB 类调控基因 *LrAN2* 表现出相似表达模式，而 *LrMATE39* 与花青素相关基因无明显相关性（图 9-A）。负相关模块中的部分 *LrMATE* 成员也与花青素相关基因存在共表达联系，但由于其所在模块与花青素含量呈负相关，推测其可能与果实早期发育、其他次生代谢过程或花青素积累的间接调控有关（图 9-B）。

综合系统发育关系、结构特征、启动子顺式作用元件、花青素含量变化、转录组表达模式、WGCNA 模块相关性及其共表达网络分析，筛选出

LrMATE12、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE27*、*LrMATE37* 和 *LrMATE38* 7 个候选基因。上述基因在果实发育过程中与花青素积累表现出较强关联，推测其可能参与黑果枸杞果实花青素转运与液泡积累过程。

4 讨论

MATE 是近年来发现的一类普遍存在于真核和原核生物中的新型多药和毒性化合物排除蛋白，在植物次生代谢产物转运、离子稳态调节、重金属外排及逆境响应等过程中发挥重要作用^[7]。已有研究表明，部分 MATE 成员可参与花青素、原花青素等类黄酮代谢物由细胞质向液泡中的转运与积累。如拟南芥 AtDTX41/AtTT12 定位于液泡膜，可参与类黄酮底物转运并影响种皮颜色形成^[8]。苹果、草莓、葡萄等植物中也报道了 MATE 成员与花青素或原花青素液泡转运相关^[13-15]。黑果枸杞果实富含花青素，其花青素生物合成和调控机制已经有了较为清楚的解析，但其 *LrMATE* 基因家族及花青素转运相关成员的研究尚为空白。因此，开展黑果枸杞 *LrMATE* 基因家族鉴定及候选基因筛选，对解析其果实花青素积累机制具有重要意义。

本研究从黑果枸杞基因组中鉴定获得了 53 个 *LrMATE* 成员，数量与拟南芥、番茄、马铃薯和辣椒等物种接近，但低于烟草^[16-20]，说明植物 MATE 家族成员数目在不同物种间存在差异，这可能与物种基因组大小、倍性水平及家族扩张历史有关。理化性质和亚细胞定位预测显示，*LrMATE* 蛋白长度为 308~581 aa，多数成员均具有较强疏水性，并主要定位于细胞膜和液泡膜等膜系统，符合 MATE 跨膜转运蛋白的基本特征^[7]。染色体定位和共线性分

析表明, *LrMATE* 基因在黑果枸杞染色体上呈不均匀分布, 并检测到 16 对物种内共线性基因对; 所有共线性基因对的 K_a/K_s 值均小于 1, 表明该家族在进化过程中主要受到纯化选择作用。结合物种内共线性分析结果推测, 片段复制可能是驱动黑果枸杞 *LrMATE* 家族扩张的重要因素。类似现象在茄科植物马铃薯^[18]中也有报道。

系统发育分析将黑果枸杞和拟南芥 MATE 蛋白划分为 5 个亚家族。不同亚家族成员在保守基序、结构域组成和基因结构上存在差异, 而同一亚家族内部结构特征相对一致, 说明系统发育分群结果具有一定可靠性。值得注意的是, 拟南芥 AtTT12/AtDTX41 位于 Group II, 该蛋白已被证实与类黄酮化合物液泡转运密切相关^[8]。本研究多个 *LrMATE* 成员与 AtTT12 同属 Group II, 提示该亚家族可能包含与黑果枸杞花青素转运相关的候选成员。结合亚细胞定位预测结果, 部分候选 *LrMATE* 蛋白定位于液泡膜或细胞膜, 进一步支持其可能参与花青素跨膜转运和液泡积累过程。

为筛选花青素转运相关候选基因, 本研究进一步结合果实不同发育时期花青素含量、转录组表达模式、qRT-PCR 验证、WGCNA 模块相关性及其表达网络分析。结果表明, *LrMATE12*、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE27*、*LrMATE37* 和 *LrMATE38* 在果实转色及成熟阶段表现出较高表达或上调趋势, 并与花青素快速积累过程基本一致; 同时, 这些基因与花青素生物合成结构基因或调控基因存在较强共表达关系, 提示其可能参与黑果枸杞果实花青素转运与积累过程。

启动子顺式作用元件分析显示, 7 重点候选 *LrMATE* 基因启动子中含有 MYB、MYC、Myc、G-box、Box4、ABRE、ERE、CGTCA-Motif 等多种与花青素调控相关的顺式作用元件。已有研究表明, 花青素生物合成和积累通常受 MYB-bHLH-WD40 转录复合体、光信号及植物激素共同调控^[21-23]。因此, 上述候选 *LrMATE* 基因可能受到转录因子、光信号及激素信号的协同调控, 并参与果实着色过程中花青素的转运和积累。此外, 部分候选基因启动子中还存 MBS、LTR 等逆境与防御响应相关元件, 提示其可能与胁迫诱导的次生代谢调节有关。综合上述顺式作用元件分布特征, 候选 *LrMATE* 基因可能受到转录因子、光信号、激素信号及环境胁迫等多因素调控, 从而参与花青素积累相关过程。

综上, 本研究从黑果枸杞基因组中共鉴定出 53 个 *LrMATE* 基因家族成员, 并系统分析了其蛋白理化性质、染色体定位、系统发育关系、基因结构、顺式作用元件及共线性特征。结合果实不同发育阶段转录组数据和花青素含量变化, 筛选出 *LrMATE12*、*LrMATE15*、*LrMATE23*、*LrMATE26*、*LrMATE27*、*LrMATE37* 和 *LrMATE38* 7 个花青素转运与积累相关候选基因。上述结果解析黑果枸杞果实花青素积累和色泽形成机制提供了新的候选基因资源。该研究不仅有助于深入理解黑果枸杞中花青素等重要药用活性成分的形成机制, 也可为其果实品质改良、功能成分开发及高花青素种质资源选育提供理论依据和基因资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li F, Li H J, Li S B, et al. A review of *Lycium ruthenicum* Murray: Geographic distribution tracing, bioactive components, and functional properties [J]. *Heliyon*, 2024, 10(21): e39566.
- [2] Yan Y Z, Nisar T, Fang Z X, et al. Current developments on chemical compositions, biosynthesis, color properties and health benefits of black goji anthocyanins: an updated review [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(11): 1033.
- [3] Islam T, Yu X M, Badwal T S, et al. Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*) [J]. *Chem Cent J*, 2017, 11(1): 59.
- [4] Chen S S, Hu N, Wang H L, et al. The major anthocyanin of *Lycium ruthenicum* Murr. relieves cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation, and hippocampal metabolome alterations in aging rats [J]. *J Funct Foods*, 2022, 94: 105104.
- [5] Zhao J. Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom [J]. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(9): 576-585.
- [6] Gomez C, Conejero G, Torregrosa L, et al. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST [J]. *Plant J*, 2011, 67(6): 960-970.
- [7] Upadhyay N, Kar D, Deepak Mahajan B, et al. The multitasking abilities of MATE transporters in plants [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(18): 4643-4656.
- [8] Marinova K, Pourcel L, Weder B, et al. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(6): 2023-2038.

- [9] Yuan J W, Qiu Z J, Long Y, *et al.* Functional identification of PhMATE1 in flower color formation in *Petunia* [J]. *Physiol Plant*, 2023, 175(3): e13949.
- [10] Cao X Y. The vacuolar transporters MaMATE11 and MaMATE14 affect blue flower coloration in grape hyacinth (*Muscari*) [J]. *Hortic Res*, 2026, 13: uhaf270.
- [11] Liang Y L, Li S M, Li Y, *et al.* The near-complete genome of *Lycium ruthenicum* shed light on the genetic mechanism of the fruit color differentiation [J]. *Hortic Plant J*, 2025, 11(6): 2297-2300.
- [12] Li T T, Wang J J, Zhang Z H, *et al.* Anthocyanin biosynthesis in goji berry is inactivated by deletion in a bHLH transcription factor *LrLAN1b* promoter [J]. *Plant Physiol*, 2024, 195(2): 1461-1474.
- [13] Frank S, Keck M, Sagasser M, *et al.* Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the *Arabidopsis* transparent testa12 mutant [J]. *Plant Biol*, 2011, 13(1): 42-50.
- [14] Chen S Y, Tang Y M, Hu Y Y, *et al.* FaTT12-1, a multidrug and toxin extrusion (MATE) member involved in proanthocyanidin transport in strawberry fruits [J]. *Sci Hortic*, 2018, 231: 158-165.
- [15] Gomez C, Terrier N, Torregrosa L, *et al.* Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 402-415.
- [16] Li L G, He Z Y, Pandey G K, *et al.* Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(7): 5360-5368.
- [17] dos Santos A L, Chaves-Silva S, Yang L N, *et al.* Global analysis of the MATE gene family of metabolite transporters in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 2017, 17(1): 185.
- [18] Huang Y, He G D, Tian W J, *et al.* Genome-wide identification of MATE gene family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and expression analysis in heavy metal stress [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 650500.
- [19] Chen Q F, Wang L N, Liu D, *et al.* Identification and expression of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) gene family in *Capsicum annuum* and *Solanum tuberosum* [J]. *Plants*, 2020, 9(11): 1448.
- [20] Gani U, Sharma P, Tiwari H, *et al.* Comprehensive genome-wide identification, characterization, and expression profiling of MATE gene family in *Nicotiana tabacum* [J]. *Gene*, 2021, 783: 145554.
- [21] Zhu Z X, Wang H L, Wang Y T, *et al.* Characterization of the *cis* elements in the proximal promoter regions of the anthocyanin pathway genes reveals a common regulatory logic that governs pathway regulation [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(13): 3775-3789.
- [22] Li S R, Ou C Q, Wang F, *et al.* Ppbbx24-del mutant positively regulates light-induced anthocyanin accumulation in the 'Red Zaosu' pear (*Pyrus pyrifolia* White Pear Group) [J]. *J Integr Agric*, 2025, 24(7): 2619-2639.
- [23] Muhammad N, Liu Z G, Wang L X, *et al.* The underlying molecular mechanisms of hormonal regulation of fruit color in fruit-bearing plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2024, 114(5): 104.

[责任编辑 时圣明]