

空间转录组学技术及其在植物研究中的应用

张成¹, 周承哲¹, 田采云¹, 郭玉琼^{2,3*}

1 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002

2 福建农林大学安溪茶学院(数字经济学院), 福建 泉州 362400

3 福建农林大学茶产业研究院, 福建 福州 350002

张成, 周承哲, 田采云, 郭玉琼. 空间转录组学技术及其在植物研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 971-987.
ZHANG Cheng, ZHOU Chengzhe, TIAN Caiyun, GUO Yuqiong. Spatial transcriptomics techniques and its applications in plant research[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 971-987.

摘 要: 植物细胞基因表达的异质性是造成组织功能差异的关键因素。近年来, 利用空间转录组测序技术研究植物特定生物学问题已取得较大突破, 现已成功应用于细胞发育、细胞鉴定和抗逆应激等方面。为探究空间转录组测序技术在植物中的应用, 本文对空间转录组测序技术的发展、在植物中的应用以及未来研究方向 3 个方面进行综述, 系统阐述了空间转录组测序技术的发展进程, 重点分析其在植物细胞生长和分化、植物细胞鉴定、抗逆应激的应用中所取得的进展。此外, 总结空间转录组测序技术在植物应用中存在的挑战, 提出未来在植物研究中的方向以及结合其他组学技术的优势, 以期利用空间转录组测序技术解决更多植物领域的科学问题。

关键词: 空间转录组; 植物细胞类型; 细胞异质性

资助项目: 福建农林大学茶产业链科技创新与服务体系建设项目(K1520005A01); 福建农林大学“双一流”建设科技创新能力提升培育计划(KSYLP004); 协同创新院茶产业分院(K1521015A); 福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金(FJZTF01)

This work was supported by the Construction Project for Technological Innovation and Service System of Tea Industry Chain of Fujian Agriculture and Forestry University (K1520005A01), the “Double First-class” Scientific and Technological Innovation Capacity and Enhancement Cultivation Plan of Fujian Agriculture and Forestry University (KSYLP004), the Tea Industry Branch of Collaborative Innovation Institute (K1521015A), and the Special Fund for Science and Technology Innovation of Fujian Zhang Tianfu Tea Development Foundation (FJZTF01).

*Corresponding author. E-mail: guoyq828@163.com

Received: 2023-09-25; Accepted: 2023-12-13; Published online: 2024-01-03

Spatial transcriptomics techniques and its applications in plant research

ZHANG Cheng¹, ZHOU Chengzhe¹, TIAN Caiyun¹, GUO Yuqiong^{2,3*}

1 College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Anxi College of Tea Science (College of Digital Economy), Fujian Agriculture and Forestry University, Quanzhou 362400, Fujian, China

3 Tea Industry Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: The heterogeneity of gene expression in plant cells plays a crucial role in determining the functional differences among tissues. Recent advancements in spatial transcriptome (ST) technology have significantly contributed to the study of specific biological questions in plants. This technology has been successfully applied to examine cell development, identification, and stress resistance. This review aims to explore the application of ST technology in plants by reviewing three aspects: the development of ST technology, its current application in plants, and future research directions. The review provides a systematic description of the development process of ST technology, with a focus on analyzing its progress in studying plant cell growth and differentiation, plant cell identification, and stress resistance. In addition, the challenges faced by ST technology in plant applications are summarized, along with proposed future directions for plant research, including the advantages of combining other omics technologies with ST technology to tackle scientific challenges in the field of plants.

Keywords: spatial transcriptomics; plant cell type; cell heterogeneity

植物细胞是植物体各种生命活动的基本功能单位,同一机体中不同细胞具有相同的基因,但基因的表达水平在不同类型细胞中存在差异,导致细胞分化为不同类型,从而行使特定功能^[1-2]。利用RNA测序(RNA sequencing, RNA-seq),能够对目标组织中的转录本进行高通量测序,研究基因的转录水平并分析植物遗传变异、代谢调控和植物发育过程^[3-4]。RNA-seq通常采用混合样本对整个组织进行测序,以研究组织群体细胞的分子调控机制,但该方法只能获得平均的细胞信息,造成低丰度信息的缺失从而导致目标细胞类型的基因表达特征被掩盖,无法揭示细胞之间基因表达的异质性,使研究不同细胞类型所行使的功能受到限制^[5-6]。因此对特定组织区域进行高分辨率的表征,有助于全面

了解细胞发育过程。

随着生物技术的创新和发展,基于高通量测序技术的单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq),能对同一组织样本中的单细胞进行分离及测序,以揭示组织中单细胞水平上的基因表达变化、细胞连续分化轨迹及组织异质性^[7-10]。但scRNA-seq在实际应用中仍存在多种限制。相对较低的RNA转录产物捕获效率和覆盖率可能导致下游分析中基因表达信息的丢失^[11]。其次,由于细胞大小与细胞发育阶段等因素的影响,某些类型的细胞可能表现出显著细胞变异,从而导致测序结果不准确^[12]。此外,scRNA-seq需要通过解离组织来分离单个细胞,组织解离过程中可能无法保留细胞或组织即时的转录状态,从而导致基因异位表达、

产生污染信号,最后造成细胞亚群错误识别^[13]。同时,组织解离忽略了细胞在空间位置上的异质性,组织解离后丢失了细胞原始空间位置信息,从而限制了在空间和时间维度上对细胞发育的研究^[14]。空间转录组(spatial transcriptomics, ST)测序技术利用成像、生物标记、测序及生物信息学等工具在获得不同类型细胞基因表达信息的同时,保留基因表达的空间位置信息,克服了RNA-seq与scRNA-seq在实际应用中的限制,是研究植物细胞异质性和互作的有力工具^[15-17]。目前,ST技术已经在植物细胞生长、分化和抗逆应激等方面得到应用。本文综述了ST技术的最新进展,重点介绍了该技术在植物领域中的科学发现,提出ST技术未来在植物研究中的方向以及结合其他组学技术的优势,以期为ST技术在更多植物物种上得以应用提供参考。

1 空间转录组测序技术的发展

最初的ST技术工作流程于2016年建立,随着分辨率和通量的不断提升,该领域迅速发展^[16]。目前,已经开发了多种ST技术^[18],获取其精细评估的可行方法主要包括基于显微解剖、原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)、原位测序(*in situ* sequencing, ISS)和空间条形码(spatial barcoding),每种方法都有其优势和局限性。

1.1 空间转录组技术发展

早期的ST技术主要是通过显微解剖技术挑选目标细胞、组织进行RNA抽提和基因表达谱检测,以研究不同空间位置的细胞、组织在转录水平上的差异,这类方法包括激光捕获显微解剖(laser capture microdissection, LCM)^[19]、体内转录组分析(transcriptome *in vivo* analysis, TIVA)^[20]、RNA断层扫描(RNA tomography, Tomo-seq)^[21]等,但切割步骤繁琐以及低通量是这些方法的主要限制。基于ISH的技术是利用能

与转录本互补的标记探针(荧光探针和抗原抗体探针等)在原始环境中可视化RNA分子,包括单分子荧光原位杂交(single-molecule fluorescent *in situ* hybridization, smFISH)^[22]、多重误差鲁棒荧光原位杂交(multiplexed error-robust fluorescence *in situ* hybridization, MERFISH)^[23]、DNA显微技术(DNA microscopy)^[24]等,但需要合成特定探针,昂贵费时,只能对已知的靶标转录本进行检测,同时检测通量受到限制。基于ISS的技术需要将DNA探针与RNA分子原位杂交,然后通过高分辨率显微镜成像来识别细胞中目标RNA的空间位置,包括荧光原位RNA测序(fluorescent *in situ* sequencing, FISSEQ)^[25]、原位转录组可访问性测序(*in situ* transcriptome accessibility sequencing, INSTA-seq)^[26]、扩展测序(expansion sequencing, ExSeq)^[27]等,这些方法具有较高的空间分辨率,但其检测通量和灵敏度受到组织尺寸的限制。随着原位捕获原位测序概念的提出以及高通量测序技术的高速发展,基于空间条形码的ST技术应运而生,实现高分辨率、高通量的测序效果。此前已有文献对ST技术的发展进行综述^[28-30],在此基础上,本文重点介绍了基于空间条形码的ST技术发展历程以及最近开发的几种方法(图1),并对现有方法进行比较(表1)。

1.2 基于空间条形码空间转录组发展

Ståhl等^[16]开发了ST技术,在保留空间信息的同时,可对转录组进行定性与定量分析。该方法将组织切片置于载玻片上,载玻片捕获区域中含有用带有poly-T的逆转录引物固定并与组织切片衍生的mRNA的poly-A尾结合。引物中还含有空间条形码序列和唯一分子标识符(unique molecular identifiers, UMIs),代表每个阵列的坐标。在组织渗透过程中,组织细胞中的mRNA分子扩散至载玻片上100 μm的微孔中,

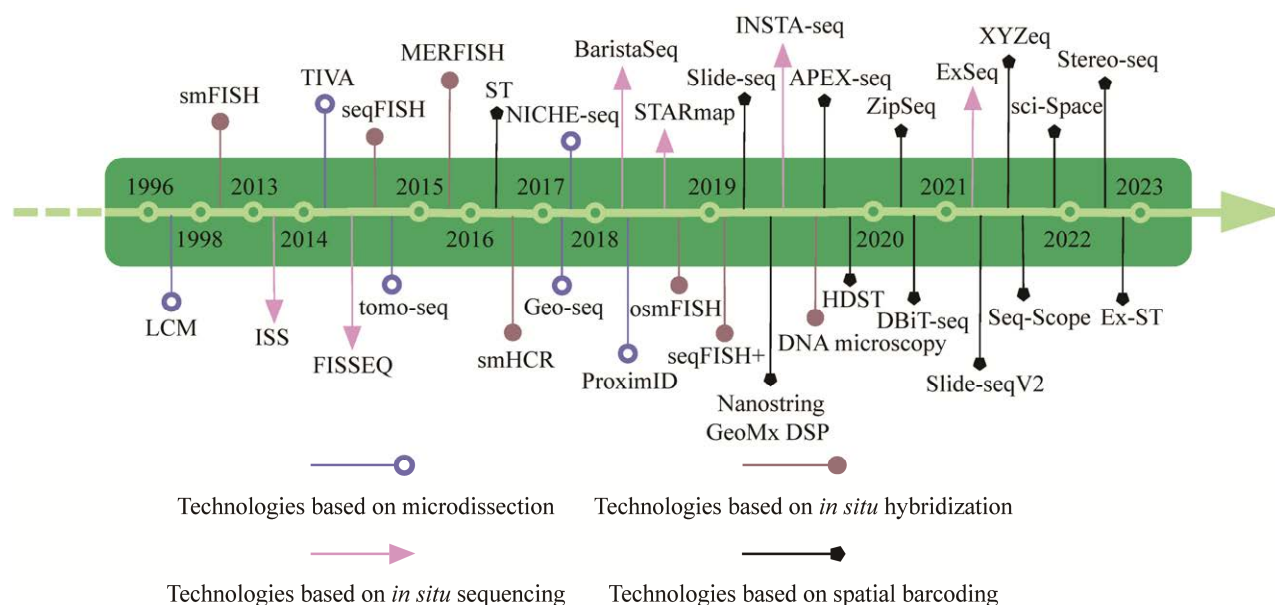


图 1 空间转录组发展进程

Figure 1 Development of the spatial transcriptomics.

表 1 空间转录组技术比较

Table 1 Comparisons of technologies for spatial transcriptomics

Technique	Strategy	Year	Resolution	Whether applied to plants	Advantage	Limitation	References
LCM	Microdissection	1996	Cellular	Yes	Faster to perform	Low throughput Difficult to operate	[19]
TIVA		2014	Cellular	No	Performed in living cells	Low throughput	[20]
tomo-seq		2014	N/A	No	High sensitivity and spatial resolution	Several same biological samples needed	[21]
Geo-seq		2017	10 cells	No	High sensitivity than LCM	Low throughput	[31]
NICHE-seq		2017	Cellular	No	High throughput	Limited to genetically engineered models	[32]
ProximID		2018	Cellular	No	Able to predict preferential associations between cells	Low throughput	[33]
smFISH	<i>In situ</i> hybridization	1998	Subcellular	Yes	High sensitivity	Low throughput Limited RNA measurement	[22]
seqFISH		2014	Subcellular	No	Highly multiplexed	Occurrence of errors that may be accumulated	[34]
MERFISH		2015	Subcellular	No	Highly multiplexed	Limited RNA measurement	[23]
smHCR		2016	Subcellular	No	High sensitivity	Low throughput	[35]
osmFISH		2018	Subcellular	No	Able to process large tissue areas and semi-automated	Low throughput	[36]

(待续)

(续表 1)

Technique	Strategy	Year	Resolution	Whether applied to plants	Advantage	Limitation	References
seqFISH+		2019	Subcellular	No	High accuracy	Low throughput and detection sensitivity	[37]
DNA microscopy		2019	Cellular	No	Able to image biological specimens without optical information	Empty space causing sparse signals	[24]
ISS	<i>In situ</i> sequencing	2013	Subcellular	Yes	High accuracy	Needs pre-designed pad-lock probes	[38]
FISSEQ		2014	Subcellular	No	Transcriptome-wide RNA <i>in situ</i> sequencing	Low sequencing depth	[25]
BaristaSeq		2018	Subcellular	No	High efficiency and accuracy	Needs pre-designed pad-lock probes	[39]
STARmap		2018	Subcellular	No	High efficiency and accuracy	Low throughput	[40]
INSTA-seq		2019	Subcellular	No	High throughput	Low detection sensitivity	[26]
ExSeq		2021	Subcellular	No	High spatially precision	Limits in detecting short transcripts	[27]
Spatial transcriptomics	Spatial barcoding	2016	100 μm / 55 μm (10 \times Genomics Visium)	Yes	Provides spatial information	Contains several cells in each sequencing unit Not at single-cell level	[16]
Slide-seq		2019	10 μm	No	High spatial resolution	Low capturing efficiency	[41]
Nanostring		2019	10 μm	No	High-plex and automation	May create bias in selecting regions	[42]
GeoMx DSP							
APEX-seq		2019	Subcellular	No	Performed in living cells	Not suitable for normal tissues	[43]
HDST		2019	2 μm	No	High resolution	Low detection sensitivity	[44]
ZipSeq		2020	Cellular	No	Performed on live cells in intact tissues	Limited spatial resolution	[45]
DBiT-seq		2020	10 μm	No	High spatial resolution and avoid lysis of tissues	Limited flow channels Low detection sensitivity	[46]
Slide-seqV2		2021	10 μm	No	High resolution	May capture transcripts from multiple cells	[47]
XYZeq		2021	500 μm	No	Enables unbiased single-cell transcriptomic analysis	Requires specialized device	[48]
Seq-Scope		2021	$\sim 0.5\text{--}0.8 \mu\text{m}$	No	High transcriptome capture efficiency	Low detection sensitivity	[49]
sci-Space		2021	200 μm	No	Retains single-cell resolution	Limited spatial resolution	[50]
Stereo-seq		2022	0.22 μm	Yes	High resolution and sensitivity; large visualizing field	Limited capturing efficiency	[51]
Ex-ST		2022	20 μm	No	Achieve higher resolution and detection efficiency	May capture transcripts from multiple cells	[52]

N/A: Not available.

并与引物杂交。之后在组织中加入逆转录试剂，并使用Cy3 标记的核苷酸来观察生成的cDNA。再用酶将组织去除，玻片上留下与核苷酸杂交的cDNA，并进行之后的测序、分析。尽管该方法提供了转录谱的空间信息，但其分辨率限制在 100 μm (3–30 个细胞)。之后，ST技术的分辨率不断提升，10 \times Genomics公司于2019年进一步开发该方法，将分辨率提升至 55 μm ，并正式推出商业化的空间转录组 10 \times Visium平台。同年，Rodrigues等^[41]开发了Slide-seq技术，其分辨率达到 10 μm 。该技术将条形码引物附着在微米级磁珠的表面，并将磁珠以单层分布的方式随机放置在载玻片表面，随后捕获带poly(A)尾的mRNA，进行cDNA合成及测序。由于磁珠随机分布，它们的位置信息必须通过测序解码，以匹配转录本与它们的位置，因此限制了磁珠的捕获效率。随后，Stickels等^[47]提出Slide-seqV2技术，对磁珠合成、文库生成及测序流程进行优化，与Slide-seq相比mRNA捕获效率提高约10倍。Nanostring GeoMx公司开发的数字空间表达谱(nanostring GeoMx digital spatial profiling, Nanostring GeoMx DSP)通过免疫荧光染色选择感兴趣区域，利用紫外线光束照射激活该区域，条形码从组织上释放下来并被收集测序，能以 10 μm 空间分辨率生成组织图像^[42]。基于微流体条形码标记的空间多组学测序(deterministic barcoding in tissue for spatial omics sequencing, DBiT-seq)技术利用微流控芯片技术，对切片组织进行编码，通过在组织中使用确定性条形码进行测序，可在组织切片中同时构建mRNA和蛋白质定位^[46]。在Slide-seq出现的同一时期，高分辨率空间转录组(high-definition spatial transcriptomics, HDST)技术提出，该技术分辨率可达 2 μm ，远高于ST技术，标志空间转录组开始进入单细胞分辨率时

代^[44]。XYZeq技术对组织内每个细胞使用两个条形码进行标记，细胞所处位置更加精确，同时可将scRNA-seq数据和细胞空间信息更好地整合在一起，实现单细胞分辨率空间转录图谱^[48]。Seq-scope技术利用空间条形码和Illumina测序平台实现了 0.5–0.8 μm 的亚微米分辨率，以及可视化各种组织中细胞和亚细胞水平的转录组学异质性^[49]。sci-Space基于早期开发的sci-Plex(一种使用未修饰DNA寡聚物对细胞核进行标记)，定位每个细胞的空间信息，再利用sci-RNA-seq完成测序^[50]。时空组学(spatial enhanced resolution omics-sequencing, Stereo-seq)技术被开发用于遗传信息的原位表征，分辨率可达 500 nm，捕获面积为 13 cm \times 13 cm，具有高灵敏度和高捕获率^[51]。扩展空间转录组(expansion spatial transcriptomics, EX-st)技术基于 10 \times Visium，在捕获整个转录组之前清除和扩展组织，从而克服空间分辨率受到阵列密度的限制，实现接近单细胞的分辨率和更高的低表达基因捕获效率^[52]。与上述技术不同，APEX-seq和Zip-seq技术可以对活细胞进行空间转录组研究。APEX-seq技术利用过氧化物酶APEX催化生物素-苯酚(biotin-phenol)产生的高活性自由基中间体，对邻近RNA分子进行共价加成反应，从而实现高空间特异性标记^[43]。而Zip-seq技术则是通过特定模式照明和光笼寡核苷酸将DNA编码(zipcodes)标记到完整组织的活细胞上，为后续单细胞组学数据记录细胞位置信息，并且可以实时和动态选择模式^[45]。

随着测序分辨率的提高，带来了诸如数据稀疏性和细胞边界难以推断等一系列挑战^[53]。同时，如何消除测序产生的“噪声”干扰也是一项亟须解决的挑战。由于每个测序单元的覆盖范围有限，并且在测序过程中需要保持空间位置的复杂程序，因此，分辨率越高，“噪声”则

可能越严重^[54]。在保留全面和必要信息的同时,提高分辨率,未来的突破方向可能涉及更小但更灵敏的检测单元,以及空间转录组学 with 高通量scRNA-seq数据的整合。

2 空间转录组测序技术在植物中的应用

尽管ST技术弥补了传统scRNA-seq空间信息丢失的缺陷,但由于植物细胞壁水解和细胞内转录产物难以扩散到阵列表面,ST技术在植物领域的应用晚于动物领域且尚未得到广泛应用^[55],此外,10×Visium ST技术尚未达到单细

胞分辨率^[56-57]。直到2017年,Giacomello等^[55]对ST技术中的组织固定、染色和透化步骤进行了优化,首次获得拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花序分生组织、白杨(*Populus tremula*)发育和休眠叶芽以及云杉(*Abies fabri*)雌球果的全转录组空间基因表达图谱,证明了该技术在植物领域应用的可行性(图2)。目前,ST技术在植物领域主要应用于细胞生长、分化和抗逆应激等方面的研究。

2.1 植物细胞生长和分化

植物生长发育以细胞的生长与分化为基础,通过细胞分裂增加细胞数目,细胞伸长增

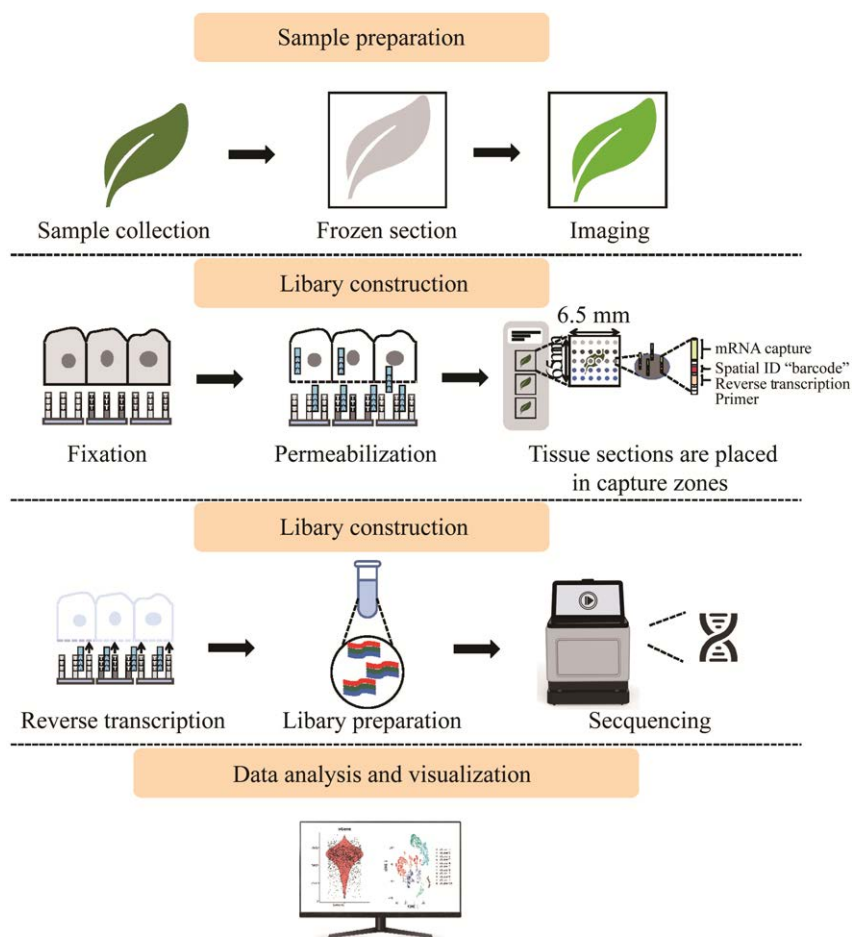


图2 植物10×Visium空间转录组学流程图

Figure 2 Flowchart of 10×Visium spatial transcriptomics in plants.

加细胞体积以及细胞分化形成不同的组织和器官。传统方法无法从单细胞层面解析基因表达与分子调控机制，而ST技术可以系统、连贯地对其进行研究，从不同角度原位可视化植物细胞的生长和分化的过程。

叶片是植物最重要的器官之一，成熟叶片主要由表皮、叶肉和维管系统组成。同时，叶片边缘区域细胞分化速度慢于中间区域，但叶片中所有类型的细胞是否遵循相同的发育模式尚不清楚^[58]。Giolai等^[59]利用ST技术检测拟南芥叶片空间基因表达特征并进一步探究叶中脉、叶脉和叶缘的空间特异性基因表达，根据差异表达基因的空间表达模式，将细菌感染的叶片精确地分为36个细胞簇，鉴定了不同的细胞类型。而早期的叶片单细胞研究无法区分叶肉细胞和海绵状叶肉细胞，也无法区分上表皮细胞和下表皮细胞。2022年，Xia等^[60]在拟南芥叶片中首次应用Stereo-seq技术，成功区分拟南芥叶片的上表皮和下表皮细胞，以及海绵状和栅栏状叶肉细胞，揭示了4类细胞在分子特征上的细微差异，并对表皮细胞、维管细胞和保卫细胞进行拟时分析。发现在维管细胞中，主叶脉区域的细胞相较于叶缘细胞，其分化程度更低，拥有更高的多功能干性。而在表皮和保卫细胞中，保卫细胞显著富集于发育轨迹中的一支，但未能观察到明显的空间分布差异特征。该研究成功构建了拟南芥叶片的单细胞空间转录图谱，揭示了叶片不同细胞的空间发育轨迹，为研究叶片不同细胞的特殊发育阶段提供了重要参考。同年，Liu等^[61]对Stereo-seq流程进行改进，构建了花生(*Arachis hypogaea*)果针(peg)、根、茎和胚轴的单细胞分辨率空间转录组图谱，通过识别花生果针内部不同空间区域的细胞特征，不同组织细胞划分为18个细胞簇，不同组织部位细胞被较好区分。其中，花生茎被划分

为9个细胞簇，与解剖结构基本一致，可较好鉴定花生不同组织中的细胞类型，同时通过拟时分析揭示了形成层细胞的双向分化轨迹，为其他植物空间转录图谱的构建奠定技术基础。花器官的发育是被子植物中特有的一个神秘过程，涉及细胞在特定位点的生长、分裂和分化以及细胞与细胞之间的相互作用等一系列细胞活动。运用10×Visium对蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)花器官细胞的发育过程进行研究，首先，空间转录图谱将各发育阶段的组织细胞分为40个细胞簇，其中，花被片、唇瓣和花柱组织中与相应的组织形态学检测的观察结果高度一致，为后续详细分析从分生组织细胞到分化后细胞的细胞类型变化提供了分子图谱，进一步发现早期花原基存在分生组织细胞，随后分化为营养型细胞和生殖细胞^[62]。此外，花器官基部位置的分生细胞在器官萌发后的多个发育阶段持续发挥作用，特别是花药的发育，其原基从一个点开始到后期的多种分化细胞类型，包括授粉和其他营养组织，ST技术的应用为进一步研究兰花开花过程中复杂而重要的基因调控网络提供了宝贵的资源^[62]。豆科植物可以与固氮根瘤菌共生形成根瘤，从而固定大气中的氮气供宿主植物利用，但对根瘤的细胞异质性和发育谱系了解仍然有限。Liu等^[63]通过Stereo-seq技术构建大豆(*Glycine max* L. cv. Williams 82)根瘤的单细胞空间转录图谱，首先通过scRNA-seq识别出15个细胞簇，进一步应用Stereo-seq技术验证了细胞簇身份，根据细胞簇在空间上的分布进一步将细胞簇分配为5个不同细胞簇，并通过 β -葡萄糖醛酸酶染色和细胞类型特异性基因的RNA原位杂交验证了细胞注释结果，同时鉴定出不同类型细胞的基因表达状态，结合拟时分析，探究大豆根瘤非侵染细胞的分化过程和细胞状态转换轨迹，揭示了大

豆非侵染细胞中不同细胞亚型在发育和功能上的不同角色,为研究根瘤成熟的调控网络提供了新见解。在杨树(*Populus alba*×*Populus glandulosa* clone “84K”)茎从初生生长到次生长连续发育过程的研究中,将ST技术与高分辨率电子显微观察相结合,通过追踪研究杨树茎从顶端原形成层干细胞逐步发育形成次生维管组织干细胞的连续过程,发现原形成层干细胞衍生的子细胞分别分化形成韧皮部干细胞,以及维管形成层干细胞,同时空间转录图谱将6个发育时期的茎节分为初生生长和次生生长两大类群,细分为17个细胞簇,结合扫描电镜观察结果和ST技术提供的区域基因表达信息,首次发现次生维管组织中可能存在形态结构与特征表达基因不同的两类干细胞,分别负责形成韧皮部细胞与木质部细胞,系统解析了植物次生维管组织干细胞的起源发生与发育过程^[64]。此外,在番茄(*S. lycopersicum* cultivar Micro-Tom)中,通过将ST技术与scRNA-seq以及单细胞核转录组测序(single-nucleus RNA sequencing, snRNA-seq)相结合,构建番茄愈伤组织芽再生的空间转录图谱,成功鉴定了表皮、维管组织、芽原基、成熟芽和内部愈伤组织5种细胞类型,表明愈伤组织中存在高度异质的细胞群,进一步在表皮细胞中发现两种主要的细胞亚型,分布在靠近空气和培养基的不同位置,并具有不同的功能,同时拟时分析结果显示番茄韧皮部和木质部从原形成层/形成层分化而来,同时通过表征芽原基及其周围细胞的空间分辨分子特征,确定了芽原基形成的特定因素^[65]。近期,利用scRNA-seq和ST技术,探究杨树(*Populus euramericana* cv. ‘Nanlin895’)主干初生和次生长组织的转录景观,结合PXY、WOX4等标记基因和基因本体(gene ontology, GO)富集分析将形成层细胞细分为两类:一类是分化为木质

部纤维和导管细胞,另一类可能发育为射线薄壁细胞^[66]。同时,绘制形成层、木质部前体和韧皮部前体3类细胞的发育轨迹,从中发现了一些呈明显分化阶段特异性表达的基因,例生长素和未知功能的基因^[66]。进一步收集导管和纤维细胞类群,鉴定了这两类细胞从早期分化产生到完成次生细胞壁加厚期间的亚细胞群,绘制了不同发育阶段的基因表达谱并鉴定到一系列可能参与调控的新基因,空间转录图谱与解剖区域基因表达结果和单细胞图谱之间高度一致,为scRNA-seq鉴定到的不同发育阶段特异基因提供了表达位置的验证^[66]。综上所述,ST技术在各种植物组织中的应用充分证明了其在建立细胞发育谱系方面的潜力,这也将激发ST技术更多地应用于探究植物细胞生长发育机理的研究中。

2.2 抗逆应激响应

植物在生长过程中会遭病虫害、干旱、寒冷以及光照条件等生物与非生物胁迫,并发生一系列从形态到分子水平的变化,进而抑制植物的生长发育。在长期进化过程中,植物形成一系列机制以适应和抵御各种逆境胁迫。利用ST技术对不同胁迫处理下植物组织中细胞类型的组成变化进行探究,有利于从单细胞水平上解析植物抗逆应激机制。C4和景天酸代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)光合作用能使植物在逆境条件下维持或增加自养核心碳代谢,并且两者都充当碳浓缩机制(carbon concentration mechanisms, CCMs)^[67]。大多数情况下,植物倾向于进化其中一种CCM,而马齿苋(*Portulaca oleracea*)在应对干旱或光周期变化时,能同时进行兼性的CAM循环(C4+CAM)^[68]。Moreno-Villena等^[69]以马齿苋叶片为研究对象,从空间层面整合了光合作用中C4和CAM两种不同代谢途径的细胞定位,同时对不同环境下

的叶片进行传统转录组分析,并结合ST技术分析了C4及CAM相关的差异表达基因,建立C4和CAM共同参与的双细胞-双(昼夜)阶段的光合代谢模型以及流量平衡模型。结果表明,当水分充足时,马齿苋叶片中只能检测到少量的CAM途径。而处于干旱环境时,可以进行C4+CAM代谢途径,此时马齿苋中的C4途径亦可利用CAM途径产生苹果酸,大幅提高光合作用的效率,为研究植物光合作用和应对干旱胁迫提供了新视角。

3 展望

近年来,得益于ST技术的迅猛发展,极大拓展了科研人员对各种细胞和组织调控机制的认知。相较于动物细胞,植物细胞具有细胞壁、液泡和叶绿体等特有结构,限制了ST技术在植物领域中的应用。同时,当前ST技术仍然面临着分辨率低、灵敏度低、通量低以及样品制备技术限制等挑战。未来,提高ST技术的分辨率、灵敏度及捕获效率有利于构建更完善、精细的单细胞空间转录图谱。同时,优化样品制备技术和组织、细胞透化技术,降低ST技术的实验成本,促进ST技术在植物领域的普适化应用。

虽然ST技术在发现构建空间图谱和绘制空间蓝图方面得到广泛应用和推广,但其潜力远不止于此。植物在自然环境中通过各种直接和间接机制与细菌、真菌、病毒等多种微生物群相互作用,通过探究植物与微生物群的相互作用,可以区分有益与有害的相互作用,同时了解它们在植物发育和抵御逆境胁迫中的重要作用^[70]。ST技术是原位检测植物与微生物群相互作用的有力工具,可以解决共生组织中细胞间的异质性问题,使科研人员能够研究有助于微生物群落定殖的共生反应。其次,ST技术可

用于分析植物对病原体感染的免疫反应。利用ST技术检查不同感染阶段的病变组织,绘制不同阶段基因的动态表达水平图,研究疾病和免疫进展过程中的区域和细胞类型,发现最易受感染的细胞类型,同时显示感染和未感染细胞的空间相对位置。此外,还可以利用这项技术分析相邻细胞间的交流,揭示免疫信号在细胞间传递的机制。充分利用ST技术,将进一步加深对植物抗病机制的理解,并为改变植物抗病性提供新的见解。

植物具有丰富的次生代谢物,与初级代谢物不同,次生代谢物对植物生长发育不是必需的,但在植物与环境的相互作用中至关重要,可作为防御分子,帮助植物抵御环境胁迫^[71]。由于代谢物的丰度易受到取样时间、生长条件等因素的影响,因此,传统代谢组通常采用大规模样本进行更多的生物学重复,以保证样本真实的代谢特征。而ST技术样本组内细胞组成相对稳定,不需要大规模样本也可获得真实的细胞组成信息。代谢组学信息反映生物体终端的代谢效应,将其与上游转录组信息结合,可发现转录本与下游代谢物之间的调控关系。对于样本组间差异较大的研究,可通过ST数据分析锁定对应的细胞类型,进一步根据重点细胞类型的基因表达谱关联对应的代谢图谱从而揭示具体生物过程上下游的完整调控信息。对于重复性比较强且样本易于处理和保存的模式植物,可先对样本进行对应的代谢图谱分析,找到所关注的差异代谢物类型进而锁定对应细胞类型,再进行ST分析,关注对应细胞类型的空间转录图谱,从整体水平研究递进到空间水平细胞研究。

代谢物的空间信息对于探究其在植物个体组织或细胞中调控特定生物过程中的作用必不

可少,空间代谢组学(spatial metabolomics, SM)可用于获取特定组织中大量代谢物的空间分布信息,并研究代谢物在发育过程中的时空动态,但受空间分辨率和检测灵敏度的限制,尚未在单细胞分析领域广泛应用^[72-73]。随着SM技术空间分辨率和检测灵敏度不断提升,从单细胞分辨率检测植物组织中的初级和次级代谢物,同时结合ST技术获取的空间转录图谱,绘制更完善的植物单细胞空间代谢、转录图谱,将有助于更全面了解影响植物生长发育的调控机制。以茶树为例,茶是世界上最受欢迎的无酒精饮料之一,与其他植物相比,茶树含有独特的次生代谢物,包括儿茶素、茶氨酸、咖啡碱和挥发性化合物等,赋予茶独特风味、香气品质以及潜在的健康益处^[74]。未来利用ST、SM技术,精确定位茶树生长发育相关次生代谢物所在细胞位置,绘制全面的单细胞空间转录、代谢图谱,对茶树生长发育、代谢物合成和品质提升等方面的研究具有重要意义。本课题组前期探究了茶叶萎凋过程中风味组分类黄酮与萜类化合物的代谢调控与风味品质形成的作用机制,发现萎凋处理后类黄酮合成基因的转录受到抑制,萜类化合物合成基因的转录得到增强,是促进萎凋过程中叶片苦涩物质类黄酮含量减少及花果香气物质萜类化合物含量上升的主要原因^[75-78]。目前,笔者团队成功构建了茶树不同组织部位空间转录图谱,已初步筛选出在不同组织部位及不同类型细胞中差异表达的关键风味组分合成相关基因。基于此,进一步探究茶树次生代谢物在茶树生长和对风味品质形成作用机制,为针对性地调控茶树次生代谢物以及提升品质提供理论参考。

经典的中心法则认为DNA转录为RNA,再翻译成蛋白质,进而行使生物学功能。其中,

蛋白质是植物体各类生命活动的直接执行者,蛋白质的变化反映细胞翻译和调控水平^[79]。对蛋白质结构、定位以及蛋白质间相互作用进行研究,可为阐明生命现象本质提供基础。同时大多数细胞生物学过程都涉及蛋白质亚细胞定位的变化,但传统蛋白质组学与RNA-seq检测水平类似,检测组织或细胞裂解液中蛋白的平均表达水平,丢失空间位置信息。空间蛋白质组学(spatial proteomics, SP)技术通过将空间信息、细胞类型信息以及蛋白质组数据相关联,获得组织内不同细胞和功能区域的蛋白表达谱,进而深入了解组织空间环境并发现更精准的生物标志物及新的功能机制。目前,蛋白质组学在有关植物遗传育种、逆境胁迫耐受机制及与微生物互作等研究中得到广泛应用^[80-83]。而SP技术受实验成本、蛋白质提取与分离技术及检测灵敏度的限制,尚未在植物领域得到广泛应用^[84-85]。转录组学揭示生命现象的底层因子,蛋白组学揭示了生命现象的表层因子,未来随着SP技术进一步成熟,同时与ST技术联合使用,从而实现由表及里深层次挖掘植物生命现象的本质,将有助于植物遗传育种、逆境胁迫耐受机制及与微生物互作等方面进行深入研究,为理解植物体生命过程提供新见解。

转录水平、代谢物水平及蛋白水平都与植物生长发育过程密切相关,只有全面研究多种细胞成分,才能准确确定植物发育的关键因素。而每种技术都有自身独特的优势,因此,多组学联合分析将是未来植物领域研究的发展趋势。与传统单组学技术研究生物过程不同,空间多组学联合分析整合了植物发育过程中的代谢和遗传信息,能够在单细胞分辨率上分析关键代谢物与基因表达之间的相关性(图3)。通过空间多组学联合分析观察细胞间的相互作用,可

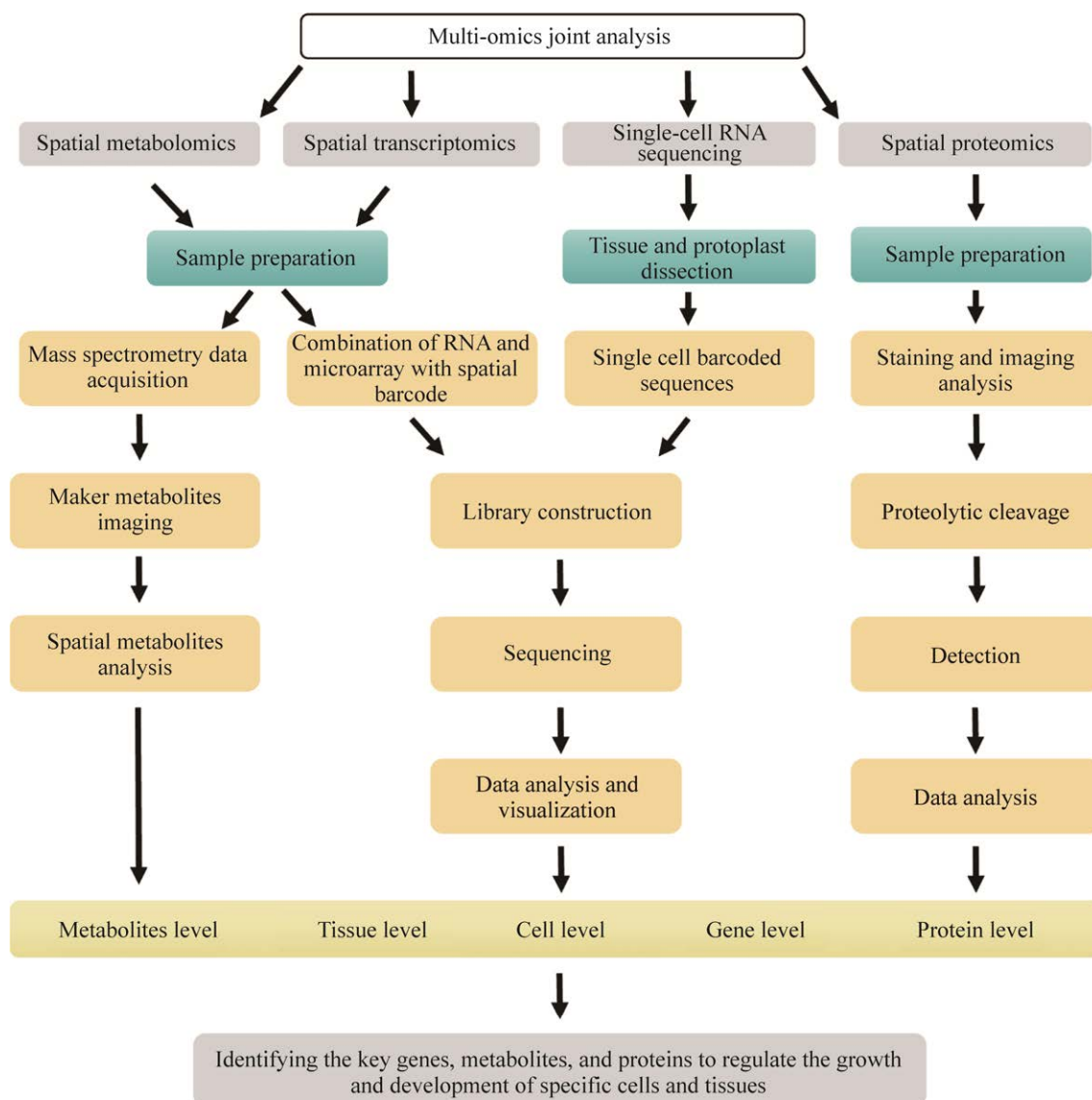


图3 多组学分析示意图

Figure 3 The schematic diagram of multi-omics analysis.

以更全面地了解细胞的功能，发现罕见的细胞群和复杂的代谢产物，为进一步研究植物发育提供依据。

REFERENCES

- [1] TANG FC, BARBACIORU C, NORDMAN E, LI B, XU NL, BASHKIROV VI, LAO KQ, SURANI MA. RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell[J]. Nature Protocols, 2010,

5(3): 516-535.

- [2] 张舒婷, 张雪莹, 朱晨, 李卓蕴, 傅卓然, 张梓浩, 赖钟雄, 林玉玲. 单细胞转录组测序技术及其在植物中的应用[J]. 园艺学报, 2022, 49(10): 2163-2173. ZHANG ST, ZHANG XY, ZHU C, LI ZY, FU ZR, ZHANG ZH, LAI ZX, LIN YL. Single cell transcriptome sequencing technology and its application in plants[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(10): 2163-2173 (in Chinese).
- [3] FU N, WANG Q, SHEN HL. *De novo* assembly, gene annotation and marker development using illumina

- paired-end transcriptome sequences in celery (*Apium graveolens* L.)[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57686.
- [4] IORIZZO M, SENALIK DA, GRZEBELUS D, BOWMAN M, CAVAGNARO PF, MATVIENKO M, ASHRAFI H, van DEYNZE A, SIMON PW. *De novo* assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 389.
- [5] GUTJAHR C, SAWERS RJH, MARTI G, ANDRÉS-HERNÁNDEZ L, YANG SY, CASIERI L, ANGLIKER H, OAKELEY EJ, WOLFENDER JL, ABREU-GOODGER C, PASZKOWSKI U. Transcriptome diversity among rice root types during asymbiosis and interaction with arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(21): 6754-6759.
- [6] TAKEHISA H, SATO Y, IGARASHI M, ABIKO T, ANTONIO BA, KAMATSUKI K, MINAMI H, NAMIKI N, INUKAI Y, NAKAZONO M, NAGAMURA Y. Genome-wide transcriptome dissection of the rice root system: implications for developmental and physiological functions[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2012, 69(1): 126-140.
- [7] BUTLER A, HOFFMAN P, SMIBERT P, PAPALEXI E, SATIJA R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(5): 411-420.
- [8] WU HJ, KIRITA Y, DONNELLY EL, HUMPHREYS BD. Advantages of single-nucleus over single-cell RNA sequencing of adult kidney: rare cell types and novel cell states revealed in fibrosis[J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2018, 30(1): 23-32.
- [9] MONCADA R, BARKLEY D, WAGNER F, CHIODIN M, DEVLIN JC, BARON M, HAJDU CH, SIMEONE DM, YANAI I. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(3): 333-342.
- [10] STEVEN POTTER S. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease[J]. Nature Reviews Nephrology, 2018, 14(8): 479-492.
- [11] LONGO SK, GUO MG, JI AL, KHAVARI PA. Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22(10): 627-644.
- [12] CHEN G, NING BT, SHI TL. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 317.
- [13] van den BRINK SC, SAGE F, VÉRTESY Á, SPANJAARD B, PETERSON-MADURO J, BARON CS, ROBIN C, van OUDENAARDEN A. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations[J]. Nature Methods, 2017, 14(10): 935-936.
- [14] GURAZADA SGR, COX KL JR, CZYMMEK KJ, MEYERS BC. Space: the final frontier—achieving single-cell, spatially resolved transcriptomics in plants[J]. Emerging Topics in Life Sciences, 2021, 5(2): 179-188.
- [15] PIÑEIRO AJ, HOUSER AE, JI AL. Research techniques made simple: spatial transcriptomics[J]. Journal of Investigative Dermatology, 2022, 142(4): 993-1001.e1.
- [16] STÅHL PL, SALMÉN F, VICKOVIC S, LUNDMARK A, NAVARRO JF, MAGNUSSON J, GIACOMELLO S, ASP M, WESTHOLM JO, HUSS M, MOLLBRINK A, LINNARSSON S, CODELUPPI S, BORG Å, PONTÉN F, COSTEA PI, SAHLÉN P, MULDER J, BERGMANN O, LUNDEBERG J, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics[J]. Science, 2016, 353(6294): 78-82.
- [17] CROSETTO N, BIENKO M, van OUDENAARDEN A. Spatially resolved transcriptomics and beyond[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(1): 57-66.
- [18] MOSES L, PACTER L. Museum of spatial transcriptomics[J]. Nature Methods, 2022, 19(5): 534-546.
- [19] EMMERT-BUCK MR, BONNER RF, SMITH PD, CHUAQUI RF, ZHUANG ZP, GOLDSTEIN SR, WEISS RA, LIOTTA LA. Laser capture microdissection[J]. Science, 1996, 274(5289): 998-1001.
- [20] LOVATT D, RUBLE BK, LEE J, DUECK H, KIM TK, FISHER S, FRANCIS C, SPAETHLING JM, WOLF JA, GRADY MS, ULYANOVA AV, YELDELL SB, GRIEPENBURG JC, BUCKLEY PT, KIM J, SUL JY, DMOCHOWSKI IJ, EBERWINE J. Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue[J]. Nature Methods, 2014, 11(2): 190-196.
- [21] JUNKER JP, NOËL ES, GURYEV V, PETERSON KA, SHAH G, HUISKEN J, McMAHON AP, BEREZIKOV E, BAKKERS J, van OUDENAARDEN A.

- Genome-wide RNA tomography in the zebrafish embryo[J]. *Cell*, 2014, 159(3): 662-675.
- [22] FEMINO AM, FAY FS, FOGARTY K, SINGER RH. Visualization of single RNA transcripts *in situ*[J]. *Science*, 1998, 280(5363): 585-590.
- [23] CHEN KH, BOETTIGER AN, MOFFITT JR, WANG SY, ZHUANG XW. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells[J]. *Science*, 2015, 348(6233): aaa6090.
- [24] WEINSTEIN JA, REGEV A, ZHANG F. DNA microscopy: optics-free spatio-genetic imaging by a stand-alone chemical reaction[J]. *Cell*, 2019, 178(1): 229-241.e16.
- [25] LEE JH, DAUGHARTHY ER, SCHEIMAN J, KALHOR R, YANG JL, FERRANTE TC, TERRY R, JEANTY SSF, LI C, AMAMOTO R, PETERS DT, TURCZYK BM, MARBLESTONE AH, INVERSO SA, BERNARD A, MALI P, RIOS X, AACH J, CHURCH GM. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*[J]. *Science*, 2014, 343(6177): 1360-1363.
- [26] FÜRTH D, HATINI V, LEE JH. *In situ* transcriptome accessibility sequencing (INSTA-seq)[J]. *BioRxiv*, 2019: 1-18.
- [27] ALON S, GOODWIN DR, SINHA A, WASSIE AT, CHEN F, DAUGHARTHY ER, BANDO Y, KAJITA A, XUE AG, MARRETT K, PRIOR R, CUI Y, PAYNE AC, YAO CC, SUK HJ, WANG R, YU CC J, TILLBERG P, REGINATO P, PAK N, et al. Expansion sequencing: spatially precise *in situ* transcriptomics in intact biological systems[J]. *Science*, 2021, 371(6528): eaax2656.
- [28] 肖宇彬, 张子旭, 王玉珠, 刘欢, 陈乐天. 时空转录组研究进展[J]. *植物学报*, 2023, 58(2): 214-232. XIAO YB, ZHANG ZX, WANG YZ, LIU H, CHEN LT. Research progress of spatiotemporal transcriptomes[J]. *Bulletin of Botany*, 2023, 58(2): 214-232 (in Chinese).
- [29] DU J, YANG YC, AN ZJ, ZHANG MH, FU XH, HUANG ZF, YUAN Y, HOU J. Advances in spatial transcriptomics and related data analysis strategies[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 1-21.
- [30] YIN RL, XIA KK, XU X. Spatial transcriptomics drives a new era in plant research[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2023: 116(6): 1571-1581.
- [31] CHEN J, SUO SB, TAM PP, HAN JD J, PENG GD, JING NH. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(3): 566-580.
- [32] MEDAGLIA C, GILADI A, STOLER-BARAK L, de GIOVANNI M, SALAME TM, BIRAM A, DAVID E, LI HJ, IANNAcone M, SHULMAN Z, AMIT I. Spatial reconstruction of immune niches by combining photoactivatable reporters and scRNA-seq[J]. *Science*, 2017, 358(6370): 1622-1626.
- [33] BOISSET JC, VIVIÉ J, GRÜN D, MURARO MJ, LYUBIMOVA A, van OUDENAARDEN A. Mapping the physical network of cellular interactions[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(7): 547-553.
- [34] LUBECK E, COSKUN AF, ZHIYENTAYEV T, AHMAD M, CAI L. Single-cell *in situ* RNA profiling by sequential hybridization[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(4): 360-361.
- [35] SHAH S, LUBECK E, SCHWARZKOPF M, HE TF, GREENBAUM A, SOHN CH, LIGNELL A, CHOI HMT, GRADINARU V, PIERCE NA, CAI L. Single-molecule RNA detection at depth by hybridization chain reaction and tissue hydrogel embedding and clearing[J]. *Development (Cambridge, England)*, 2016, 143(15): 2862-2867.
- [36] CODELUPPI S, BORM LE, ZEISEL A, La MANNO G, van LUNTEREN JA, SVENSSON CI, LINNARSSON S. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 932-935.
- [37] ENG CH L, LAWSON M, ZHU Q, DRIES R, KOULENA N, TAKEI Y, YUN JN, CRONIN C, KARP C, YUAN GC, CAI L. Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH+[J]. *Nature*, 2019, 568(7751): 235-239.
- [38] KE RQ, MIGNARDI M, PACUREANU A, SVEDLUND J, BOTLING J, WÄHLBY C, NILSSON M. *In situ* sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(9): 857-860.
- [39] CHEN XY, SUN YC, CHURCH GM, LEE JH, ZADOR AM. Efficient *in situ* barcode sequencing using padlock probe-based BaristaSeq[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(4): e22.
- [40] WANG X, ALLEN WE, WRIGHT MA, SYLWESTRAK EL, SAMUSIK N, VESUNA S, EVANS K, LIU C, RAMAKRISHNAN C, LIU J, NOLAN GP, BAVA FA, DEISSEROTH K. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states[J]. *Science*, 2018, 361(6400): eaat5691.
- [41] RODRIQUES SG, STICKELS RR, GOEVA A,

- MARTIN CA, MURRAY E, VANDERBURG CR, WELCH J, CHEN LM, CHEN F, MACOSKO EZ. Slide-seq: a scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution[J]. *Science*, 2019, 363(6434): 1463-1467.
- [42] TOKI MI, MERRITT CR, WONG PF, SMITHY JW, KLUGER HM, SYRIGOS KN, ONG GT, WARREN SE, BEECHEM JM, RIMM DL. High-plex predictive marker discovery for melanoma immunotherapy-treated patients using digital spatial profiling[J]. *Clinical Cancer Research*, 2019, 25(18): 5503-5512.
- [43] FAZAL FM, HAN S, PARKER KR, KAEWSAPSAK P, XU J, BOETTIGER AN, CHANG HY, TING AY. Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-seq[J]. *Cell*, 2019, 178(2): 473-490.e26.
- [44] VICKOVIC S, ERASLAN G, SALMÉN F, KLUGHAMMER J, STENBECK L, SCHAPIRO D, ÄIJÖ T, BONNEAU R, BERGENSTRÄHLE L, NAVARRO JF, GOULD J, GRIFFIN GK, BORG Å, RONAGHI M, FRISÉN J, LUNDEBERG J, REGEV A, STÄHL PL. High-definition spatial transcriptomics for *in situ* tissue profiling[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(10): 987-990.
- [45] HU KH, EICHORST JP, MCGINNIS CS, PATTERSON DM, CHOW ED, KERSTEN K, JAMESON SC, GARTNER ZJ, RAO AA, KRUMMEL MF. ZipSeq: barcoding for real-time mapping of single cell transcriptomes[J]. *Nature Methods*, 2020, 17(8): 833-843.
- [46] LIU Y, YANG MY, DENG YX, SU G, ENNINFUL A, GUO CC, TEBALDI T, ZHANG D, KIM D, BAI ZL, NORRIS E, PAN A, LI JT, XIAO Y, HALENE S, FAN R. High-spatial-resolution multi-omics sequencing *via* deterministic barcoding in tissue[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1665-1681.e18.
- [47] STICKELS RR, MURRAY E, KUMAR P, LI JL, MARSHALL JL, Di BELLA DJ, ARLOTTA P, MACOSKO EZ, CHEN F. Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(3): 313-319.
- [48] LEE YJ, BOGDANOFF D, WANG YT, HARTOULAROS GC, WOO JM, MOWERY CT, NISONOFF HM, LEE DS, SUN Y, LEE J, MEHDIZADEH S, CANTLON J, SHIFRUT E, NGYUEN DN, ROTH TL, SONG YS, MARSON A, CHOW ED, YE CJ. XYZeq: spatially resolved single-cell RNA sequencing reveals expression heterogeneity in the tumor microenvironment[J]. *Science Advances*, 2021, 7(17): eabg4755.
- [49] CHO C, XI JY, SI YC, PARK S, HSU J, KIM M, JUN G, KANG HM, LEE JH. Microscopic examination of spatial transcriptome using Seq-Scope[J]. *Cell*, 2021, 184(13): 3559-3572.e22.
- [50] SRIVATSAN SR, REGIER MC, BARKAN E, FRANKS JM, PACKER JS, GROSJEAN P, DURAN M, SAXTON S, LADD JJ, SPIELMANN M, LOIS C, LAMPE PD, SHENDURE J, STEVENS KR, TRAPNELL C. Embryo-scale, single-cell spatial transcriptomics[J]. *Science*, 2021, 373(6550): 111-117.
- [51] CHEN A, LIAO S, CHENG MN, MA KL, WU L, LAI YW, QIU XJ, YANG J, XU JS, HAO SJ, WANG X, LU HF, CHEN X, LIU X, HUANG X, LI Z, HONG Y, JIANG YJ, PENG J, LIU S, et al. Spatiotemporal transcriptomic atlas of mouse organogenesis using DNA nanoball-patterned arrays[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1777-1792.e21.
- [52] FAN YH, ANDRUSIVOVÁ Ž, WU YM, CHAI C, LARSSON L, HE MX, LUO LQ, LUNDEBERG J, WANG B. Expansion spatial transcriptomics[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(8): 1179-1182.
- [53] ELHANANI O, BEN-URI R, KEREN L. Spatial profiling technologies illuminate the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 404-420.
- [54] WANG YG, SONG B, WANG SD, CHEN MY, XIE Y, XIAO GH, WANG L, WANG T. Sprod for de-noising spatially resolved transcriptomics data based on position and image information[J]. *Nature Methods*, 2022, 19(8): 950-958.
- [55] GIACOMELLO S, SALMÉN F, TEREBIENIEC BK, VICKOVIC S, NAVARRO JF, ALEXEYENKO A, REIMEGÅRD J, MCKEE LS, MANNAPPERUMA C, BULONE V, STÄHL PL, SUNDSTRÖM JF, STREET NR, LUNDEBERG J. Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17061.
- [56] MAYNARD KR, COLLADO-TORRES L, WEBER LM, UYTINGCO C, BARRY BK, WILLIAMS SR, CATALINI II, TRAN MN, BESICH Z, TIPPANI M, CHEW J, YIN YF, KLEINMAN JE, HYDE TM, RAO N, HICKS SC, MARTINOWICH K, JAFFE AE. Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex[J]. *Nature Neuroscience*, 2021, 24(3): 425-436.
- [57] YU XL, LIU ZX, SUN XW. Single-cell and spatial

- multi-omics in the plant sciences: technical advances, applications, and perspectives[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100508.
- [58] MARTINEZ CC, LI SY, WOODHOUSE MR, SUGIMOTO K, SINHA NR. Spatial transcriptional signatures define margin morphogenesis along the proximal-distal and medio-lateral axes in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves[J]. *The Plant Cell*, 2021, 33(1): 44-65.
- [59] GIOLAI M, VERWEIJ W, LISTER A, HEAVENS D, MACAULAY I, CLARK MD. Spatially resolved transcriptomics reveals plant host responses to pathogens[J]. *Plant Methods*, 2019, 15(1): 114.
- [60] XIA KK, SUN HX, LI J, LI JM, ZHAO Y, CHEN LC, QIN C, CHEN RY, CHEN ZY, LIU GY, YIN RL, MU BB, WANG XJ, XU MY, LI XY, YUAN PS, QIAO YX, HAO SJ, WANG J, XIE Q, et al. The single-cell stereo-seq reveals region-specific cell subtypes and transcriptome profiling in *Arabidopsis* leaves[J]. *Developmental Cell*, 2022, 57(10): 1299-1310.e4.
- [61] LIU YY, LI CH, HAN Y, LI RC, CUI F, ZHANG H, SU XS, LIU XW, XU GX, WAN SB, LI GW. Spatial transcriptome analysis on peanut tissues shed light on cell heterogeneity of the peg[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(9): 1648-1650.
- [62] LIU C, LENG J, LI YL, GE TT, LI JL, CHEN YM, GUO CC, QI J. A spatiotemporal atlas of organogenesis in the development of orchid flowers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(17): 9724-9737.
- [63] LIU ZJ, KONG XY, LONG YP, LIU SR, ZHANG H, JIA JB, CUI WH, ZHANG ZM, SONG XW, QIU LJ, ZHAI JX, YAN Z. Integrated single-nucleus and spatial transcriptomics captures transitional states in soybean nodule maturation[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(4): 515-524.
- [64] DU J, WANG YC, CHEN WF, XU ML, ZHOU RH, SHOU HX, CHEN J. High-resolution anatomical and spatial transcriptome analyses reveal two types of meristematic cell pools within the secondary vascular tissue of poplar stem[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(5): 809-828.
- [65] SONG XH, GUO PR, XIA KK, WANG ML, LIU YQ, CHEN LC, ZHANG JH, XU MY, LIU NX, YUE ZL, XU X, GU Y, LI G, LIU M, FANG L, DENG XW, LI BS. Spatial transcriptomics reveals light-induced chlorenchyma cells involved in promoting shoot regeneration in tomato callus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(38): e2310163120.
- [66] LI RH, WANG ZF, WANG JW, LI LG. Combining single-cell RNA sequencing with spatial transcriptome analysis reveals dynamic molecular maps of cambium differentiation in the primary and secondary growth of trees[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(5): 100665.
- [67] EDWARDS EJ. Evolutionary trajectories, accessibility and other metaphors: the case of C₄ and CAM photosynthesis[J]. *New Phytologist*, 2019, 223(4): 1742-1755.
- [68] KOCH K, KENNEDY RA. Characteristics of crassulacean acid metabolism in the succulent C₄ dicot, *Portulaca oleracea* L[J]. *Plant Physiology*, 1980, 65(2): 193-197.
- [69] MORENO-VILLENA JJ, ZHOU HR, GILMAN IS, TAUSTA SL, CHEUNG CYM, EDWARDS EJ. Spatial resolution of an integrated C₄+CAM photosynthetic metabolism[J]. *Science Advances*, 2022, 8(31): eabn2349.
- [70] RODRIGUEZ PA, ROTHBALLER M, CHOWDHURY SP, NUSSBAUMER T, GUTJAHR C, FALTER-BRAUN P. Systems biology of plant-microbiome interactions[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(6): 804-821.
- [71] 张睿, 王秀娟, 高伟. 植物激素对次生代谢产物的调控研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(17): 4205-4210. ZHANG R, WANG XJ, GAO W. Regulation mechanism of plant hormones on secondary metabolites[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2020, 45(17): 4205-4210 (in Chinese).
- [72] SUN CL, LI TG, SONG XW, HUANG LJ, ZANG QC, XU J, BI N, JIAO GG, HAO YZ, CHEN YH, ZHANG RP, LUO ZG, LI X, WANG LH, WANG ZH, SONG YM, HE JM, ABLIZ Z. Spatially resolved metabolomics to discover tumor-associated metabolic alterations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(1): 52-57.
- [73] NAKABAYASHI R, HASHIMOTO K, MORI T, TOYOOKA K, SUDO H, SAITO K. Spatial metabolomics using imaging mass spectrometry to identify the localization of asparagine A in *Asparagus officinalis*[J]. *Plant Biotechnology*, 2021, 38(3): 311-315.
- [74] ZHOU CZ, TIAN CY, ZHU C, LAI ZX, LIN YL, GUO YQ. Hidden players in the regulation of secondary metabolism in tea plant: focus on non-coding RNAs[J]. *Beverage Plant Research*, 2022, 2(1): 1-12.

- [75] ZHU C, ZHANG ST, FU HF, ZHOU CZ, CHEN L, LI XZ, LIN YL, LAI ZX, GUO YQ. Transcriptome and phytochemical analyses provide new insights into long non-coding RNAs modulating characteristic secondary metabolites of oolong tea (*Camellia sinensis*) in solar-withering[J]. *Frontiers in Plant Science*. 2019, 10:1638.
- [76] ZHU C, ZHANG ST, ZHOU CZ, CHEN L, ZARIPOV T, ZHAN DM, WENG JJ, LIN YL, LAI ZX, GUO YQ. Integrated transcriptome, microRNA, and phytochemical analyses reveal roles of phytohormone signal transduction and ABC transporters in flavor formation of oolong tea (*Camellia sinensis*) during solar withering[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(45): 12749-12767.
- [77] ZHU C, ZHANG ST, ZHOU CZ, XIE SY, CHEN GW, TIAN CY, XU K, LIN YL, LAI ZX, GUO YQ. Genome-wide investigation of N6-methyladenosine regulatory genes and their roles in tea (*Camellia sinensis*) leaves during withering process[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 702303.
- [78] ZHU C, ZHANG ST, ZHOU CZ, CHEN L, FU HF, LI XZ, LIN YL, LAI ZX, GUO YQ. Genome-wide investigation and transcriptional analysis of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families in tea plant (*Camellia sinensis*) under abiotic stress and withering processing[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8432.
- [79] 范煜, 何桢锐, 黄晓彤, 杨媚, 周而勋. 基于多组学的真菌病毒与寄主真菌互作的研究进展[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(4): 399-404, 440.
FAN Y, HE ZR, HUANG XT, YANG M, ZHOU EX. Advances in the interaction between mycoviruses and host fungi based on multi-omics[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2023, 14(4): 399-404, 440 (in Chinese).
- [80] LIU CF, NIU GT, LI XW, ZHANG HC, CHEN HW, HOU DX, LAN P, HONG Z. Comparative label-free quantitative proteomics analysis reveals the essential roles of N-glycans in salt tolerance by modulating protein abundance in *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 646425.
- [81] BAKKU RK, GUPTA R, MIN CW, KIM ST, TAKAHASHI G, SHIBATO J, SHIODA S, TAKENOYA F, AGRAWAL GK, RAKWAL R. Unravelling the *Helianthus tuberosus* L. (Jerusalem Artichoke, Kiku-Imo) tuber proteome by label-free quantitative proteomics[J]. *Molecules*. 2022, 27(3): 1111.
- [82] ALVES M, DADALTO S, GONÇALVES A, de SOUZA G, BARROS V, FIETTO L. Transcription factor functional protein-protein interactions in plant defense responses[J]. *Proteomes*, 2014, 2(1): 85-106.
- [83] HOSSAIN Z, KOMATSU S. Potentiality of soybean proteomics in untying the mechanism of flood and drought stress tolerance[J]. *Proteomes*, 2014, 2(1): 107-127.
- [84] ZHU YD, LI H, BHATTI S, ZHOU SP, YANG Y, FISH T, THANNHAUSER TW. Development of a laser capture microscope-based single-cell-type proteomics tool for studying proteomes of individual cell layers of plant roots[J]. *Horticulture Research*, 2016, 3: 16026.
- [85] WANG HL, WANG YB, SANG T, LIN Z, LI RX, REN WW, SHEN X, ZHAO B, WANG X, ZHANG XB, ZHOU SQ, DAI SJ, HU HH, SONG CP, WANG PC. Cell type-specific proteomics uncovers a RAF15-SnRK_{2.6}/OST1 kinase cascade in guard cells[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(9): 2122-2137.

(本文责编 郝丽芳)