

红花 *CtFDs* 基因的克隆及异源表达分析

于丽莉¹, 黎继华¹, 张煜茹¹, 赵虹¹, 李校堃^{1,3}, 张健^{1*}, 刘秀明^{1,2*}

1. 石河子大学红花产业研究院/药学院, 新疆 石河子 832000

2. 吉林农业大学生命科学学院/生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

3. 温州医科大学, 浙江 温州 325000

摘要:目的 从红花 *Carthamus tinctorius* 基因组中克隆 *CtFD1* 与 *CtFD2* 基因, 对其进行生物信息学、表达特异性和亚细胞定位分析。方法 基于红花基因组筛选并克隆 *CtFD1* 与 *CtFD2* 基因, 利用生物信息学在线网站进行理化性质、保守结构域等分析; 通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测其组织表达特性; 利用烟草瞬时表达系统检测观察亚细胞定位情况; 通过优化诱导剂浓度及温度使蛋白为可溶性表达。结果 *CtFD1* 与 *CtFD2* 基因 CDS 大小分别为 726 bp 和 540 bp, 编码 241 和 179 个氨基酸。二者均包含典型的 bZIP 转录因子结合域, 为亲水性蛋白, 定位于细胞核。系统进化树显示与黄花蒿 *Artemisia annua* 亲缘关系较近。组织表达分析表明, *CtFD1* 与 *CtFD2* 基因在茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 中表达量最高。原核表达分析结果显示在 16 °C、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 时, 蛋白可在上清中大量表达。结论 *CtFD1* 与 *CtFD2* 基因属于 bZIP 家族成员, 在红花茎尖分生组织中表达量最高, 表明这 2 个基因对红花开花调控可能发挥重要作用, 为进一步研究基因功能及开花机制解析提供了科学依据。

关键词: 红花; *CtFDs* 基因; 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)10-3954-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.10.023

Cloning and heterologous expression analysis of *CtFDs* gene from *Carthamus tinctorius*

YU Lili¹, LI Jihua¹, ZHANG Yuru¹, ZHAO Hong¹, LI Xiaokun^{1,3}, ZHANG Jian¹, LIU Xiuming^{1,2}

1. Institute for Safflower Industry Research of Shihezi University/Pharmacy College of Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Engineering Research Center of the Chinese Ministry of Education for Bioreactor and Pharmaceutical Development, College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To clone the *CtFD1* and *CtFD2* genes from the genome of *Carthamus tinctorius* and perform bioinformatics, expression specificity, and subcellular localization analyses. **Methods** The *CtFD1* and *CtFD2* genes were screened and cloned based on the *C. tinctorius* genome. Bioinformatics online tools were used to analyze physicochemical properties, conserved domains, and other features. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed to examine tissue-specific expression patterns. Subcellular localization was observed using a tobacco transient expression system. Soluble expression of the proteins was achieved by optimizing inducer concentration and temperature. **Results** The coding sequences (CDS) of *CtFD1* and *CtFD2* were 726 bp and 540 bp in length, encoding 241 and 179 amino acids, respectively. Both proteins contained a typical bZIP transcription factor binding domain, which were hydrophilic, and localized to the nucleus. Phylogenetic analysis indicated a close evolutionary relationship with *Artemisia annua*. Tissue expression analysis showed that *CtFD1* and *CtFD2* were most highly expressed in shoot apical meristem (SAM). Prokaryotic expression analysis revealed that both proteins were abundantly expressed in the supernatant at 16 °C with an IPTG concentration of 0.2 mmol/L. **Conclusion** The *CtFD1* and *CtFD2* genes belong to the bZIP family and exhibit the highest

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 兵团自然科学基金支持计划重点项目 (2025DA003); 新疆院士人才发展基金

作者简介: 于丽莉 (1998—), 女, 博士研究生, 研究方向为红花活性成分代谢调控。E-mail: 15640309810@163.com

*通信作者: 刘秀明 (1981—), 女, 教授, 博士生导师, 从事红花活性成分代谢调控及产品研发。E-mail: xmliu@jlu.edu.cn

张健 (1986—), 男, 讲师, 从事生物反应器与产品研发。E-mail: as1220@163.com

expression levels in the SAM of *C. tinctorius*, suggesting that they may play important roles in regulating flowering. This study provides a scientific basis for further functional characterization of these genes and elucidation of the flowering mechanism in *C. tinctorius*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; *CtFDs* gene; gene cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

开花是植物从营养生长向生殖生长转变的关键发育过程,直接影响作物的产量、品质及地理适应性^[1]。植物开花作为生命周期中的关键发育转换事件,其调控机制涉及多维信号网络的协同作用^[2]。研究表明,通过对模式植物研究可确定6条主要的调控路径,如光周期途径、春化途径、激素途径、自主途径、年龄途径和环境温度途径^[2-3]。在植物成花转变的调控网络中,由开花位点T (flowering locus T, FT)和开花位点D (flowering locus D, FD)组成的FT-FD模块是整合光周期、温度、年龄等多种开花信号的核心机制之一^[4]。FT蛋白在叶片中产生后经韧皮部运输至茎尖分生组织(SAM),与在SAM特异性表达的FD蛋白相互作用,形成成花激活复合体,进而激活下游花分生组织决定基因(如APETALA1即AP1等)的表达,启动花芽分化^[5-6]。FD蛋白作为bZIP转录因子家族的重要成员,在植物开花调控中发挥关键作用。目前,FD同源基因已在拟南芥^[7]、水稻^[8]、棉花^[9]等多种植物中被鉴定,并证实其功能在进化上相对保守。研究表明,FD基因的表达通常局限于茎尖分生组织,且其编码蛋白定位于细胞核,具备典型的bZIP结构域,能够与FT蛋白发生特异性互作。然而,FD基因在药用植物中的功能研究相对滞后,尤其是在红花 *Carthamus tinctorius* L.中尚未见系统报道。

红花为菊科一年生草本植物,是我国传统中药材之一,具有活血化瘀、通经止痛的功效,其主要活性成分为羟基红花黄色素A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)^[10-12]。HSYA已被应用于临床,主要治疗骨质疏松^[13]、心脑血管疾病^[14]等。红花的花序发育与开花时间不仅影响药材产量,还可能通过调控次生代谢产物的积累影响药材品质^[15]。因此,解析红花开花调控的分子机制,对红花品种改良及高产优质栽培具有重要理论价值和现实意义。尽管本课题组前期已从红花中克隆了多个FT同源基因,并初步证实参与开花调控^[16],但FD基因的序列特征、表达模式及功能机制尚不清楚。

基于此,本研究从红花基因组中筛选并克隆了*CtFD1*与*CtFD2*基因,利用生物信息学方法分析其序列特征、蛋白结构及进化关系;采用qRT-PCR技术检测其不同组织及花发育阶段的表达特性;通

过烟草瞬时表达系统验证其亚细胞定位;同时构建原核表达载体并优化诱导条件,以获得可溶性重组蛋白。研究结果将为深入解析红花FD基因在开花调控网络中的功能奠定基础,也为进一步揭示红花成花转变的分子机制提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究所用“吉红一号”红花由石河子大学红花产业研究院保存,经石河子大学刘秀明教授鉴定为红花 *C. tinctorius* L.。培养条件:25℃、40%湿度,16h光照/8h黑暗。选取长势大小一致的红花,待其形成花苞时,采取其根、茎、叶、茎尖分生组织、花蕾(Bud)、初花期花瓣(IN)、盛花期花瓣(FU)、衰落期花瓣(FA)进行实验,每组3个重复。

1.2 仪器

ChampChemi 9100Plus型全自动化学发光/荧光/凝胶成像分析系统(北京赛制创业科技有限公司),Proflex型实时荧光定量PCR仪(耶拿分析仪器北京有限公司),T10S型PCR仪(杭州郎基科学仪器有限公司),TGL-1650型高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司),全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司),WD-9403X型电泳仪(BIO-RAD公司),UV2355型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),JBZL-08型超声波破碎机(杭州米欧仪器有限公司),激光共聚焦显微镜(日本尼康株式会社)。

1.3 试剂

RNA提取试剂盒(思科捷有限公司,批号AC0202-B)、反转录试剂(思科捷有限公司,批号AG0305-B)、荧光定量PCR试剂(思科捷有限公司,批号AH0105-B)、PrimeSTAR®GXL DNA Polymerase (Takara公司,批号R050A)、IPTG (Solarbio公司)、乙酰丁香酮(Solarbio公司)、MES (Solarbio公司)、氯化镁(Solarbio公司)、*Xba*I和*Sal*I限制性核酸内切酶(愚公生物有限公司)。

2 方法

2.1 总RNA提取和cDNA的合成

采取不同红花组织部位放入无菌无酶的1.5 mL离心管中,加入3颗3 mm氧化锆磁珠后,迅速放入液氮中,利用组织研磨仪以50 Hz将植株研磨

至粉末状备用。使用思科捷 RNA 提取试剂盒（批号 AC0202-B）提取植株总 RNA，利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度。使用反转录试剂盒将 RNA 反转成 cDNA 备用。

2.2 CtFDs 基因的克隆与测序

根据中南民族大学红花基因组数据库注释结果筛选出两条 FD 基因，分别命名为 CtFD1 与 CtFD2。根据其序列，使用 Primer3Plus 在线网站 (<https://www.primer3plus.com/>) 设计特异性引物（表 1），并以红花

茎尖部位的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：5×PrimeSTAR GXL Buffer 10 μL、dNTP Mixture 4 μL、Primer（10 μmol/L）各 1 μL、模板 1 μL、ddH₂O 33 μL。反应程序：98 °C、2 min，98 °C、10 s，55 °C、15 s，72 °C、45 s，30 个循环；72 °C、5 min。产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测，并将目的条带切胶回收后与 pMD19-T 进行连接。将连接产物转化 DH5α 感受态细胞并进行菌落 PCR 验证，将阳性克隆送至上海生工进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5' - 3')	引物用途
CtFD1-F	ATGTTATCTTCTGATGGTGATGA	克隆
CtFD1-R	TTAAAATGGAGCAGTTAATGTCCTCTG	
CtFD2-F	ATGAAATTGACTTCTGAGGACACC	内参基因
CtFD2-R	TCAAAAATGGAGCACTTTTGGTCC	
18SrRNA-F	GAGAAACGGCTACCACATCCAA	qRT-PCR
18SrRNA-R	TCGTTTGAGCCCCGGTATTGTTA	
qRT-CtFD1-F	ATCTCTTCCAACCACTCACCAC	qRT-PCR
qRT-CtFD1-R	TGAAAGATGAATCCCGGGTAGC	
qRT-CtFD2-F	ACTATGCTGACCTTGCTCACC	亚细胞定位
qRT-CtFD2-R	TGTATTCCGGCGGAGAAGTTG	
1300-CtFD1-F	CCGGGGATCCTCTAGAATGTTATCTTCTGATGGTGATGA	亚细胞定位
1300-CtFD1-R	GCTCACCATGTCGACAAATGGAGCAGTTAATGTCCTCTG	
1300-CtFD2-F	CCGGGGATCCTCTAGAATGAAATTGACTTCTGAGGACACC	亚细胞定位
1300-CtFD2-R	GCTCACCATGTCGACAAATGGAGCACTTTTGGTCC	
pET-32a-CtFD1-F	CCATGGCTGATATCGGATCCATGTTATCTTCTGATGGTGATGA	原核表达
pET-32a-CtFD1-R	GGCCGCAAGCTTGTCGACAAATGGAGCAGTTAATGTCCT	
pET-32a-CtFD2-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGAAATTGACTTCTGAGGAC	
pET-32a-CtFD2-R	CGGCCGCAAGCTTGTCGACAAATGGAGCACTTTTGGTCC	

2.3 CtFDs 生物信息学分析

通过 NCBI 网站下载多条 FD 基因序列，利用 MEGA 软件构建系统发育进化树；使用 DNAMAN 软件对其进行多重序列比对；采用 ExPASy 在线网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 CtFDs 蛋白的理化性质；使用 SMART (<https://smart.embl.de/>) 在线网站分析 CtFDs 蛋白保守结构域；使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 在线软件预测 CtFDs 蛋白的二级结构；使用 SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线网站分析 CtFDs 蛋白质的三级结构；使用 WoLF PSORT 在线网站预测 CtFDs 蛋白亚细胞定位。

2.4 CtFDs 基因表达分析

分别提取红花的根、茎、叶、SAM、花蕾期、初花期、盛花期及衰落期花瓣的 RNA 进行反转录，以 18SrRNA 为内参基因，利用 qRT-PCR 检测 CtFDs 基因在不同组织的表达水平（表 1）。反应体系：2×Universal SYBR Green qPCR Mix 10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，cDNA 1 μL，ddH₂O 8.2 μL。反应条件：95 °C、30 s，95 °C、10 s，60 °C、10 s，40 个循环，采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因表达量。

2.5 CtFDs 亚细胞定位分析

根据 CtFDs 的 CDS 序列及 pCAMBIA1300 植物表达载体设计同源臂引物（表 1），以 pMD19-T-CtFDs 为模板进行 PCR 扩增，将目的

序列进行胶回收。利用 *Xba*I 和 *Sal*I 酶切载体并进行产物纯化。通过无缝克隆试剂盒将酶切后的载体与目的片段连接，并转化 DH5 α ，经菌落 PCR 鉴定后将正确条带菌落送去测序。并将测序正确的质粒转化 EHA105 农杆菌中。将该含有重组质粒的菌液培养至 $A_{600}=0.8$ ，利用重悬液将菌液重悬至 $A_{600}=0.6$ 后与核定位 Marker 以 1:1 的比例混合，黑暗静止 2 h 后注射 3 周龄的本氏烟草，暗培养 36 h 后在 488 nm 处观察荧光信号。

2.6 CtFDs 原核表达分析

根据 CtFDs 的 CDS 序列及 pET-32a 原核表达载体设计同源臂引物(表 1)，经同源重组构建 pET-32a-CtFDs 重组载体并转化 Rosetta 大肠杆菌感受态，经菌落 PCR 鉴定后将正确条带菌落送去测序。
 诱导温度优化：将该含有重组质粒的菌液培养至 $A_{600}=0.4$ ，向其中加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG，分别置于 16、28、37 °C 摇床中培养；
 诱导剂浓度优化：将该含有重组质粒的菌液培养至 $A_{600}=0.4$ ，向其中加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L 的 IPTG，置于 16 °C 摇床中培养 16 h；
 以 9 000 r/min、15 min 的条件收集诱导后菌体，利用超声波破碎仪(超声功率 200 W，开 3 s，关 4 s，超声 10 min)进行破碎，破碎后液体在 9 000 r/min 转速下离心 5 min，将上清液与沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳检测。

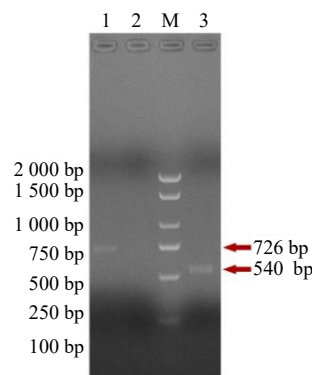
3 结果与分析

3.1 CtFDs 的克隆与序列分析

以红花 cDNA 为模板，利用特异性引物进行 PCR 扩增，结果如图 1 所示，得到 1 条清晰条带。测序结果表明克隆产物基因序列与基因组数据库中完全一致，表明成功克隆出 *CtFD1* 与 *CtFD2* 这 2 条基因，分别为 726 bp 和 540 bp。通过 SMART 在线网站对蛋白质结构域分析显示这 2 个蛋白均具有 bZIP 家族保守结构域(图 2)。

3.2 多重序列比对及系统进化树构建

通过 NCBI 数据库查找其他物质中的 FD 序列，利用 MEGA-X 软件构建 FD 进化树分析，结果如图 3 所示，*CtFD1* 与黄花蒿的 PWA57672.1 进化关系较近，*CtFD2* 与黄花蒿的 AVO00708.1 和 PWA62639.1 进化关系较近，且这 2 个基因与小麦 *Triticum aestivum* 的 XP 044443957.1 和 XP 0444-22276.1 进化关系较远。利用 DNAMAN 软件对



M-Marker; 1、2-*CtFD1* 基因扩增产物; 3-*CtFD2* 基因扩增产物。
 M-Marker; 1, 2-*CtFD1* amplification products; 3-*CtFD2* amplification product.

图 1 PCR 扩增 *CtFDs* 基因的凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretic gel diagram of PCR amplification of *CtFDs* gene

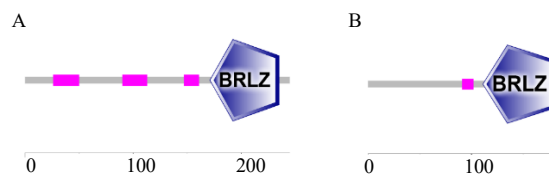


图 2 *CtFD1* (A) 与 *CtFD2* (B) 蛋白结构域

Fig. 2 *CtFD1* (A) and *CtFD2* (B) protein domain

包含 *CtFD1* 与 *CtFD2* 在内的 11 个氨基酸序列进行同源性比对分析，结果如图 4 所示，*CtFD1* 与 *CtFD2* 与其他 FD 氨基酸序列具有较高的一致性，其中与黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的一致性最高。

3.3 CtFDs 蛋白理化性质分析

通过 ExPASy-ProtParam 在线软件分析 *CtFDs* 蛋白的理化性质，结果表明 *CtFD1* 和 *CtFD2* 蛋白的理论相对分子质量分别为 26 640 和 19 690，理论等电点 (pI) 为 9.44 和 10.20；不稳定指数为 56.10 和 75.52，均为不稳定蛋白；亲水性平均值 (GRAVY) 为 -0.830 和 -0.592，属于亲水性蛋白质。对 *CtFDs* 进行亚细胞定位预测，结果显示 *CtFD1* 与 *CtFD2* 均定位在细胞核。

3.4 CtFDs 蛋白的二级、三级结构预测

对 *CtFDs* 蛋白的二级结构预测分析表明(图 5)，*CtFD1* 蛋白由 35.10%的 α -螺旋、64.08%的无规则卷曲和 0.82%的延伸链构成；*CtFD2* 蛋白由 33.33%的 α -螺旋、66.67%的无规则卷曲构成。使用 SWISS-MODEL 在线平台，预测 *CtFD1* 与 *CtFD2* 蛋

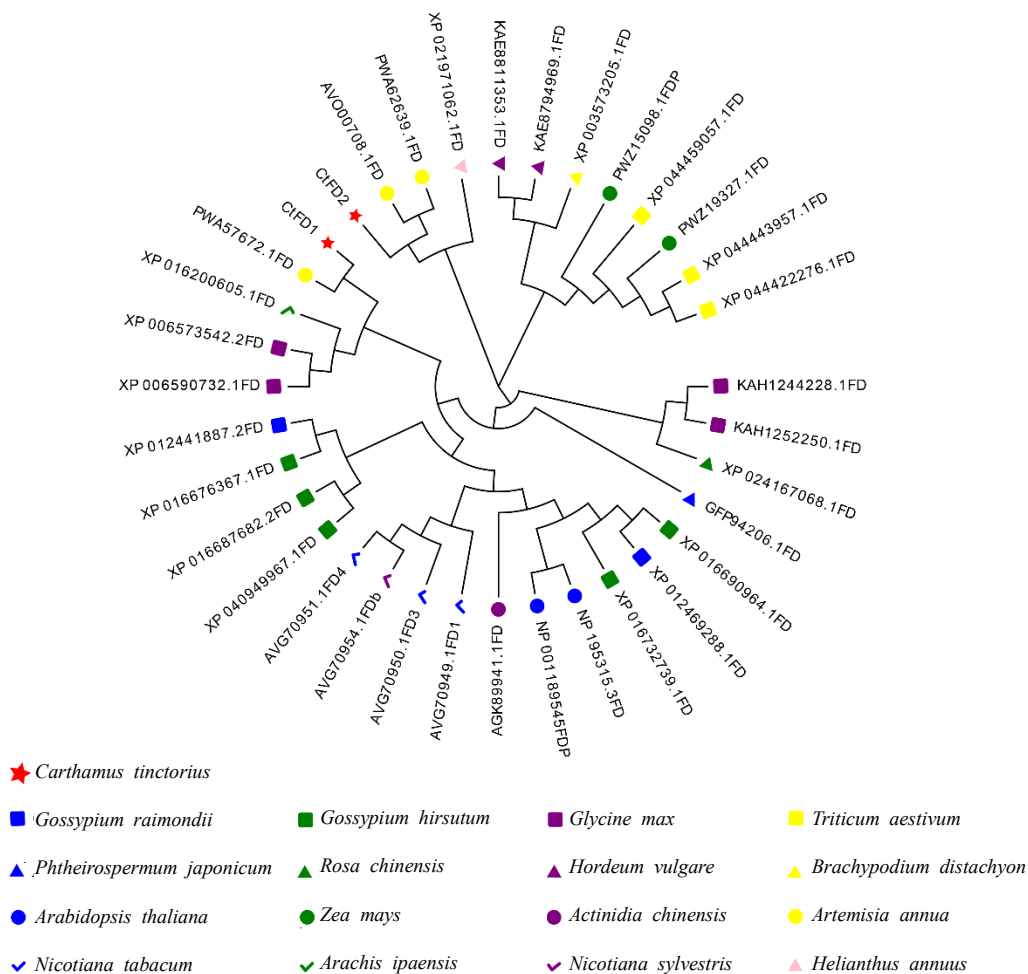


图 3 CtFDs 与其他物种同源蛋白系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of CtFDs and homologous proteins of other species

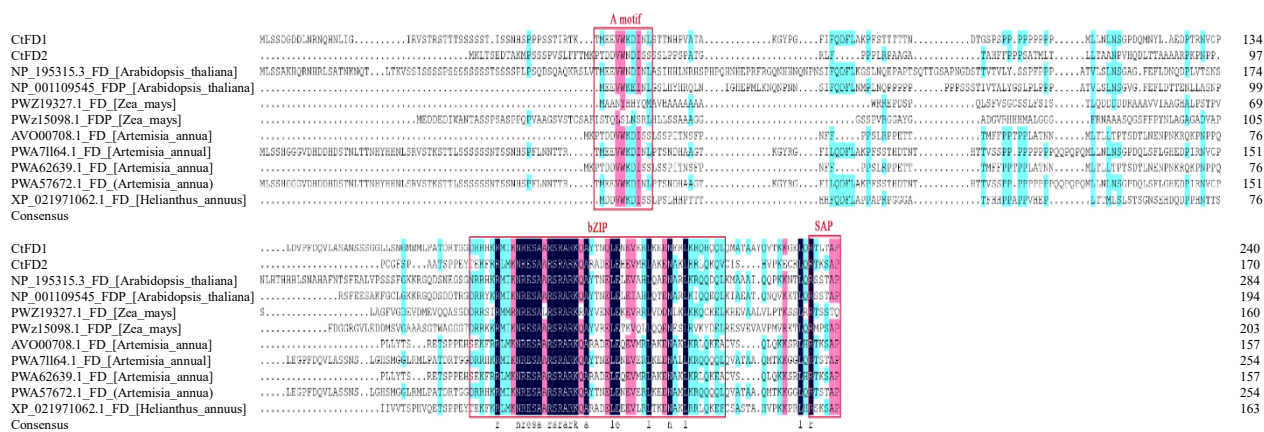


图 4 CtFDs 氨基酸同源序列比对

Fig. 4 Amino acid homologous sequence alignment of CtFDs

白的三级结构 (图 6), 其中, CtFD1 以 A0A2U1NCD2.1.A 为模板, 序列一致性为 74.15;

CtFD2 以 A0A251T709.1.A 为模板, 序列一致性为 71.90%。

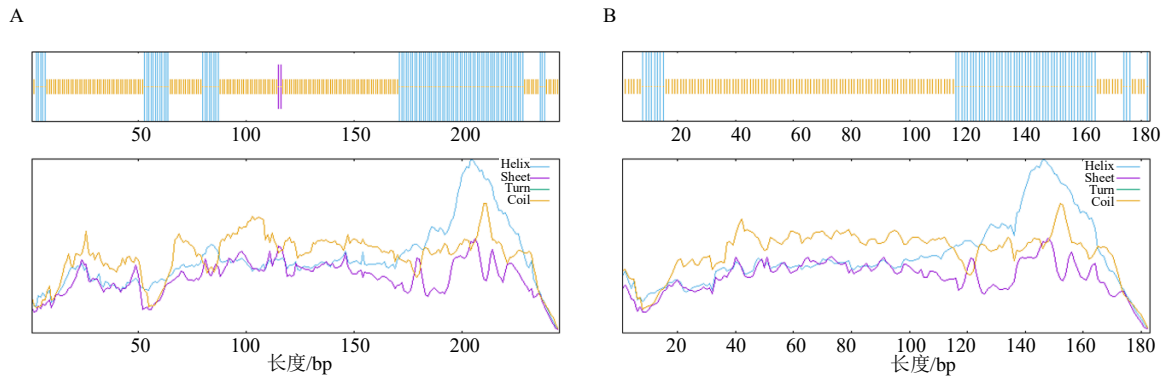


图5 CtFD1 (A) 与 CtFD2 (B) 蛋白二级结构

Fig. 5 Secondary structures of CtFD1 (A) and CtFD2 (B) proteins

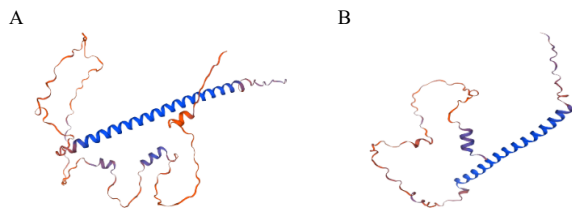
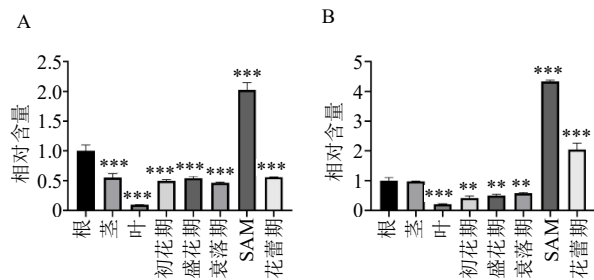


图6 CtFD1 (A) 与 CtFD2 (B) 蛋白三级结构

Fig. 6 Tertiary structures of CtFD1 (A) and CtFD2 (B) proteins

3.5 CtFDs 组织特异性表达分析

为了探究 CtFDs 在红花中的功能,本研究采取红花的根、茎、叶、SAM、花蕾期、初花期、盛花期和衰落期花瓣这8个组织样品并进行qRT-PCR分析。结果如图7所示, CtFD1 与 CtFD2 在 SAM 期表达量最高。研究表明, FT 基因由叶片产生,运输到茎尖后在 14-3-3 蛋白的帮助下与在茎尖形成的 FD 形成成花激活复合物从而调控开花。红花 CtFD1 与 CtFD2 在 SAM 期表达最高,与文献报道相符。



与根比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs root.

图7 CtFD1 (A) 与 CtFD2 (B) 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of CtFD1 (A) and CtFD2 (B) genes in different tissues

这表明,在红花中 FD 也可能在 14-3-3 蛋白的帮助下与 FT 相互作用形成成花激活复合物从而调控红花开花,为后续探究红花开花的分子机制提供帮助。

3.6 CtFDs 亚细胞定位分析

为分析 CtFD1 和 CtFD2 蛋白在细胞内的具体存在位置,对 CtFD1 和 CtFD2 进行亚细胞定位研究。通过将含有 pCAMBIA1300-CtFD1 和 pCAMBIA1300-CtFD2 的重悬液注射烟草叶片,发现 CtFD1-GFP 与 CtFD2-GFP 融合蛋白的荧光信号定位于细胞核(图8),与生物信息学预测结果一致。该结果表明 CtFD1 与 CtFD2 作为转录因子可能直接调控开花相关基因从而调控植物开花的假说,为后续功能验证提供重要依据。

3.7 CtFDs 原核表达分析

将构建成功的 pET-32a-CtFD1 与 pET-32a-CtFD2 重组载体转化至 Rosetta2 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞中。将含有重组载体的菌液培养至 $OD_{600} = 0.4$, 向其中加入不同浓度的 IPTG 进行诱导,结果如图9-A、B所示,在不同 IPTG 诱导下2个蛋白均在正确位置出现条带,其中 CtFD1 为 46 100, CtFD2 为 39 100。当 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 时 CtFD1 与 CtFD2 在上清中表达量较高,因此选择该 IPTG 浓度进行后续实验。同时,为了使 CtFD1 与 CtFD2 为在上清中表达,本研究在 16、28、37 °C 的条件下对其进行诱导,结果如图9-C、D所示,这2个蛋白在 37 °C 下表达量最高,但上清中未见明显条带。而在 16 °C 条件下诱导时,虽然表达量较低,但上清液中可见清晰条带,因此后续表达准选用该温度进行诱导。

4 讨论

本研究从红花中成功克隆了2个 FD 同源基因

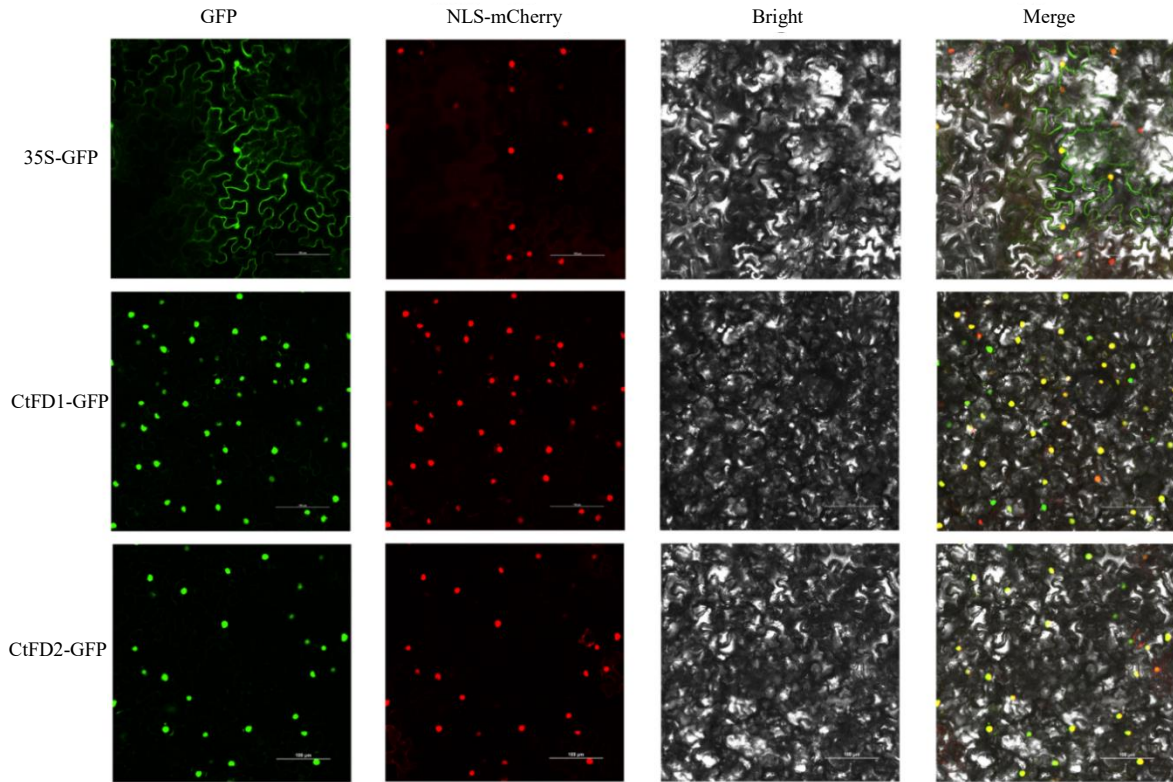
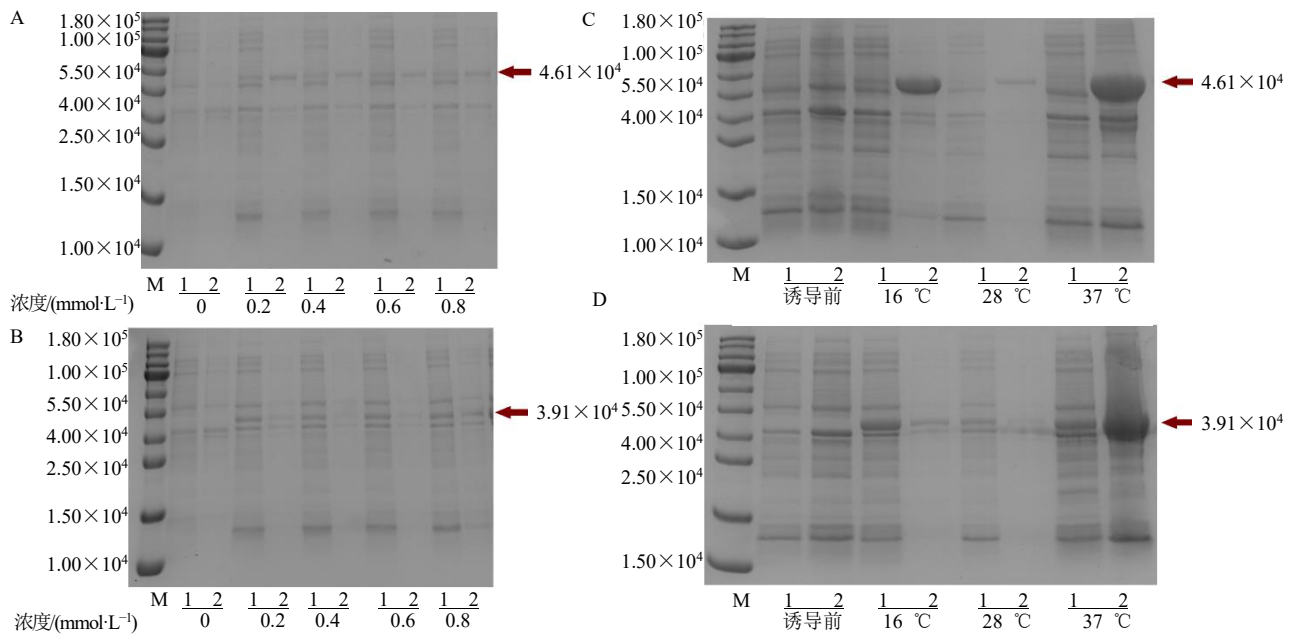


图 8 CtFD1 和 CtFD2 蛋白的亚细胞定位
Fig. 8 Subcellular localization of CtFD1 and CtFD2 proteins



A、B-不同 IPTG 浓度诱导下的 CtFD1 与 CtFD2；C、D-不同温度诱导下的 CtFD1 与 CtFD2；1-上清液；2-沉淀。
A, B-CtFD1 and CtFD2 induced by different IPTG concentrations; C, D-CtFD1 and CtFD2 induced by different temperatures; 1-supernatant; 2-precipitate.

图 9 CtFD1 和 CtFD2 蛋白的原核表达分析
Fig. 9 Prokaryotic expression analysis of CtFD1 and CtFD2 proteins

CtFD1 与 *CtFD2*，并对其进行了生物信息学分析、表达模式解析及原核表达优化。研究结果为进一步揭示红花 FD 基因在开花调控网络中的功能奠定了重要基础。

生物信息学分析表明，*CtFD1* 与 *CtFD2* 均含有典型的 bZIP 结构域，定位于细胞核，符合转录因子的典型特征。bZIP 转录因子家族在植物成花转变过程中发挥关键作用，尤其是 FD 蛋白通过与 FT 蛋白互作形成成花激活复合体，激活下游花分生组织决定基因的表达。系统进化分析显示，*CtFD1* 和 *CtFD2* 与黄花蒿 FD 亲缘关系最近，这与红花与黄花蒿同属菊科的分类相一致，暗示 FD 基因在菊科植物中可能具有较为保守的进化路径。多重序列比对进一步证实，*CtFD1* 与 *CtFD2* 在 bZIP 结构域区域与其他物种 FD 高度保守，尤其是参与 DNA 结合和二聚化形成的关键氨基酸残基位点，提示这两个基因可能保留了典型 FD 转录因子的功能特性。

组织特异性表达分析是解析基因功能的重要切入点。qRT-PCR 结果显示，*CtFD1* 与 *CtFD2* 均在 SAM 中呈现最高表达水平，而在其他组织如根、茎、叶及不同花期中表达相对较低。这一表达模式与 FD 基因作为成花激活复合体在茎尖发挥功能的经典机制高度吻合——在模式植物拟南芥中，FD 基因主要在 SAM 表达，与由叶片运输而来的 FT 蛋白相互作用形成成花激活复合体来诱导花芽分化^[17]。因此，红花 *CtFD1* 与 *CtFD2* 在 SAM 中的特异性高表达暗示其可能参与了红花成花转变的关键调控节点^[18]。值得注意的是，*CtFD1* 与 *CtFD2* 在花蕾期及初花期花瓣中也有一定程度的表达，尽管表达水平远低于 SAM，但提示这 2 个基因可能不仅在成花启动阶段发挥作用，还可能参与花器官发育或花瓣中次生代谢产物的合成调控。已有研究表明，红花 FT 同源基因 (*CtFTs*) 不仅参与开花时间调控，还与类黄酮生物合成存在分子偶联，FD 作为 FT 的互作伙伴，是否也参与了这一过程，值得进一步探究。

亚细胞定位实验证实 *CtFD1* 和 *CtFD2* 蛋白定位于细胞核，与生物信息学预测一致，也为它们作为转录因子调控下游靶基因提供了空间基础。在植物细胞中，FD 蛋白需入核后才能与 FT 形成功能复合体，激活花分生组织特征基因如 AP1 的转录。本研究的结果支持红花 *CtFD1* 与 *CtFD2* 具备行使这一核内调控功能的结构基础。

原核表达系统的成功构建及诱导条件的优化为后续蛋白功能研究及互作机制解析奠定了基础。研究发现，*CtFD1* 与 *CtFD2* 在 16 °C 及 0.2 mmol/L IPTG 诱导条件下可在上清中获得可溶性表达，而在 37 °C 诱导下虽总表达量较高但主要以包涵体形式存在。这一结果提示，红花 FD 蛋白在大肠杆菌系统中表达时对诱导条件较为敏感，低温慢诱导有利于蛋白正确折叠和保持可溶性。可溶性蛋白的获得为后续体外蛋白互作研究（如 GST pull-down、EMSA）提供了重要材料，也为深入解析 *CtFDs* 与 *CtFTs* 之间的互作机制提供了基础。

尽管本研究初步揭示了 *CtFD1* 与 *CtFD2* 的序列特征、表达模式及蛋白定位，但对其在红花开花调控中的确切功能仍缺乏直接的功能验证证据。后续研究可通过转基因技术（如拟南芥异源过表达或病毒诱导基因沉默）验证这 2 个基因在成花转变中的具体作用；同时，利用酵母双杂交、双分子荧光互补 (BiFC) 等技术验证 *CtFD* 与 *CtFT* 蛋白的互作关系，进一步阐明成花激活复合体在红花中的组装机制。此外，鉴于红花花瓣中 HSYA 等类黄酮化合物的重要经济价值，探究 *CtFD* 是否通过调控开花过程间接影响次生代谢产物的积累，或直接参与相关合成基因的转录调控，将是连接开花调控与品质形成研究的重要方向。

综上所述，本研究从红花中克隆并初步鉴定了 2 个 FD 家族基因，证实其在茎尖分生组织特异性表达、编码核定位转录因子，并成功建立了可溶性原核表达体系，为后续深入解析红花 FD 基因的功能及开花调控机制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] González-Suárez P, Walker C H, Bennett T. Bloom and bust: Understanding the nature and regulation of the end of flowering [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2020, 57: 24-30.
- [2] Cai K F, Zhu S T, Jiang Z Y, et al. Biological macromolecules mediated by environmental signals affect flowering regulation in plants: A comprehensive review [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 214: 108931.
- [3] Niu F F, Rehmani M S, Yan J L. Multilayered regulation and implication of flowering time in plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 213: 108842.
- [4] Romera-Branchat M, Pocard C, Vincent C, et al. FD and FDP bZIP transcription factors and FT florigen regulate floral development and control homeotic gene expression

- in *Arabidopsis* floral meristems [J]. *Development*, 2025, 152(10): dev204241.
- [5] Ye L X, Wu Y M, Zhang J X, *et al.* A bZIP transcription factor (CiFD) regulates drought- and low-temperature-induced flowering by alternative splicing in *Citrus* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65(3): 674-691.
- [6] Cheng X F, Li G F, Krom N, *et al.* Genetic regulation of flowering time and inflorescence architecture by MtFDa and MtFTa₁ in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2021, 185(1): 161-178.
- [7] Romera-Branchat M, Severing E, Pocard C, *et al.* Functional divergence of the *Arabidopsis* florigen-interacting bZIP transcription factors FD and FDP [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(9): 107717.
- [8] Kaneko-Suzuki M, Kurihara-Ishikawa R, Okushita-Terakawa C, *et al.* TFL1-like proteins in rice antagonize rice FT-like protein in inflorescence development by competition for complex formation with 14-3-3 and FD [J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(3): 458-468.
- [9] Liu H, Huang X Z, Ma B, *et al.* Components and functional diversification of florigen activation complexes in cotton [J]. *Plant Cell Physiol*, 2021, 62(10): 1542-1555.
- [10] Bacchetti T, Morresi C, Bellachioma L, *et al.* Antioxidant and pro-oxidant properties of *Carthamus tinctorius*, hydroxy safflor yellow A, and safflor yellow A [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(2): 119.
- [11] 钱艺蕾, 李冲, 王钰, 等. 西红花及其活性成分治疗肺系疾病的研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(9): 3354-3365.
- [12] Kong J, Sun S M, Min F, *et al.* Integrating network pharmacology and transcriptomic strategies to explore the pharmacological mechanism of hydroxysafflor yellow A in delaying liver aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14281.
- [13] Kuai J B, Zheng J C, Kumar A, *et al.* Anti-inflammatory, antiosteoporotic, and bone protective effect of hydroxysafflor yellow A against glucocorticoid-induced osteoporosis in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38(9): e23797.
- [14] Bai X, Wang W X, Fu R J, *et al.* Therapeutic potential of hydroxysafflor yellow A on cardio-cerebrovascular diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 01265.
- [15] Yu L L, Ahmad N, Meng W J, *et al.* Integrated metabolomics and transcriptomics provide key molecular insights into floral stage-driven flavonoid pathway in safflower [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(22): 11903.
- [16] Li Z L, Yu L L, Umar A W, *et al.* Safflower *CtFT* genes orchestrating flowering time and flavonoid biosynthesis [J]. *BMC Plant Biol*, 2024, 24(1): 1232.
- [17] Murata Y, Nagata K, Abe M. Cell-to-cell translocation of florigen is inhibited by low ambient temperature through abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, 122(28): e2507987122.
- [18] Li Z M, Gao F R, Liu Y J, *et al.* ZmGI2 regulates flowering time through multiple flower development pathways in maize [J]. *Plant Sci*, 2023, 332: 111701.

[责任编辑 时圣明]