

引用格式: 方博士, 汤宇杰, 夏轩泽, 等. 桂花组织原位杂交体系的构建及在不同组织中的通用性[J]. 浙江农林大学学报, 2026, 43(5): 945–953. FANG Boshi, TANG Yujie, XIA Xuanze, *et al.* Construction of the in situ hybridization system for *Osmanthus fragrans* and its universality in different tissues[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2026, 43(5): 945–953.

桂花组织原位杂交体系的构建及在不同组织中的通用性

方博士^{1,2}, 汤宇杰³, 夏轩泽^{1,2}, 刘雪宁^{1,2}, 赵宏波^{1,2}

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质资源与利用重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 长兴县永绿林业发展中心, 浙江 长兴 313100)

摘要: 【目的】原位杂交技术广泛应用于基因时空表达模式及功能研究。本研究以不同品种不同组织不同发育阶段的桂花 *Osmanthus fragrans* 为材料, 建立高效且稳定的桂花原位杂交体系, 为桂花功能基因时空表达定位提供技术方法。【方法】以桂花生长素响应因子 *OfIAA14* 为检测基因, 在常规原位杂交流程基础上, 对样品抽真空时间、蛋白酶 K 消化时间、是否进行预杂交、杂交温度和杂交时间等关键参数进行比较, 同时在不同品种、不同组织及其不同发育阶段等方面进行相关基因的功能验证。【结果】在抽真空 30 min、0.08 MPa (2 次)、蛋白酶 K 消化 20~25 min、无需预杂交、杂交温度 50 ℃、杂交时间 20 h 的条件下, 可获得最佳杂交信号。进一步选用 *OfPIF4*、*OfPIF5*、*OfUFO*、*OfYAB2* 和 *OfAUX5* 等基因, 对原位杂交优化体系在桂花不同品种、不同组织及不同发育阶段中的适用性进行验证, 均获得良好的组织结构保持和清晰稳定的信号表达, 表明该方法具有较好的可靠性和一定的通用性。【结论】本研究建立了一套适用于桂花组织的原位杂交优化技术体系, 可为深入解析桂花开花发育相关基因的时空表达特征及分子调控机制提供可靠的技术支撑。图 9 表 1 参 25

关键词: 桂花; 原位杂交; 条件优化; 基因表达

中图分类号: S603 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2026)05-0945-09

Construction of the in situ hybridization system for *Osmanthus fragrans* and its universality in different tissues

FANG Boshi^{1,2}, TANG Yujie³, XIA Xuanze^{1,2}, LIU Xuening^{1,2}, ZHAO Hongbo^{1,2}

(1. College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Changxing County Yonglü Forestry Development Center, Changxing 313100, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] In situ hybridization (ISH) technology is widely used for studying the spatiotemporal expression patterns and functions in different tissues. This study utilizes materials from different cultivars, tissues, and developmental stages of *Osmanthus fragrans* to establish an efficient and stable in situ hybridization system for this flower species, providing a technical method for the spatiotemporal expression localization of functional genes in *O. fragrans*. [Method] Using the auxin response factor *OfIAA14* as the detection gene, based on the conventional ISH process, key parameters such as sample vacuumization time, protease K digestion time, whether to perform pre-hybridization, and hybridization temperature and time were systematically optimized and compared. Meanwhile, the functional verification of related genes was conducted

收稿日期: 2026-01-31; 修回日期: 2026-03-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32472782); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02071); 浙江省科技创新领军人才项目 (2022R52026)

作者简介: 方博士 (ORCID: 0009-0009-9819-5857), 从事桂花育种研究。E-mail: 2023105051025@stu.zafu.edu.cn。通信作者: 赵宏波 (ORCID: 0000-0003-4714-8240), 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

across different varieties, tissues, and developmental stages. [Result] The results showed that the optimal hybridization signal could be obtained under the conditions of vacuumization for 30 min at 0.08 MPa (2 times), proteinase K digestion for 20–25 min, no pre-hybridization, hybridization temperature at 50 °C, and hybridization time of 20 h. Furthermore, genes such as *OfPIF4*, *OfPIF5*, *OfUFO*, *OfYAB2* and *OfAUX5* were selected to verify the applicability of the optimized system in different *O. fragrans* cultivars, tissues and developmental stages. Good tissue structure preservation and clear and stable signal expression were obtained, indicating that the method has good reliability and certain universality. [Conclusion] This study established an optimized ISH technology system suitable for *O. fragrans* tissues, providing reliable technical support for in-depth analysis of the spatiotemporal expression characteristics and molecular regulation mechanisms of genes related to flower development in *O. fragrans*. [Ch, 9 fig. 1 tab. 25 ref.]

Key words: *Osmanthus fragrans*; in situ hybridization; condition optimization; gene expression

桂花 *Osmanthus fragrans* 是中国十大传统名花之一, 因独特芳香和优美树型而广受喜爱, 在园林绿化和食品添加等领域中应用广泛^[1-3]。近年来, 在桂花成花^[4]、花开放^[5]、花香释放^[6]、花色呈现^[7]等方面的分子机制研究已取得了一定进展, 但未见稳定的组织原位杂交 (ISH) 技术体系的成熟应用。原位杂交技术对于准确解析基因的空间表达位置及其在发育过程中的功能具有重要作用。

原位杂交技术通过标记的探针与靶序列之间的特异性核酸杂配对, 实现对组织中目标核酸精确定位, 从而在细胞甚至亚细胞水平下揭示基因的时空表达特征。原位杂交具有定位精度高、空间分辨率强等优点, 已被广泛应用于植物营养器官^[8-9]和生殖器官的发育^[10-11]、自交不亲和性^[12]、胚胎发生^[13]及种子和果实发育^[14-15]等研究领域, 在基因功能解析中发挥着重要的作用, 至今仍是基因表达定位分析的理想技术手段之一^[16-18]。目前, 原位杂交技术已在多种植物中成功应用, 如欧洲葡萄 *Vitis vinifera*^[19]、番茄 *Solanum lycopersicum*^[20]、毛果杨 *Populus trichocarpa*^[21]、黄瓜 *Cucumis sativus*^[22]等。为明确不同桂花品种花芽发育过程中的表达特征, 本研究对原位杂交流程进行了系统优化, 以建立适用于桂花组织稳定检测方法, 并以 *OfPIF4*、*OfPIF5*、*OfUFO*、*OfYAB2* 和 *OfAUX5* 基因为例, 对优化后的技术体系在不同桂花品种中进行验证, 以评估其可靠性和适用性, 为后续开展桂花特异性表达基因的空间定位及功能研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

选用桂花品种‘堰虹桂’‘Yanhonggui’和‘四季桂’‘Sijigui’不同发育时期的花芽和叶芽, 栽培于浙江农林大学平山基地种质资源圃。所使用的全部仪器设备用过氧化氢进行酶灭活处理, 离心管和枪头等耗材均需无核糖核酸酶 (RNase) 和脱氧核糖核酸酶 (DNase) 污染, 避免 RNA 降解。实验用水为经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理并高温高压灭菌的无 RNase 水。

1.2 方法

1.2.1 探针制备 ①设计探针。为保证检测基因的特异性, 选取 mRNA 的特异性区域, 长度为 200~500 bp。在正向引物 5'端添加 SP6 的核心序列 (GATTTAGGTGACACTATAGaattGCT), 在反向引物的 5'端添加 T7 的核心序列 (tgTAATACGACTCACTATAGGG)。分别以‘堰虹桂’和‘四季桂’花芽的 cDNA 为模板, 利用 PCR 仪进行扩增, 表 1 为扩增所用序列。②转录。取 2 μg DNA 加入 200 μL PCR 管中, 然后依次加入 10×转录缓冲液 (transcription buffer), 10×NTP labeling mix, RNase 抑制剂 (RNase inhibitor), RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 和适量的无 RNase 水, 使得总体积为 20 μL, 吸打混匀后放于 PCR 仪中 37 °C 2 h 进行转录。③探针纯化。取 20 μL 的转录产物, PCR 管中加入 75 μL 双蒸水 (ddH₂O), 100 g·L⁻¹tRNA (1 μL), RNase-free DNase (1 μL) 放于 PCR 仪中 37 °C 温浴 10 min。加入等体积 4 mol·L⁻¹ 乙酸铵 (97 μL), 2 倍体积乙醇 (194 μL), 于 -20 °C 冰箱放置 30 min, 4 °C 14 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入 600 μL 70% (体积分数) 乙醇清洗。4 °C 离心后留沉淀吹干。④水解、中和。

表 1 扩增引物序列

Table 1 Amplification primer sequence

基因	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
<i>OflAA14</i>	ATGGAAGTTGGCCAGAA	AATGCGGCCTTCTCAG
<i>OflPIF4</i>	CTCCTTCTCCTCTCCGACA	AGCATCAGAACTCGGGAC
<i>OflPIF5</i>	CCAATTCTGGTTGGAGTATTGAG	TTGATCCTGTCCCTCCGTT
<i>OflUFO</i>	AGTTCAGAAAGTCATCGGAA	TCTCCCCTACAAAATGTCGAA
<i>OflYAB2</i>	CAATCGTGCAAAATAAGACACT	TTCACACTTTACTCCGACCAG
<i>OflAUX5</i>	ATGGAATCCTCGGACAAGGTT	TGCCCAATAATCCATAGAA

在沉淀中加入 100 μL 的无 RNase 水和 100 μL 2 $\times$ 碳酸盐缓冲液, 置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中进行水解反应。加入 10 μL 10% (体积分数) 冰乙酸, 0.1 倍体积的 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠 (pH 5.2), 2 倍体积的无水乙醇于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置至少 3 h 或者过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入 600 μL 70% (体积分数) 乙醇清洗 2 次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后留沉淀风干。最后在沉淀中加入 20 μL 的无 RNase 水混匀后测浓度, 然后再加入 20 μL 甲酰胺于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.2 采集样品及石蜡切片处理 ①取材与固定。取不同时期的花芽样品, 置于预冷的甲醛-乙酸-乙醇 (FAA) 固定液中。为筛选固定液充分渗入样品组织的最佳条件, 设置 2 种真空抽气时间处理, 分别为抽真空 30 min (1 次) 和 30 min (2 次), 真空压强为 0.08 MPa。抽真空结束缓慢放气后, 更换新鲜 FAA 固定液, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上振荡固定过夜。②脱水。将固定后的样品按乙醇梯度进行脱水处理, 每个梯度处理 90 min。脱水梯度 (体积分数) 依次为: 50%、70%、85%、95%、100%; 随后更换新鲜 100% 乙醇, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下置于摇床中振荡脱水过夜。③透明。在室温条件下将样品置于摇床中处理, 依次更换新鲜 100% 乙醇 2 h, 随后转入乙醇与二甲苯体积比为 1:1 的混合液中处理 1 h, 再置于 100% 二甲苯中透明处理 3 次 (每次 1 h)。透明结束后, 更换新鲜 100% 二甲苯, 并加入约 1/4 体积的固体石蜡, 在室温条件下静置渗蜡过夜。④浸蜡。将样品在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中渗蜡过夜。随后连续处理 4~7 d 更换新鲜纯液体石蜡, 每日更换 2 次 (早晚各 1 次), 以保证石蜡充分渗入组织。⑤包埋与切片。将熔融的液体石蜡倒入包埋模具内, 待石蜡完全凝固后, 将石蜡块置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。用切片机 (Leica) 切取厚度为 10 μm , 同时需在显微镜 (ZEISS) 下观察组织结构完整性。切片置于无 RNase 水中展平后贴附于载玻片上, 吸去多余水分, 并于 42 $^{\circ}\text{C}$ 烤片机中烘烤过夜备用。

1.2.3 预杂交与杂交 ①脱蜡复水。将玻片依次置于二甲苯中脱蜡 2 次 (每次 10 min), 随后经乙醇梯度 (体积分数) 复水处理: 100% 乙醇 1 min, 95% 乙醇 30 s, 85% 乙醇 30 s, 70% 乙醇 30 s, 50% 乙醇 30 s, 30% 乙醇 30 s, 随后置于质量分数为 0.85% 氯化钠溶液中 2 min, 最后转入磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中平衡 2 min。②蛋白酶 K 溶液消化。将玻片置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用蛋白酶 K 溶液处理, 以消化组织内部蛋白质并提高探针对细胞 RNA 的可及性。为优化消化条件, 分别设置 10、15、20、25 和 30 min 不同消化时间梯度。消化结束后, 立即用体积分数为 0.2% 的甘氨酸 PBS 溶液处理 2 min 以中和蛋白酶活性并终止反应, 随后用 PBS 清洗 2 min。③交联。体积分数为 4% 的甲醛 PBS 溶液, 10 min, 在摇床上进行。随后 PBS 清洗, 2 min。④乙酸酐封闭。置于乙酸酐溶液 (pH 8), 在摇床上振荡 10 min, 随后用 PBS 清洗 2 min。⑤脱水。玻片依次置于质量分数为 0.85% 的氯化钠溶液中处理 2 min, 随后经乙醇梯度 (体积分数) 再次脱水: 30%、50%、70%、85%、95%, 各处理 30 s; 随后置于 100% 乙醇中处理 2 次 (每次 1 min)。脱水完成后, 待乙醇完全挥发后即可进行后续杂交实验。⑥预杂交。设置预杂交与不预杂交处理进行对比, 每张玻片用量为 150 μL 的杂交液 (无探针)。将杂交液涂布于玻片上, 密封在保湿盒中, 放入烘箱孵育 1.5 h。⑦杂交。将探针稀释后, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中变性 2 min。每张载玻片加入约 150 μL 含探针的杂交液, 探针与杂交液体积比为 1:4。将混合后的探针杂交液均匀滴加于载玻片上, 分别在 50 和 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行杂交, 杂交时间分别设置为 15 和 20 h。

1.2.4 显色 ①洗涤去杂交液。取出杂交后的玻片。在 55 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.2 $\times$ SSC 溶液中洗去残留杂交液: 0.2 $\times$ SSC, 2 次, 每次 1 h; 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 $\times$ NTE, 2 次, 每次 5 min。②RNase 处理。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase A 的 NTE 中处理 30 min, 以去除非特异性 RNA。随后再次置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 $\times$ NTE 洗涤 2 次, 每次 5 min。随

后在 55 ℃ 0.2×SSC 中洗涤 1 h。③封闭与抗体孵育。在 TBS 中平衡玻片 5 min, 随后在罗氏封闭液中于摇床上封闭 45 min, 再于 TBST 溶液中摇床处理 45 min。将含 1:1 250 稀释抗体的 TBST 溶液涂于玻片上, 在避光、湿润条件下室温孵育 2 h。随后用 TBST 洗涤玻片 4 次, 每次 15 min。④显色。玻片平衡于 Buffer C 缓冲液中 5 min, 随后用 NBT/BCIP 显色液覆盖组织, 避光显色 1~3 d。

1.2.5 镜检 当显色达到预期效果后, 进行乙醇梯度 (体积分数) 脱水以去除浮色: 10% 乙醇 10 s, 30% 乙醇 10 s, 50% 乙醇 10 s, 70% 乙醇 5 s, 80% 乙醇 5 s, 95% 乙醇 5 s, 100% 乙醇 5 s, 最后置于二甲苯中 2 min。脱水后用中性树脂封片以终止显色反应, 切片在显微镜 (Olympus) 下观察并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 不同抽真空时间对切片完整度的影响

2 种抽真空时间优化表明: 采用单次抽真空处理的样品, 由于固定液未能充分渗透至组织内部, 导致后续浸蜡不完全, 切片过程中样品出现明显断裂和破损, 切片质量较差 (图 1A)。相比之下, 2 次抽真空处理的样品, 固定液能够充分渗透至组织内部, 浸蜡过程更加充分, 切片时组织结构完整, 内部结构清晰可见, 样品整体完整性明显提高 (图 1B), 从而有效提升了制片质量和效率。

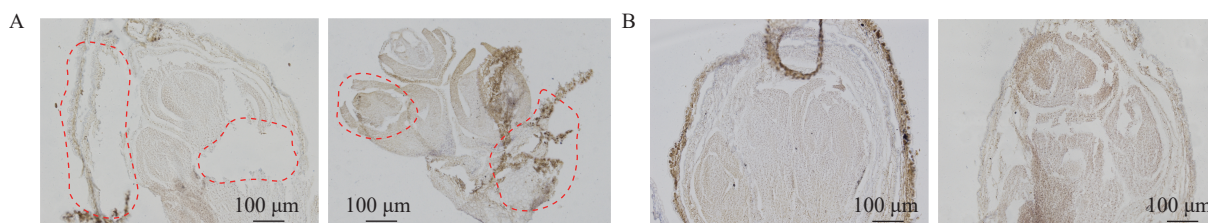


图 1 不同抽真空时间花芽切片
Figure 1 Flower bud sections with different vacuumization times

2.2 基因筛选及克隆

在转录组数据中筛选获得候选基因, 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库进行蛋白序列比对及系统进化分析。结果表明: 该基因与拟南芥同源基因 *AtIAA14* 聚为一支, 具有较高的序列保守性, 表示该基因在功能上可能具有一定的保守性, 因此命名为 *OfIAA14* (图 2A)。进一步对多个物种 IAA14 蛋白的氨基酸序列进行比对分析, 结果显示: *OfIAA14* 蛋白包含典型的保守结构域 Domain I、Domain II、Domain III 和 Domain IV (图 2B)。同时, 利用 AlphaFold 对 *OfIAA14* 蛋白的三维结构进行预测, 并通过 PyMOL 对其结构域进行可视化标注 (图 2C)。最后制备 *OfIAA14* 的原位杂交探针, 采用 PCR 进行扩增和克隆, 获得长度约 500 bp 的特异性片段 (图 2D)。

2.3 不同蛋白酶 K 消化时间对杂交信号的影响

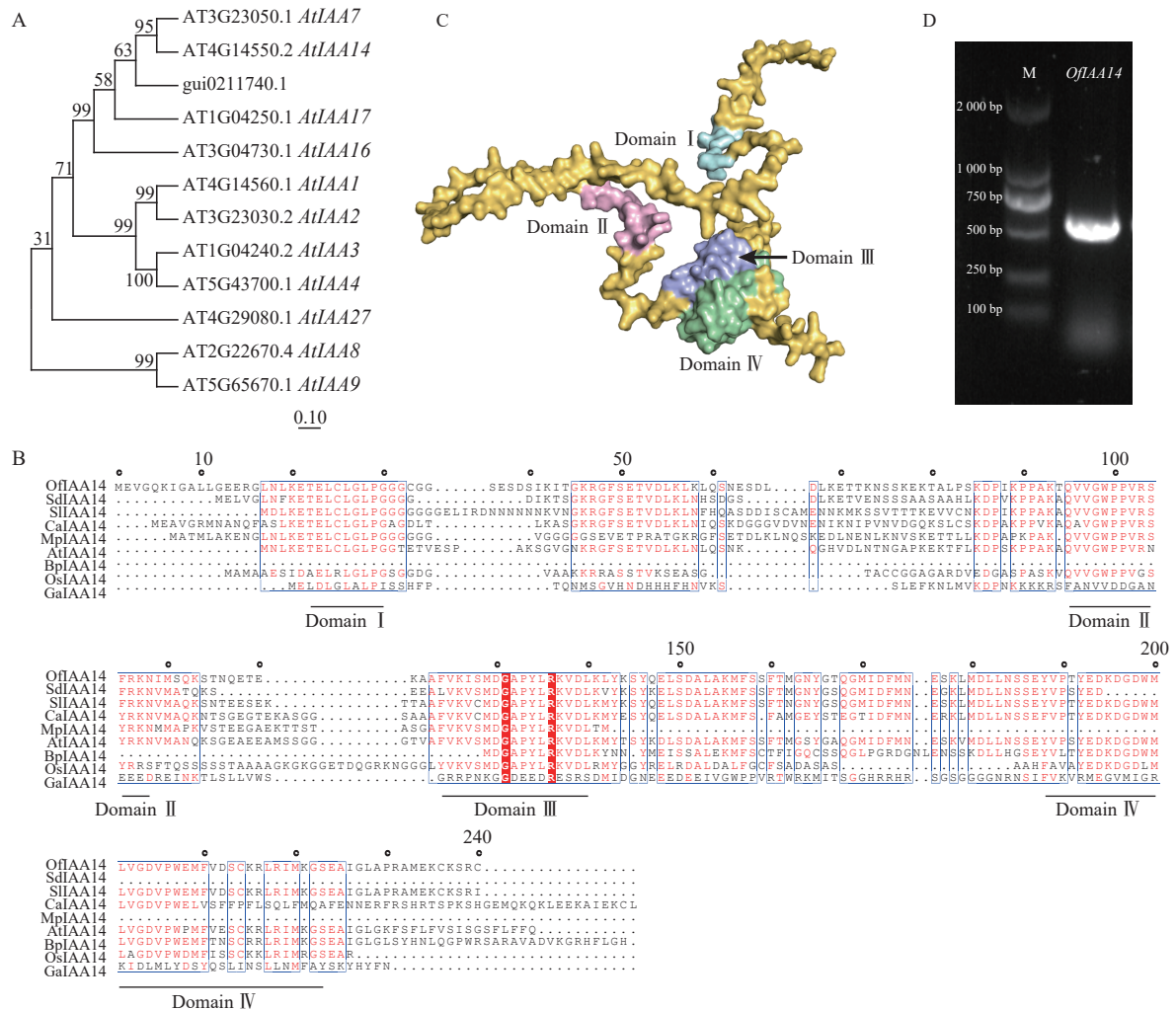
以 *OfIAA14* 为对象基因, 进行花芽切片蛋白酶 K 消化效果比较。结果显示: 消化 10 min 的花芽切片组织结构完整, 但是没有信号显示 (图 3A); 消化 15 min 的切片组织和 10 min 相似, 并且没有观察到明显信号 (图 3B); 消化 20 min 的切片显示组织结构良好, 组织内部结构清晰可见, 可见明显信号 (图 3C); 消化 25 min 的切片与 20 min 相似, 结构完整可见明显信号 (图 3D); 消化 30 min 的切片表面出现明显空白斑块 (图 3E), 提示组织过度消化, 结构组织受到破坏, 即桂花花芽原位杂交的最佳蛋白酶 K 消化时间为 20~25 min。

2.4 预杂交对原位杂交信号的影响

在蛋白酶 K 消化 20 min 的条件下, 设置了预杂交和不预杂交 2 种处理进行对比实验。结果表明: 在桂花组织中, 是否进行预杂交对杂交信号强度和背景水平影响不明显 (图 4A 和图 4B)。因此, 在桂花原位杂交体系中可省略预杂交步骤, 从而简化实验流程并减少杂交液的使用。

2.5 杂交温度及时间对原位杂交信号的影响

在蛋白酶 K 处理 20 min 的基础上, 分别设置 2 种杂交温度 (50 和 55 ℃) 及 2 种杂交时间 (15 和 20 h)



A. *OfIAA14*与拟南芥IAA成员的系统进化树；B. *OfIAA14*与多物种IAA14蛋白氨基酸对比；C. *OfIAA14*蛋白三维结构；D. *OfIAA14*特异性区域克隆片段琼脂糖凝胶电泳图。Sd. 甜高粱 *Sorghum dochna*；Sl. 番茄 *Solanum lycopersicum*；Ca. 辣椒 *Capsicum annuum*；Mp. 地钱 *Marchantia polymorpha*；At. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*；Bp. 白桦 *Betula platyphylla*；Os. 水稻 *Oryza sativa*；Ga. 栽培棉 *Gossypium arboreum*；M. 标准物；Domain I~Domain IV. 保守结构域。

图2 *OfIAA14* 基因筛选、命名及克隆

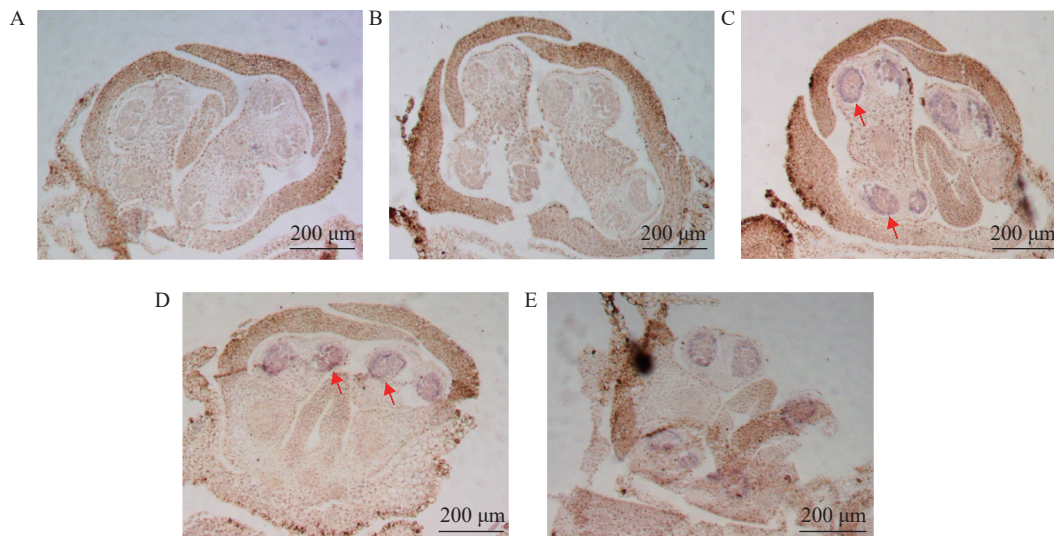
Figure 2 Screening, naming, and cloning of the *OfIAA14* gene

进行比较。结果表明：在 50 ℃ 条件下，杂交信号相对较弱，但背景干扰较低（图 5A）；而在 55 ℃ 条件下，杂交信号明显增强，但背景干扰亦有所增加（图 5B）。杂交时间比较结果显示，与 15 h 相比，20 h 处理获得的杂交信号显著增强（图 6A 和图 6B），而 15 h 条件下信号相对较弱。综合考虑信号强度、背景干扰及实验稳定性，在保证背景可控的前提下，确定 50 ℃、20 h 为桂花原位杂交的适宜温度和时间。

2.6 原位杂交在不同组织中的通用性

2.6.1 原位杂交在‘四季桂’不同发育阶段花芽组织中的应用 为验证优化的原位杂交在不同组织和发育阶段的准确性，从转录组差异表达基因中筛选候选基因 *evm.model.Contig80.43*、*evm.model.Contig168.40*，对叶原基（LP）、花序原基（IM）以及小花原基（FM）的基因测序片段（reads）数进行分析，发现在花序原基时期，2 个基因的 reads 数明显上升（图 7A）。通过系统进化树，最终命名为 *OfPIF4*、*OfPIF5*（图 7B）。利用优化的原位杂交在‘四季桂’花芽不同发育时期对 *OfPIF4*、*OfPIF5* 进行时空特异性检测，结果显示，*OfPIF4* 和 *OfPIF5* 的基因信号在花芽分化期后的花序原基中就可以明显检测到，与转录组数据一致（图 7C 和图 7D），同时更进一步明确该基因在组织上的时空表达。

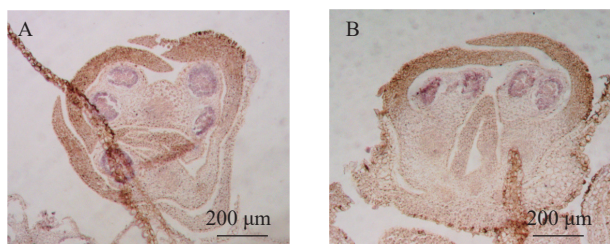
2.6.2 原位杂交在秋桂‘堰虹桂’不同发育阶段花芽组织中的应用 基于转录组数据筛选获得多个与花器官发育相关的候选基因（图 8A），并选取 *OfUFO* 和 *OfYAB2* 作为代表基因进行表达验证。选取桂花品种‘堰虹桂’花芽发育圆珠期和顶壳期的样品^[5]，采用优化的原位杂交检测 *OfUFO* 和 *OfYAB2* 在不同花



A. 10 min; B. 15 min; C. 20 min; D. 25 min; E. 30 min。红色箭头指示基因信号。

图3 不同蛋白酶K消化时间花芽杂交切片

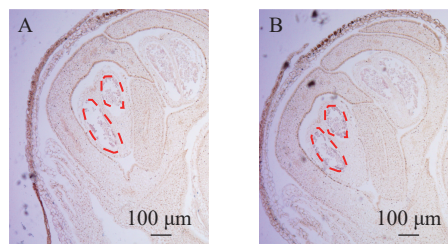
Figure 3 Hybridization sections of flower buds digested with different digestion times of proteinase K



A. 预杂交; B. 不预杂交。

图4 预杂交对信号的影响

Figure 4 Impact of pre-hybridization on the signal



A. 50 °C; B. 55 °C。

图5 不同杂交温度对信号的影响

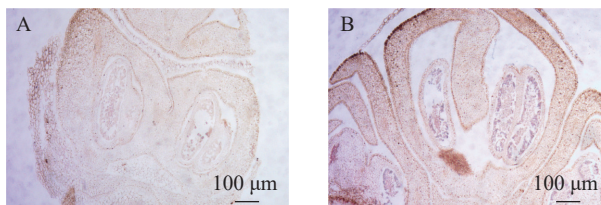
Figure 5 Impact of different hybridization temperatures on the signal

器官中的表达分布特征。结果显示：*OfUFO* 的杂交信号主要分布于 Stage 1 花粉粒中 (图 8B)，而 *OfYAB2* 的信号主要定位于花芽圆珠期和顶壳期苞片组织 (图 8C)，基于表达位置推测，两者可能分别参与花粉发育和苞片形成过程。

2.6.3 原位杂交在秋桂‘堰虹桂’不同发育阶段叶芽组织中的应用 选取‘堰虹桂’叶芽不同发育阶段的样品，选择叶芽发育相关的 *OfAUX5* 基因进行验证。通过构建系统进化树，表明 *OfAUX5* 与大花四照花 *Cornus florida* 中的 *CfAUX5* 蛋白具有 65% 的同源性，两者在结构和功能上具有相似的功能 (图 9A)。组织特异性分析表明 *OfAUX5* 基因在叶芽组织中高表达 (图 9B)。原位杂交试验进一步证实 *OfAUX5* 的杂交信号主要定位于生长点和幼叶处，且在幼叶处杂交信号最强 (图 9C)。推测该基因可能在‘堰虹桂’叶芽发育阶段中发挥功能。通过以上结果表明，优化的原位杂交方法适用于不同桂花品种、组织及发育阶段的 mRNA 定位表达研究。

3 讨论

植物组织原位杂交技术已被广泛用于不同植物的基因表达情况，但在桂花中鲜有报道，本研究的目的是优化适用于不同桂花品种、组织及发育阶段的原位杂交技术流程。若想通过杂交信号判断基因表达定位，保持组织结构的完整性至关重要。在切片前需要对其抽真空时间进行选择，以避免样品的完整性



A. 15 h; B. 20 h。

图6 不同杂交时间对信号的影响

Figure 6 Impact of different hybridization durations on the signal

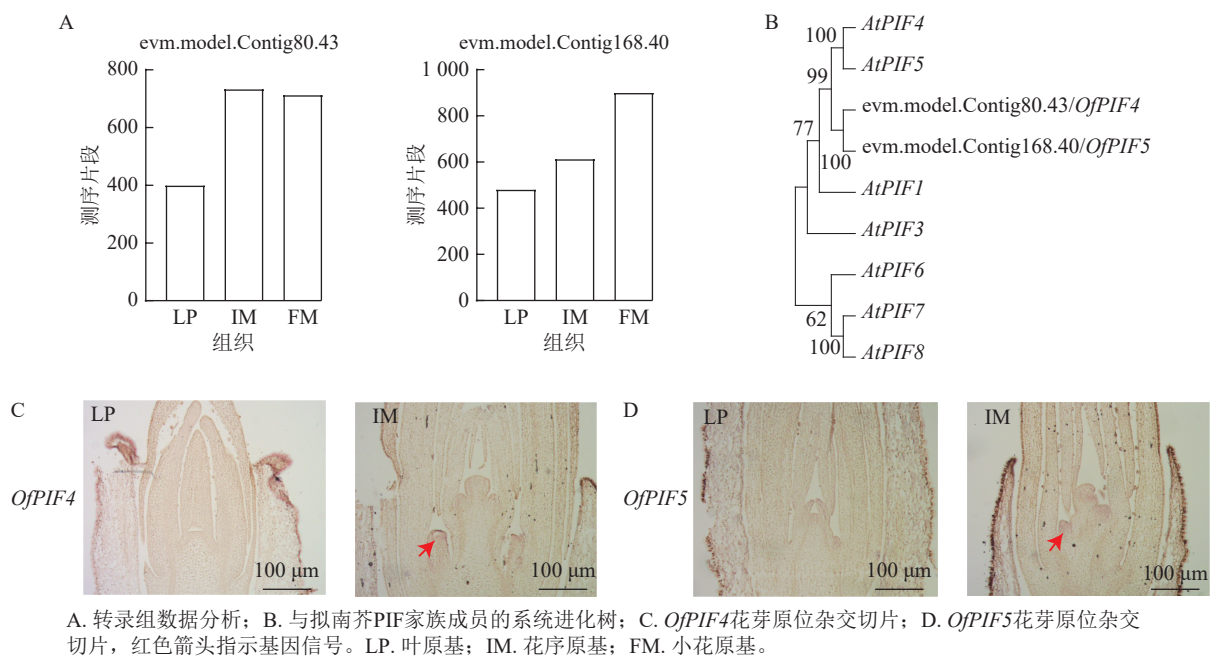


图 7 *OfPIF4*、*OfPIF5* 数据分析、系统进化树及在‘四季桂’花芽中的原位杂交切片
Figure 7 Data analysis of *OfPIF4* and *OfPIF5*, phylogenetic tree construction, and in situ hybridization sectioning in the flower buds of ‘Sijigui’

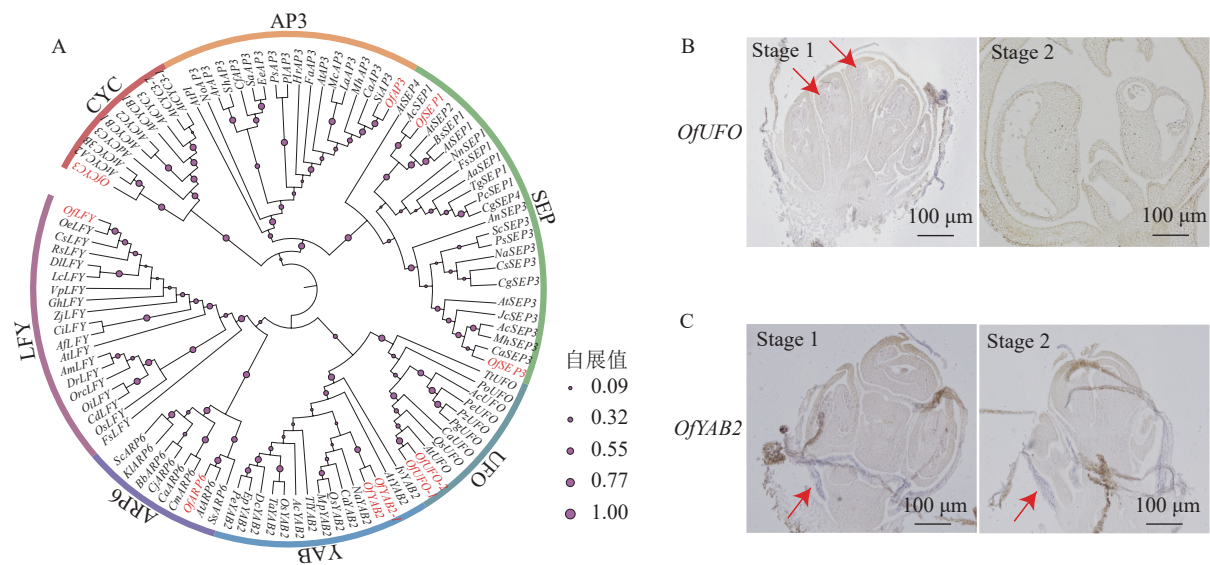
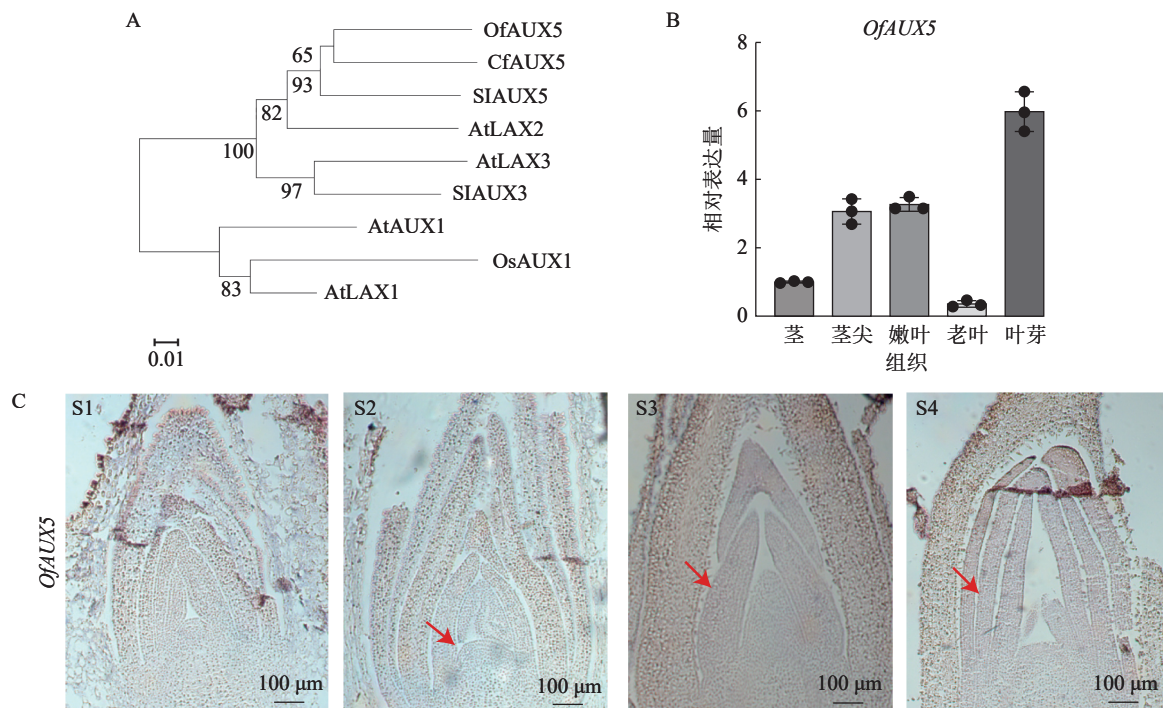


图 8 *OfUFO*、*OfYAB2* 蛋白的系统进化树和在‘堰虹桂’花芽中的原位杂交切片
Figure 8 Phylogenetic tree of *OfUFO* and *OfYAB2* proteins and in situ hybridization sections in the flower buds of ‘Yanhonggui’

受到影响。因此在本研究中选择抽真空 2 次，每次 30 min 进行，切片效果良好且具有较好的组织完整性。

在杂交前需用蛋白酶 K 处理组织切片，以提高探针在组织中的渗透能力并增强其与靶 RNA 的结合效率。然而，蛋白酶 K 消化时间过长可能破坏组织结构并加剧非特异性结合^[23]。消化时间过短则会限制探针渗透，降低杂交信号强度^[24]。本研究表明：当消化时间为 20~25 min 时，组织结构基本完整，且可获得清晰稳定的杂交信号。

预杂交通常被认为是原位杂交过程中的关键步骤，其主要作用是封闭样本中的非特异性结合位点，从而降低背景信号并提高杂交信号的特异性和稳定性。但本研究预杂交与不预杂交处理对桂花组织中杂交信号的强度和完整性影响不显著，说明在本体系中可省略预杂交步骤，不仅简化了实验流程，同时降低了试剂消耗和操作时间。



A. 桂花和其他物种的系统进化树；B. *OfAUX5*组织特异性分析；C. *OfAUX5*花芽原位杂交切片，红色箭头指示基因信号。
S1. 芽分化期；S2. 芽膨大期；S3. 芽开绽期；S4. 芽伸长期。

图9 *OfAUX5*蛋白的系统进化树、组织特异性和在‘堰虹桂’叶芽中的原位杂交切片

Figure 9 Phylogenetic tree, tissue specificity, and in situ hybridization sections of *OfAUX5* protein in the leaf buds of ‘Yanhonggui’

杂交温度和时间对探针与靶序列的特异性结合和检测灵敏度具有重要影响。较高的杂交温度虽然有助于提高结合特异性，但可能对组织结构稳定性产生不利影响^[25]。因此，本研究表明：在 50 ℃ 条件下可获得清晰稳定的杂交信号，且背景干扰相对较低；结合杂交时间对比结果，20 h 处理的信号强度明显优于 15 h。综合考虑信号质量与实验稳定性，确定 50 ℃、20 h 为桂花原位杂交的适宜条件。

为验证该优化体系的可靠性和适用性，进一步在不同桂花品种、组织及发育阶段中对多个基因进行检测。结果显示：*OfPIF4* 和 *OfPIF5* 主要在花序原基中表达，而 *OfUFO* 和 *OfYAB2* 主要在花粉和苞片中表达，*OfAUX5* 主要在幼叶中表达。上述表达模式与已知功能特征相一致，进一步证明了所建立原位杂交方法具有良好的可靠性和普适性。

4 结论

本研究建立了一套高效、稳定且可操作性强的桂花组织原位杂交技术体系，为桂花基因时空表达模式解析及功能研究提供了可靠的技术支撑，且该优化体系可在不同桂花品种、组织及发育阶段中获得清晰且具有良好特异性的杂交信号，显示出较高的稳定性和适用性，并有助于进一步明确目标基因在特定组织和发育阶段中的生物学功能。

5 参考文献

- [1] 向其柏, 刘玉莲. 中国桂花品种图志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2008. XIANG Qibai, LIU Yulian. *An Illustrated Monograph of the Sweet Osmanthus Cultivars in China* [M]. Hangzhou: Zhejiang Science & Technology Press, 2008.
- [2] 彭琳, 王艺光, 董彬, 等. 桂花 *OfLCYB* 提高转基因烟草类胡萝卜素含量和低温胁迫的抗性 [J]. *农业生物技术学报*, 2025, 33(1): 1–14. PENG Lin, WANG Yiguang, DONG Bin, et al. *Osmanthus fragrans OfLCYB* increased carotenoid content and resistance to low temperature stress in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2025, 33(1): 1–14. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2025.01.001.
- [3] 郭罕年, 熊欣, 胡飞杨, 等. 桂花 *OfSAUR21* 基因的克隆及功能验证 [J]. *浙江农林大学学报*, 2025, 42(5): 1059–1067. GUO Hannian, XIONG Xin, HU Feiyang, et al. Cloning and functional verification of *OfSAUR21* gene in *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(5): 1059–1067. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.20250446.

- [4] YE Yong, LU Xinke, KONG En, *et al.* OfWRKY17-OfC3H49 module responding to high ambient temperature delays flowering via inhibiting *OfSOC1B* expression in *Osmanthus fragrans* [J]. *Horticulture Research*, 2025, **12**(1): uhae273. DOI: [10.1093/hr/uhae273](https://doi.org/10.1093/hr/uhae273).
- [5] ZHONG Shiwei, ZHU Huijun, LI Wenle, *et al.* DNA methylome analysis reveals novel insights into active hypomethylated regulatory mechanisms of temperature-dependent flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *Horticulture Research*, 2024, **11**(3): uhae010. DOI: [10.1093/hr/uhae010](https://doi.org/10.1093/hr/uhae010).
- [6] LAN Yangang, HUANG Xue, LI Ziyi, *et al.* The OfJAZ3-OfMYB21 complex mediates jasmonic acid signaling pathway to regulate linalool biosynthesis in *Osmanthus fragrans* [J]. *Horticulture Research*, 2026, **13**(3): uhaf321. DOI: [10.1093/hr/uhaf321](https://doi.org/10.1093/hr/uhaf321).
- [7] TANG Meng, SONG Tao, LAM L P Y, *et al.* Integrated multi-omics reveals flower color regulatory networks in *Osmanthus fragrans* [J]. *Molecular Horticulture*, 2026, **6**: 1. DOI: [10.1186/s43897-025-00158-y](https://doi.org/10.1186/s43897-025-00158-y).
- [8] MARTINEAU B, TAYLOR W C. Cell-specific photosynthetic gene expression in maize determined using cell separation techniques and hybridization *in situ* [J]. *Plant Physiology*, 1986, **82**(2): 613–618. DOI: [10.1104/pp.82.2.613](https://doi.org/10.1104/pp.82.2.613).
- [9] YOKOYAMA R, TAKAHASHI T, KATO A, *et al.* The Arabidopsis *ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia [J]. *The Plant Journal*, 1998, **15**(3): 301–310. DOI: [10.1046/j.1365-3113x.1998.00203.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00203.x).
- [10] ELLIOTT R C, BETZNER A S, HUTTNER E, *et al.* *AINTEGUMENTA* an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth [J]. *The Plant Cell*, 1996, **8**(2): 155–168. DOI: [10.1105/tpc.8.2.155](https://doi.org/10.1105/tpc.8.2.155).
- [11] SAMACH A, KOHALMI S E, MOTTE P, *et al.* Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes [J]. *The Plant Cell*, 1997, **9**(4): 559–570. DOI: [10.1105/tpc.9.4.559](https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.559).
- [12] CORNISH E C, PETTITT J M, BONIG I, *et al.* Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca* [J]. *Nature*, 1987, **326**(6108): 99–102. DOI: [10.1038/326099a0](https://doi.org/10.1038/326099a0).
- [13] CHENG Jinchun, SEELEY K A, GOUPIL P, *et al.* Expression of DC8 is associated with, but not dependent on embryogenesis [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, **31**(1): 127–141. DOI: [10.1007/bf00020612](https://doi.org/10.1007/bf00020612).
- [14] DOMÍNGUEZ F, CEJUDO F J. Germination-related genes encoding proteolytic enzymes are expressed in the nucellus of developing wheat grains [J]. *The Plant Journal*, 1998, **15**(4): 569–574. DOI: [10.1046/j.1365-3113x.1998.00233.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00233.x).
- [15] WEBER H, BORISJUK L, HEIM U, *et al.* A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds [J]. *The Plant Cell*, 1997, **9**(6): 895–908. DOI: [10.1105/tpc.9.6.895](https://doi.org/10.1105/tpc.9.6.895).
- [16] SMITH A G, HINCHEE M, HORSCH R. Cell and tissue specific expression localized by *in situ* RNA hybridization in floral tissues [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, **5**(1): 237–241. DOI: [10.1007/bf02669718](https://doi.org/10.1007/bf02669718).
- [17] MEYEROWITZ E M. *In situ* hybridization to RNA in plant tissue [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, **5**(1): 242–250. DOI: [10.1007/bf02669719](https://doi.org/10.1007/bf02669719).
- [18] NADEAU J A, ZHANG X S, LI J, *et al.* Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs [J]. *The Plant Cell*, 1996, **8**(2): 213–239. DOI: [10.1105/tpc.8.2.213](https://doi.org/10.1105/tpc.8.2.213).
- [19] YAO Jin, LI Xingmei, WU Na, *et al.* Improvement of RNA *in situ* hybridisation for grapevine fruits and ovules [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(1): 800. DOI: [10.3390/ijms24010800](https://doi.org/10.3390/ijms24010800).
- [20] KIM M, PHAM T, HAMIDI A, *et al.* Reduced leaf complexity in tomato wiry mutants suggests a role for *PHAN* and *KNOX* genes in generating compound leaves [J]. *Development*, 2003, **130**(18): 4405–4415. DOI: [10.1242/dev.00655](https://doi.org/10.1242/dev.00655).
- [21] SUN Yi, JIANG Jianing, ZHANG Qiongyue, *et al.* The vascular-cambium-specific transcription factor PtrSCZ1 and its homologue regulate cambium activity and affect xylem development in *Populus trichocarpa* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2025, **16**: 1546660. DOI: [10.3389/fpls.2025.1546660](https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1546660).
- [22] SUN Jinjing, LI Feng, WANG Donghui, *et al.* CsAP3: a cucumber homolog to *Arabidopsis* APETALA3 with novel characteristics [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, **7**: 1181. DOI: [10.3389/fpls.2016.01181](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01181).
- [23] KITAZAWA S, KITAZAWA R, MAEDA S. *In situ* hybridization with polymerase chain reaction-derived single-stranded DNA probe and S1 nuclease [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 1999, **111**(1): 7–12. DOI: [10.1007/s004180050327](https://doi.org/10.1007/s004180050327).
- [24] FOUQUET R, LÉON C, OLLAT N, *et al.* Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, **27**(9): 1541–1550. DOI: [10.1007/s00299-008-0566-1](https://doi.org/10.1007/s00299-008-0566-1).
- [25] HOLLAND M S, MACKENZIE C D, BULL R W, *et al.* A comparative study of histological conditions suitable for both immunofluorescence and *in situ* hybridization in the detection of Herpesvirus and its antigens in chicken tissues [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1996, **44**(3): 259–265. DOI: [10.1177/44.3.8648086](https://doi.org/10.1177/44.3.8648086).