

综述

单细胞组学技术在植物生殖研究中的应用

普晨曦¹, 任育昕¹, 赵毓^{1,2,3}, 周志鹏^{1*}

(¹华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; ²华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; ³湖北洪山实验室, 武汉 430070)

摘要: 生殖是生物传递遗传信息的重要方式。解析植物生殖机制不仅对于理解植物个体繁衍和种群延续、遗传信息传递、细胞分化与发育等具有重要意义, 还为农业生产、作物改良等提供了重要的科学依据和实践指导。高等植物生殖细胞由于结构特殊、获取困难且数量少等原因, 不利于精细研究。近年来发展起来的单细胞组学技术是在单个细胞水平上进行基因组、转录组和表观组等多层次测序分析, 可以为理解植物发育过程中配子发育不同阶段的细胞异质性、细胞间、细胞与微环境间的相互作用等基本生物学问题提供更加精确、全面的方法。随着测序准确性和分辨率的不断提高, 这些技术必将为植物配子发育和精卵结合等关键问题的解析提供新途径和新思路。本文综述了单细胞组学技术在植物生殖研究中的应用与进展及其对推动植物生殖发育、作物遗传改良和种质创新的意义, 并探讨了未来研究面临的挑战。

关键词: 植物; 有性生殖; 单细胞技术; 高通量测序; 多组学

Application of single-cell omics techniques in plant reproductive research

PU Chenxi¹, REN Yuxin¹, ZHAO Yu^{1,2,3}, ZHOU Zhipeng^{1*}

(¹College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

²National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

³Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China)

Abstract: Reproduction is a vital process through which organisms transmit genetic information. Understanding plant reproductive mechanisms is essential not only for elucidating individual propagation, population sustainability, genetic inheritance, cellular differentiation and development but also for providing critical scientific insights and practical guidance for agricultural production and crop improvement. However, the unique structural features, isolation challenges, and limited availability of reproductive cells in higher plants have long hindered in-depth studies. Recent advancements in single-cell omics technologies, which enable multi-dimensional sequencing analyses of the genome, transcriptome, and epigenome at the single-cell level, have provided a more precise and comprehensive approach to investigate fundamental biological questions. These technologies facilitate the exploration of cellular heterogeneity during different stages of gametogenesis and the interactions between cells and their microenvironment during plant development. As

收稿日期: 2024-12-05

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(202410504024); 国家自然科学基金项目(32470359, 32270098); 华中农业大学教学改革研究项目(2024028)

第一作者: E-mail: pcx@webmail.hzau.edu.cn

*通信作者: E-mail: zhouzhipeng@mail.hzau.edu.cn

sequencing accuracy and resolution continue to improve, single-cell omics offer new perspectives and opportunities for unraveling key questions related to gamete development and fertilization. This review summarizes the applications and recent progress of single-cell omics technologies in plant reproductive research, and highlights their significance for advancing plant reproductive biology, crop genetic improvement, and germplasm innovation, discusses future research challenges.

Key Words: plants; sexual reproduction; single-cell techniques; high-throughput sequencing; multi-omics

被子植物的有性生殖是一个复杂且精细调控的发育过程,包括开花、传粉和受精等,涉及生殖细胞的发育、融合等关键步骤^[1]。研究表明,不同植物种类的生殖细胞发育过程存在差异,甚至同一植物不同发育阶段的生殖细胞也具有不同的特性和功能,这种复杂性和多样性增加了植物生殖研究的难度^[2,3]。其次,植物体内的生殖细胞处于特定的微环境中,包括细胞间的相互作用、信号分子的传递以及营养物质的供应等。一般在实验室条件下很难完全模拟上述微环境,导致体外培养生殖细胞容易死亡或失去原有的特性^[4,5]。更为关键的是,高等植物的生殖细胞深藏于孢子体组织中,不仅结构特殊、数量少且体积微小,获取十分困难。在植物生殖早期研究中,研究人员利用遗传学、细胞生物学和离体培养等方法,探讨了减数分裂、配子发育以及精卵结合等关键过程。随着研究手段的逐步革新,尤其是测序技术兴起的迅速发展,借助二代测序技术,人们从表观遗传和基因表达等层面对植物生殖过程进行了更加细致的解析,逐步描绘出较为完整的植物生殖图景^[1-6]。

单细胞组学技术是近年来兴起的一项能够精确解析单个细胞生物学特性的技术。借助单细胞组学技术,人们已在单细胞水平上实现了对动植物发育过程的基因组、转录组及表观组等的多维度解析^[7,8]。自2009年Tang等^[9]首次利用单细胞RNA测序(single-cell RNA-seq, scRNA-seq)分析小鼠胚胎干细胞的转录组以来,单细胞技术在动物发育中的应用不断拓展和深化。目前,单细胞多组学技术已被广泛应用于动物生殖发育过程的研究^[10]。2017年,Guo等^[11]开发并利用单细胞多组学综合测序技术(single-cell multi-omics sequencing, scCOOL-seq)实现了同一个单细胞在染色质状态、核小体定位、DNA甲基化、基因组拷贝数变异和染

色体倍性5个层面的基因组和表观基因组特征的分析,为哺乳动物早期胚胎细胞的发育以及复杂癌症等疾病研究提供了更全面有效的解决方案。2024年,Liu等^[12]开发了首个生殖相关的单细胞多组学数据平台——SMARTdb,收录了6个物种、覆盖125个发育阶段的200万个单细胞多组学数据,为解码人类生殖医学的分子特征提供了强有力的工具。

与传统技术相比,单细胞组学技术在微量化和精细化方面具有显著优势。然而,与动物细胞相比,植物细胞由于结构的特殊性(如细胞壁的存在、不同植物种类细胞内容物的差异以及生殖细胞结构的复杂性)和操作上的困难(包括缺乏标准化流程以及单细胞建库难度大等),使得单细胞组学在植物生殖研究领域仍处于起步阶段。尽管如此,利用单细胞组学技术,科研人员也取得了许多进展。例如,Zhai等^[13]阐释了愈伤组织中细胞多能性的形成机制;Wang等^[14]解析了苔类植物无性繁殖中成熟与衰老过程的时空轨迹;Ke等^[15]阐明了水牛草孤雌生殖过程中卵细胞的特异表达基因及其调控网络。更为重要的是,科研人员还在玉米、大麦、水稻和拟南芥等6个物种的生殖细胞研究中进行了探索,取得了一系列创新性成果(表1)。这些成果不仅加深了对植物生殖机制的理解,也为作物遗传改良和新的种质创新提供了关键的理论基础。本文重点综述了近年来单细胞组学技术在植物有性生殖过程研究中的进展,并讨论了其在该领域的前景与挑战。

1 单细胞全基因组测序技术在植物生殖研究中的应用

单细胞全基因组测序技术(single-cell whole-genome sequencing, scWGS)可以在单细胞分辨率下检测全基因组单核苷酸多态性(single nucleotide

表 1 单细胞组学技术在植物生殖研究中的应用

单细胞组学技术	应用物种	代表成果	参考文献
单细胞全基因组测序(scWGS)	玉米(<i>Zea mays</i>)	构建玉米小孢子高分辨率基因重组图谱	[16]
	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)	明确双单倍体群体中的杂种偏分离由个体水平的选择作用所致	[17,18]
	杏(<i>Prunus armeniaca</i>)	提出“Gamete binning”方法完成了杏染色体水平单倍型基因组组装	[19]
	梨(<i>Pyrus spp.</i>)	分离高度杂合的异交植物单倍体基因组	[20]
单细胞甲基化组测序(scBRIF-seq)	玉米(<i>Zea mays</i>)	改良了scBS-seq技术,发现植物四分体之间可能存在非同时的甲基化重编程现象	[21]
单细胞三维基因组测序(scHi-C)	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	揭示水稻配子和合子染色质结构动态变化,解析基因表达与三维染色质结构的关系	[22]
	玉米(<i>Zea mays</i>)	描述减数分裂中的基因表达剧烈变化,提出发育过程转换的概念	[23]
	拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	揭示拟南芥雄配子表观遗传重编程的特征和机制;解析拟南芥雌配子体倍性依赖性;解析拟南芥母源合子转变过程的调控机制	[24-27]
	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	揭示水稻雄配子发生DNA甲基化动态重编程机制	[28]
单细胞转录组测序(scRNA-seq)		绘制水稻雌蕊单细胞转录组图谱	[29]

polymorphism, SNP)和拷贝数变异(copy-number variant, CNV)^[8,30,31]。传统方法如DNA微阵列(DNA microarrays)和比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH)仅能检测预定义区域或较大规模的变异,分辨率有限,难以解析单细胞间的异质性。而scWGS克服了这些技术在分辨率、全面性和单细胞检测能力上的限制,成为研究细胞群体差异和细胞进化关系的关键工具^[32]。但由于在构建单细胞基因组测序文库的过程中,单个细胞提供的基因组模版量极少,如何通过扩增获得构建文库所需的DNA成为scWGS的主要技术挑战。过去十多年里,研究人员开发了多种技术以解决这一问题,如简并寡核苷酸引物PCR扩增技术(degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR)、多重置换扩增技术(multiple displacement amplification, MDA)以及基于第三代测序技术的SMOOTH-seq(single-molecule real-time sequencing of long fragments amplified through transposon insertion)等^[30,33,34]。

减数分裂通过染色体重组形成新的亲本单倍型,从而产生可遗传的变异,使单个配子之间具有遗传差异。研究人员通过对单个配子的分离及其基因组的SNP分析,可以鉴定植物减数分裂中的重组事件。Li等^[16]将scWGS应用于植物研究,通过对玉米单个四分体中分离的4个小孢子进行基因组测序,生成了高分辨率的基因重组图谱,表明同源重组更倾向于发生在基因区域。该研究证实了

植物中存在较强的重组负干涉以及复杂的染色单体干涉现象,以及环境因素对重组频率具有显著影响。该技术的应用不仅是对玉米重组规律的新认识,也为玉米的遗传育种提供了有价值的信息。同样,Dreissig等^[17,18]利用scWGS技术对大麦花粉基因分型进行研究,结果表明,双单倍体群体中的杂种偏分离并非由减数分裂引起,而是由个体水平的选择作用所致。这些研究结果表明,通过改变环境条件来获得更高的重组频率,可以显著增加遗传变异,从而为育种计划提供更多性状变异的选择。

在减数分裂过程中,CNV会导致非整倍体配子的形成,造成胚胎发育缺陷^[30]。CNV的极端形式为基因存在/缺失变异(presence/absence variation, PAV)。尽管CNV和PAV对植物的遗传多样性和基因组进化具有重要影响,但是利用常规方法在异交植物细胞群体里识别中低频率变异的难度较大,导致人们对此的认知仍有限^[35,36]。scWGS技术的应用为研究CNV和PAV提供了机会。2017年,Li等^[37]通过对玉米单个配子进行全基因组测序,精确描述了基因组重排和非整倍体现象,发现普通玉米品系中约9%的花粉携带非整倍体精细胞。这一比例远高于人类精细胞非整倍体的比例^[38],暗示动植物的CNV和PAV模式可能存在较大差异。随着单配子体scWGS技术的进一步发展,未来有望揭示这一差异形成的分子机制。

此外,scWGS也被用于完善异交作物参考基

基因组和挖掘农艺性状相关基因。Campoy等^[19]提出了针对异交作物基因组组装的“Gamete binning”方法,利用445个杏树成熟花粉细胞核的scWGS数据,成功组装了染色体水平的单倍型基因组。通过对12个单花粉细胞的测序,Shi等^[20]成功地将基因组高度杂合的异交被子植物——梨,分离成A和B两个单倍型基因组,并通过比较这些单倍型的差异,识别出了2079个与含糖量、次生代谢物合成等相关的单倍型特异性基因。综上,scWGS技术为解析杂种优势和亚基因组优势提供了全新的研究手段,同时也为在具有高度异质性基因组的植物中研究农艺性状相关的基因开辟了新途径。

2 单细胞表观基因组测序技术在植物生殖研究中的应用

尽管基因组基本相同,不同细胞类型之间的决定基因表达的染色质状态却存在显著差异,这在一定程度上是因为受到基因组中DNA和组蛋白修饰的影响^[39]。而单细胞表观组学则聚焦于单个细胞中这些修饰相关的研究,而非整个细胞群体,因此可以揭示细胞异质性并为表观调控机制提供新的视角^[40]。

2.1 单细胞甲基化组测序技术

DNA上的5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)是目前研究最为深入的DNA修饰之一^[41],在基因表达调控和基因组稳定性维持中发挥着关键作用。依靠重亚硫酸盐甲基化组测序(bisulfite sequencing, BS-Seq),研究人员揭示了植物生殖细胞发育过程中全基因组DNA甲基化会发生动态重塑^[42-45]。但是,这种重塑过程中的细胞异质性及其精细调控机制在很大程度上仍然未知。单细胞甲基化组测序技术的出现,为深入解析植物生殖细胞特异性重编程机制提供了全新的研究契机^[30,46]。

虽然传统重亚硫酸盐测序技术已能在单细胞层面实现特定DNA位点的甲基化检测^[47],但要系统揭示全基因组范围的甲基化特征图谱,仍需依托单细胞技术的发展。在DNA甲基化文库构建过程中,重亚硫酸盐转化方法条件较为苛刻,容易引起DNA的降解,进而导致文库质量下降,影响有效数据的产出。为解决这一问题,人们对DNA甲基化测序技术进行了改良,从而实现了单细胞甲

基化测序。Guo等^[48]将亚硫酸氢盐转化前的所有步骤整合至单管反应中,减少了DNA纯化过程中的损耗,进而降低了约40%的甲基化位点损失,从而开发出单细胞亚硫酸氢盐还原测序(single cell reduced representation bisulfite sequencing, scRRBS)。紧接着,Smallwood等^[49]利用PBAT(post-bisulfite adaptor tagging)替代传统重亚硫酸盐转化法,减少了DNA损失,实现了单细胞全基因组亚硫酸氢盐测序(single-cell genome-wide bisulfite sequencing, scWGBS)。

2019年,Li等^[21]开发了单细胞亚硫酸氢盐转换随机集成片段测序(single cell bisulfite-converted randomly integrated fragments sequencing, scBRIF-seq),首次在植物中实现了单细胞甲基化测序。与之前的单细胞甲基化测序方法相比,scBRIF-seq对DNA单链连接、MDA扩增及基于Tn5转座酶的建库等步骤进行了优化,使其可以在高甲基化区域生成分布更均匀的读段。该研究通过对玉米单个小孢子进行scBRIF-seq分析,发现了同一四分体内小孢子的DNA甲基化状态相似,但不同四分体之间的DNA甲基化状态却存在显著差异的现象,表明植物四分体之间甲基化重编程的发生可能具有时间异质性。

植物配子发育伴随着剧烈的表观重编程过程,使得配子的每个发育阶段都具有独特的表观修饰特征^[50]。单细胞甲基化组测序技术的发展与应用,为深入解析植物生殖发育过程中DNA甲基化动态变化及DNA甲基化的跨代传递规律等重要科学问题提供了全新的研究手段。

2.2 单细胞组蛋白修饰组测序技术

组蛋白N端的氨基酸会发生多种翻译后修饰,这些修饰在调控基因表达过程中发挥着重要作用^[39]。2021年,scCUT&Tag(single-cell CUT&Tag)技术在动物中被应用于鉴定全基因组范围内的组蛋白修饰模式和转录因子结合谱^[51,52]。随后,Ouyang等^[53]在水稻幼苗中使用snCUT&Tag(single nucleus CUT&Tag)结合细胞核分离技术和基于微流控的单细胞标记技术(10x single cell assay for transposase accessible chromatin, 10x scATAC),发现这些技术的联合使用可以用于单细胞表观修饰异质性的剖析和细胞类型特异性增强子-启动子相

相互作用的预测。snCUT&Tag技术有望帮助发现调控重要农艺性状的关键调控元件, 为作物育种中基因表达优化及表观遗传编辑提供理论依据和技术支持。

目前, 还未见scCUT&Tag技术在植物配子发育研究中的应用。该技术有望揭示植物胚胎早期发育过程中组蛋白修饰的动态变化, 并回答组蛋白修饰在植物母源合子转变及合子基因组激活过程中的动态变化和调控机制以及精细胞是否确实存在广泛的染色质二价性等关键问题^[24]。

2.3 单细胞染色质可及性检测测序技术

在真核生物中, 核小体的滑动与重塑影响着染色质特定区域的可及性, 进而影响DNA与转录因子等调控元件之间的相互作用^[54]。染色质的可及性在基因表达调控、染色质状态转换以及细胞功能调节中起着至关重要的作用。目前, ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing)是最常用的在单细胞水平检测染色质可及性的方法^[8]。2022年, Wu等^[55]利用scATAC-seq(single-cell ATAC-seq)揭示了人类精子发生中细胞类型特异性转录调控和独特的染色质可及性。在植物中, scATAC-seq技术已被应用于玉米、拟南芥的根尖和幼苗等组织细胞的染色质可及性分析^[56-58]。然而, 由于其分辨率不足, 难以准确区分数量较少的细胞类型, 这限制了其在植物生殖研究中的应用。植物精卵融合与合子发育过程中, 染色质可及性的动态变化仍是未解之谜。未来通过优化单细胞分离技术和提升数据整合算法的精度, 有望显著提高scATAC-seq的解析深度, 从而更深入地揭示植物生殖过程中的关键分子机制。

2.4 单细胞三维基因组测序技术

基因组的三维结构是由染色质相互作用、转录动力学和表观修饰共同塑造的。Hi-C(high-through chromosome conformation capture)、Dip-C(diploid chromatin conformation capture)等技术通过捕获染色质相互作用, 能够揭示基因组的三维结构^[8,59]。Zhou等^[22]在植物中开发并应用了scHi-C技术, 以分析水稻配子、合子和叶肉细胞的染色质空间结构, 揭示了染色质三维结构的动态变化与合子基因组激活之间的内在联系, 为理解植物三维基因组结

构以及受精前后染色质结构变化与基因表达的关系奠定了重要基础, 也为揭示水稻杂种优势形成机制提供了新的视角。已有研究表明, 植物生殖配子发育过程中的染色质结构会发生动态变化, 但这些变化与染色质三维结构之间的相关性及其调控机制仍未完全明确^[60]。scHi-C技术的进一步优化和深入应用将为这些问题的解决提供技术支撑。

3 单细胞转录组测序技术在植物生殖研究中的应用

转录组测序技术在植物生殖研究中发挥着核心作用。在早期, 研究人员主要通过手动分选的方式, 获取雄配子发育各阶段的转录组数据, 初步解析了雄配子发育各阶段的基因表达特征以及减数分裂和授粉等重要过程的基因调控机制^[61-63]。然而, 这些研究主要基于群体水平数据, 无法捕捉单个细胞基因表达的异质性和动态变化, 也难以解析不同细胞类型在发育中的独特功能, 更不适用于卵细胞、合子等数量稀少的细胞。相比之下, 单细胞转录组技术能够在单个细胞分辨率下揭示细胞分化和发育过程中的基因调控网络, 更精准地重建生殖细胞发育轨迹和异质性^[64,65]。近五年来, Nelms等^[23]利用scRNA-seq技术描述了玉米减数分裂过程中存在基因表达的剧烈变化, 并提出“发育过程转换”的概念, 为研究植物生殖细胞的发育提供了新方法。在拟南芥中, Zhao等^[26,27]通过scRNA-seq技术, 先后在拟南芥中获得了高质量的卵细胞、合子及早期胚胎不同细胞谱系的转录组数据, 精准描绘了拟南芥早期发育中母源到合子转变(maternal-to-zygotic transition, MZT)的动态过程, 并深入解析了父母本基因组在合子转录调控中的阶段性贡献和功能差异。Song等^[25]利用scRNA-seq揭示了拟南芥二倍体与四倍体雌配子体的转录组差异。在水稻中, Li等^[29]利用单细胞核转录组测序技术(single-nucleus RNA-seq, snRNA-seq)绘制了水稻雌蕊的单细胞转录组图谱, 并鉴定了水稻雌蕊不同细胞类型的标记。

在植物生殖过程的研究中, scRNA-seq常与其他组学技术进行联合分析揭示生殖细胞基因表达的差异及其调控机制。有研究利用ChIP-seq、ATAC-seq和scRNA-seq等多组学技术揭示了植物生

殖细胞发育和成熟过程中组蛋白修饰H3K27me3和H3K4me3的重编程特征和机制,发现亲本表观修饰的局部而非整体擦除,足以确保子代植物的正常发育及其对环境信号的响应^[24]。2024年,scRNA-seq结合BS-seq技术揭示了水稻雄配子发生过程中DNA甲基化的动态重编程现象^[28],进一步明确了CHG甲基化重塑在雄配子发生与受精中的关键作用。这些研究显著深化了人们对植物表观遗传信息在代际遗传与重置机制中的认识。随着各种单细胞测序技术的不断完善,这些技术的联合分析将使全面解析植物生殖发育过程的细胞特性及作物改良相关技术的创新成为可能。

值得注意的是,选择合适的样品制备方法和文库构建策略对于单细胞转录组研究的成功与数据质量至关重要。不同的测序技术各具优势和局限性,需要根据研究目标、样本特性进行综合考虑(表2)^[66-74]。

4 单细胞蛋白组测序技术在植物生殖研究中的应用

蛋白质组信息与细胞的功能和状态直接相关。单细胞蛋白质组测序技术能够在单细胞水平上直接获取蛋白质的组成和定量数据,因此在基因表达调控等研究中具有巨大的应用价值^[8]。在当前的植物生殖研究中,通常根据转录组数据来推测单细胞中的蛋白质组丰度。然而,由于翻译调控和蛋白质降解等因素,转录组数据与细胞内实际的蛋白质丰度存在较大差异^[75]。

2007年前后,人们利用双向凝胶电泳分析了拟南芥、水稻、玉米和番茄花粉粒的单类细胞的蛋白质组,但这种方法灵敏度低、样本需求量大,与真正意义上的单细胞蛋白质组学尚有较大差

距^[76-78]。更为重要的是,由于植物次生代谢物的干扰以及对植物细胞表面蛋白研究的不足,使得SCoPE-MS(single-cell proteomics by mass spectrometry)、SCoPE2(single-cell proteomics)和基于寡核苷酸偶联抗体的CITE-seq(cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing)等质谱技术在植物单细胞蛋白质组学中的应用面临诸多挑战和限制^[79-81]。

2024年,Fulcher等^[75]提出了适用于植物细胞的单细胞蛋白质组学工作流程。该方法结合了胶带夹层原生体制备、压电细胞分选(piezoelectric cell sorting, cellenONE)、nanoPOTS(nanodroplet processing in one pot for trace samples)的样品制备流程以及基于高场非对称离子迁移谱(high field asymmetric waveform ion mobility spectrometry, FAIMS)的质谱数据采集,对拟南芥单个叶肉细胞的原生质体进行无标记单细胞蛋白质组学分析,高精度定量了超过3 000种蛋白质,并揭示出干旱胁迫导致的叶肉细胞蛋白质丰度变化。该研究为后续植物单细胞蛋白质组学在生殖过程中的研究奠定了基础。可以预见,单细胞蛋白质组学的应用将为揭示生殖细胞发育及精卵结合的调控机制提供更直接且精细的证据,同时,也将为寻找植物配子传递到合子中的父母本效应因子提供新的研究途径^[82]。这一技术的突破性进展不仅有望深化对植物生殖过程的理解,还将为作物育种研究提供强有力的工具。

5 单细胞组学技术面临的挑战与展望

单细胞组学技术在识别细胞间异质性、解析高分辨率基因表达以及构建转录因子调控网络方面具有显著优势。近几年,单细胞组学技术在植物

表2 单细胞组学转录组样品制备及文库构建方法比较

	技术基础	代表技术	技术优势	局限性	适用范围	参考文献
样品制备方法	单细胞	scRNA-seq	可捕获细胞内全部转录组信息	对细胞活性要求高,分离过程中会产生数据偏倚	研究活细胞的转录组动态	[23-28,66-71]
	单核	snRNA-seq	可使用冷冻样本,能有效减少细胞分离过程造成的数据偏倚	数据覆盖范围窄,无法捕获细胞质转录本	处理冷冻样本或细胞分离困难的样本	[29,66-71]
文库构建策略	依赖液滴	10x Genomics、Drop-seq	通量高,可检测稀有细胞	对细胞起始量要求高	解析雄性生殖细胞发育轨迹或生殖组织转录组动态	[29,72-74]
	依赖孔板	Smart-seq2/3、CEL-seq	覆盖全长转录组,检测低丰度基因能力强	通量较低	针对数量稀少细胞或需要精细解析调控机制的研究	[23-28,72-74]

生殖研究中得到飞速发展(图1), 但仍面临诸多挑战。

首先, 生殖细胞的分离是关键。除精细胞已有相对成熟的分离方法外^[83,84], 卵细胞和合子等细胞不仅数量稀少, 而且在绝大多数物种中仅能通过形态特征进行显微操作手动分选, 增加了操作难度和潜在偏差^[16,22-25,28,37,85,86]。其次, 单细胞样品的制备也是一大难点。植物细胞壁的存在增加了细胞分离与纯化的难度, 并且生殖组织中果胶等代谢物的富集也导致植物体细胞原生体制备技术不适用于生殖细胞^[29,87]。同时, 大多数单细胞技术对细胞活性的要求较高, 在生殖细胞分离过程中所需的酶解或机械操作容易损伤细胞, 产生应激反应。因此, 对于只需获取细胞核内信息的组学研究(如ATAC-seq、CUT&Tag等), 适用于冷冻样本的单细胞核测序是一种更佳选择。值得注意的是, 不同植物的配子体内容物差异也会影响单细胞技术的建库效率^[71]。因此, 开发适用于不同植物的高效且标准化的生殖细胞分选与制备流程是推动单细胞组学技术广泛应用的关键。

scATAC-seq、scCUT&Tag等技术在动物生殖研究中的应用成功揭示了动物精细胞发生过程中

表观修饰的变化轨迹及表观遗传调控机制, 为理解精子发生的分子机制提供了全新视角^[55,88,89]。同时, 采用单细胞翻译组、蛋白组、脂质组等技术的研究也发现, 动物卵母细胞成熟和合子基因组激活时会经历翻译组、蛋白组及代谢组的多重动态变化与重塑^[90-92]。相较于动物中的此类技术, 单细胞组学技术在植物, 尤其是植物生殖领域的研究仍显不足。其一, 与动物高度简化的配子体不同, 植物配子体由多个不同的生殖细胞组成, 这些细胞在发育过程中经历了不同的发育轨迹, 具有截然不同的生物学功能与发育特点。标准化识别并利用单细胞组学技术解析植物配子发育过程中细胞命运变化是该领域的重要研究方向。其二, 现有的植物单细胞组学技术尚未达到动物研究中的技术水平。除了植物细胞结构的特殊性和参考基因组的数量和完整性相对不足外, 为了获得足够的样本量并达到理想的分辨率, 部分单细胞组学技术如scHi-C等, 简化了传统组学技术中的部分步骤, 导致出现较大的背景噪音^[22]。因此, 进一步优化这些尚不成熟的技术并降低背景噪音是推动植物单细胞组学研究发展的关键步骤。尽管已有部分植物生殖的研究可以结合多个组学技术进

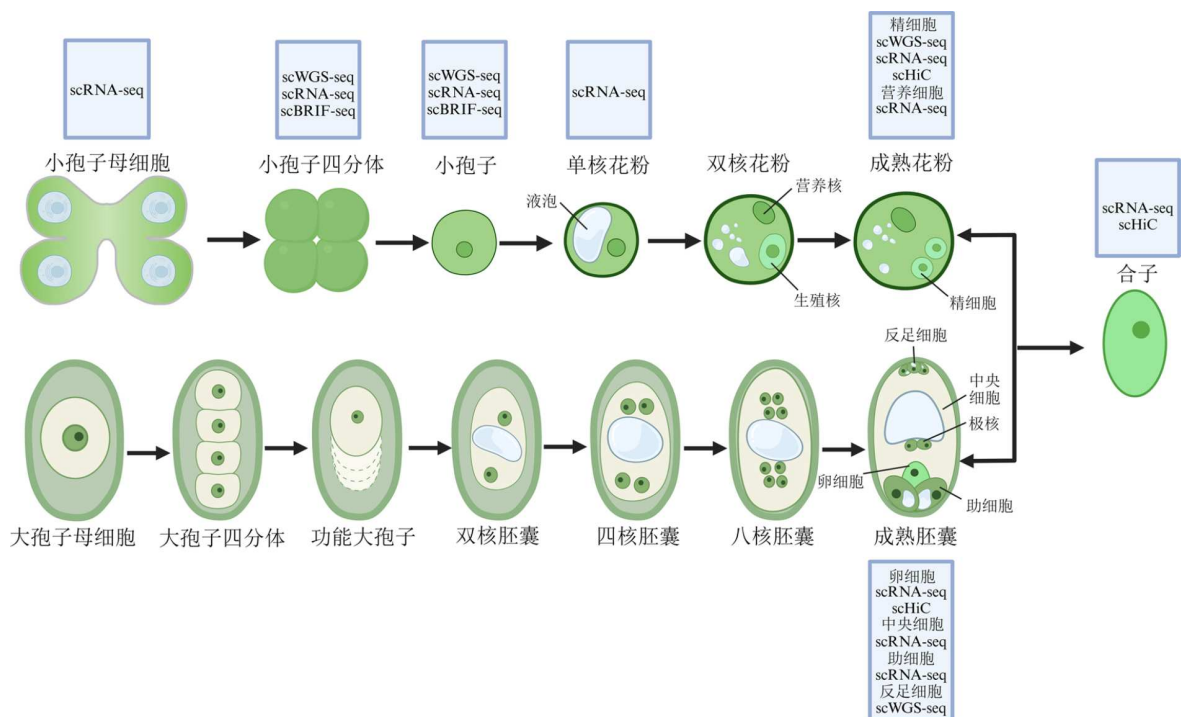


图1 在植物生殖发育各阶段运用的单细胞组学技术

行分析,但真正意义上的单细胞多组学综合测序技术,如scCOOL-seq尚未在植物生殖领域得到应用^[11],亟待未来进一步的探索和研究。其三,单细胞组学研究尚未覆盖植物生殖发育的所有细胞类型以及配子发育的各个阶段。随着技术的不断发展,预计未来将会开发出适用于更多植物物种的单细胞分离和测序技术,为植物生殖研究提供单细胞层面和异质性解析的新视角。

作者贡献声明:

普晨曦:设计论文框架,起草论文,绘制图表;

任育昕:相关文献收集,参与撰写文章;

赵毓:指导撰写文章,论文修改并定稿;

周志鹏:拟定写作思路,指导撰写文章并定稿。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] Taiz L, Zeiger, Möller IM, Murphy A, et al. Plant physiology and development (6th ed) [M]. Oxford: Oxford University Press, 2015
- [2] Sharma V, Clark AJ, Kawashima T. Insights into the molecular evolution of fertilization mechanism in land plants. *Plant Reprod*, 2021, 34(4): 353-364
- [3] Hisanaga T, Yamaoka S, Kawashima T, et al. Building new insights in plant gametogenesis from an evolutionary perspective. *Nat Plants*, 2019, 5(7): 663-669
- [4] Wei S, Ma L. Comprehensive insight into tapetum-mediated pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Cells*, 2023, 12(2): 247
- [5] 彭雄波, 赵鹏, 孙蒙祥. 武汉大学植物生殖研究的两个四十年. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(9): 1315-1325
- [6] 杨弘远. 序——植物生殖生物学的来龙去脉. *植物学通报*, 2007(3): 272-274
- [7] 张在宝, 赵紫薇, 张佩欣, 等. 单细胞测序技术在植物中的应用研究进展. *信阳师范学院学报(自然科学版)*, 2023, 36(2): 330-337
- [8] Mo Y, Jiao Y. Advances and applications of single-cell omics technologies in plant research. *Plant J*, 2022, 110(6): 1551-1563
- [9] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377-382
- [10] 高山凤, 肖轩, 张玲羽, 等. 单细胞测序技术在生殖研究中的应用. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(12): 2234-2243
- [11] Guo F, Li L, Li J, et al. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Res*, 2017, 27(8): 967-988
- [12] Liu Z, Yuan Z, Guo Y, et al. SMARTdb: an integrated database for exploring single-cell multi-omics data of reproductive medicine. *Genomics Proteomics Bioinf*, 2024, 22(3): qzae005
- [13] Zhai N, Xu L. Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration. *Nat Plants*, 2021, 7(11): 1453-1460
- [14] Wang L, Wan MC, Liao RY, et al. The maturation and aging trajectory of *Marchantia polymorpha* at single-cell resolution. *Dev Cell*, 2023, 58(15): 1429-1444.e6
- [15] Ke Y, Podio M, Conner J, et al. Single-cell transcriptome profiling of buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*) eggs unveils apomictic parthenogenesis signatures. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9880
- [16] Li X, Li L, Yan J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 6648
- [17] Dreissig S, Fuchs J, Cápál P, et al. Measuring meiotic crossovers via multi-locus genotyping of single pollen grains in barley. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137677
- [18] Dreissig S, Fuchs J, Himmelbach A, et al. Sequencing of single pollen nuclei reveals meiotic recombination events at megabase resolution and circumvents segregation distortion caused by postmeiotic processes. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1620
- [19] Campoy JA, Sun H, Goel M, et al. Gamete binning: chromosome-level and haplotype-resolved genome assembly enabled by high-throughput single-cell sequencing of gamete genomes. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 306
- [20] Shi D, Wu J, Tang H, et al. Single-pollen-cell sequencing for gamete-based phased diploid genome assembly in plants. *Genome Res*, 2019, 29(11): 1889-1899
- [21] Li X, Chen L, Zhang Q, et al. BRIF-Seq: bisulfite-converted randomly integrated fragments sequencing at the single-cell level. *Mol Plant*, 2019, 12(3): 438-446
- [22] Zhou S, Jiang W, Zhao Y, et al. Single-cell three-dimensional genome structures of rice gametes and unicellular zygotes. *Nat Plants*, 2019, 5(8): 795-800
- [23] Nelms B, Walbot V. Defining the developmental program leading to meiosis in maize. *Science*, 2019, 364(6435): 52-56
- [24] Zhu D, Wen Y, Yao W, et al. Distinct chromatin signatures in the *Arabidopsis* male gametophyte. *Nat Genet*, 2023, 55(4): 706-720
- [25] Song Q, Ando A, Jiang N, et al. Single-cell RNA-seq analysis reveals ploidy-dependent and cell-specific transcriptome changes in *Arabidopsis* female gametophytes. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 178

- [26] Zhao P, Zhou X, Shen K, et al. Two-Step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions. *Dev Cell*, 2019, 49(6): 882-893.e5
- [27] Zhao P, Zhou X, Zheng Y, et al. Equal parental contribution to the transcriptome is not equal control of embryogenesis. *Nat Plants*, 2020, 6(11): 1354-1364
- [28] Li X, Zhu B, Lu Y, et al. DNA methylation remodeling and the functional implication during male gametogenesis in rice. *Genome Biol*, 2024, 25(1): 84
- [29] Li C, Zhang S, Yan X, et al. Single-nucleus sequencing deciphers developmental trajectories in rice pistils. *Dev Cell*, 2023, 58(8): 694-708.e4
- [30] Luo C, Fernie AR, Yan J. Single-cell genomics and epigenomics: technologies and applications in plants. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(10): 1030-1040
- [31] Paolillo C, Londin E, Fortina P. Single-cell genomics. *Clin Chem*, 2019, 65(8): 972-985
- [32] Macaulay IC, Voet T, Maizels N. Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004126
- [33] Huang L, Ma F, Chapman A, et al. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2015, 16(1): 79-102
- [34] Fan X, Yang C, Li W, et al. SMOOTH-seq: single-cell genome sequencing of human cells on a third-generation sequencing platform. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 195
- [35] Beló A, Beatty MK, Hondred D, et al. Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization. *Theor Appl Genet*, 2010, 120(2): 355-367
- [36] Springer NM, Ying K, Fu Y, et al. Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content. *PLoS Genet*, 2009, 5(11): e1000734
- [37] Li X, Meng D, Chen S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 991
- [38] Lu S, Zong C, Fan W, et al. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science*, 2012, 338(6114): 1627-1630
- [39] 周超, 赵毓, 周少立, 等. 水稻表观基因组研究进展. *生命科学*, 2016, 28(10): 1138-1146
- [40] Carter B, Zhao K. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(4): 235-250
- [41] Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: in the right place at the right time. *Science*, 2018, 361(6409): 1336-1340
- [42] Hsieh PH, He S, Buttress T, et al. *Arabidopsis* male sexual lineage exhibits more robust maintenance of CG methylation than somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(52): 15132-15137
- [43] Long J, Walker J, She W, et al. Nurse cell-derived small RNAs define paternal epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Science*, 2021, 373(6550): eabh0556
- [44] Lu Y, Song Y, Liu L, et al. DNA methylation dynamics of sperm cell lineage development in tomato. *Plant J*, 2021, 105(3): 565-579
- [45] Zhou S, Li X, Liu Q, et al. DNA demethylases remodel DNA methylation in rice gametes and zygote and are required for reproduction. *Mol Plant*, 2021, 14(9): 1569-1583
- [46] Kawashima T, Berger F. Epigenetic reprogramming in plant sexual reproduction. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(9): 613-624
- [47] Xie H, Wang M, de Andrade A, et al. Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(10): 4099-4108
- [48] Guo H, Zhu P, Wu X, et al. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2126-2135
- [49] Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, et al. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*, 2014, 11(8): 817-820
- [50] Gehring M. Epigenetic dynamics during flowering plant reproduction: evidence for reprogramming? *New Phytol*, 2019, 224(1): 91-96
- [51] Bartosovic M, Kabbe M, Castelo-Branco G. Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(7): 825-835
- [52] Wu SJ, Furlan SN, Mihalas AB, et al. Single-cell CUT&Tag analysis of chromatin modifications in differentiation and tumor progression. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(7): 819-824
- [53] Ouyang W, Luan S, Xiang X, et al. Profiling plant histone modification at single-cell resolution using snCUT&Tag. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(3): 420-422
- [54] Klemm SL, Shipony Z, Greenleaf WJ. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(4): 207-220
- [55] Wu X, Lu M, Yun D, et al. Single-cell ATAC-Seq reveals cell type-specific transcriptional regulation and unique chromatin accessibility in human spermatogenesis. *Hum Mol Genet*, 2022, 31(3): 321-333
- [56] Farmer A, Thibivilliers S, Ryu KH, et al. Single-nucleus RNA and ATAC sequencing reveals the impact of chromatin accessibility on gene expression in *Arabidopsis*

- roots at the single-cell level. *Mol Plant*, 2021, 14(3): 372-383
- [57] Liu Q, Ma W, Chen R, et al. Multiome in the same cell reveals the impact of osmotic stress on *Arabidopsis* root tip development at single-cell level. *Adv Sci (Weinh)*, 2024: 2308384
- [58] Marand AP, Chen Z, Gallavotti A, et al. A cis-regulatory atlas in maize at single-cell resolution. *Cell*, 2021, 184(11): 3041-3055
- [59] 田昊, 杨梓健, 徐兴文, 等. 三维基因组染色质构象捕获及其衍生技术. *生物工程学报*, 2020, 36(10): 2040-2050
- [60] Baroux C, Autran D. Chromatin dynamics during cellular differentiation in the female reproductive lineage of flowering plants. *Plant J*, 2015, 83(1): 160-176
- [61] Rutley N, Twell D. A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod*, 2015, 28(2): 73-89
- [62] Yang H, Lu P, Wang Y, et al. The transcriptome landscape of *Arabidopsis* male meiocytes from high-throughput sequencing: the complexity and evolution of the meiotic process. *Plant J*, 2011, 65(4): 503-516
- [63] Wang Y, Zhang WZ, Song LF, et al. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1201-1211
- [64] Kolodziejczyk AA, Kim JK, Svensson V, et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol Plant*, 2015, 58(4): 610-620
- [65] Tang F, Lao K, Surani MA. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. *Nat Methods*, 2011, 8(S4): S6-S11
- [66] Denisenko E, Guo BB, Jones M, et al. Systematic assessment of tissue dissociation and storage biases in single-cell and single-nucleus RNA-seq workflows. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 1-25
- [67] Ding J, Adiconis X, Simmons SK, et al. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(6): 737-746
- [68] Sunaga-Franze DY, Muino JM, Braeuning C, et al. Single-nucleus RNA sequencing of plant tissues using a nanowell-based system. *Plant J*, 2021, 108(3): 859-869
- [69] Butto T, Mungikar K, Baumann P, et al. Nuclei on the rise: when nuclei-based methods meet next-generation sequencing. *Cells*, 2023, 12(7): 1051
- [70] Sun Y, Sun J, Lin C, et al. Single-cell transcriptomics applied in plants. *Cells*, 2024, 13(18): 1561
- [71] Yang MC, Wu ZC, Huang LL, et al. Systematic methods for isolating high purity nuclei from ten important plants for omics interrogation. *Cells*, 2022, 11(23): 3919
- [72] Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, et al. Comparative analysis of single-cell RNA sequencing methods. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 631-643
- [73] Gao C, Zhang M, Chen L. The Comparison of two single-cell sequencing platforms: BD rhapsody and 10x genomics chromium. *Curr Genomics*, 2020, 21(8): 602-609
- [74] Jovic D, Liang X, Zeng H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e694
- [75] Fulcher JM, Dawar P, Balasubramanian VK, et al. Single-cell proteomics of *Arabidopsis* leaf mesophyll identifies drought stress-related proteins. *bioRxiv*, 2024: 2024.2007.2001.601628
- [76] Dai S, Chen T, Chong K, et al. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *oryza sativa* pollen. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(2): 207-230
- [77] Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, et al. Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *J Exp Bot*, 2007, 58(13): 3525-3535
- [78] Zou J, Song L, Zhang W, et al. Comparative proteomic analysis of *Arabidopsis* mature pollen and germinated pollen. *JIPB*, 2009, 51(5): 438-455
- [79] Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods*, 2017, 14(9): 865-868
- [80] Budnik B, Levy E, Harmange G, et al. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 1-2
- [81] Petelski AA, Emmott E, Leduc A, et al. Multiplexed single-cell proteomics using SCoPE2. *Nat Protoc*, 2021, 16(12): 5398-5425
- [82] Cheng T, Liu Z, Li H, et al. Sperm-origin paternal effects on root stem cell niche differentiation. *Nature*, 2024, 634(8032): 220-227
- [83] Russell SD, Gou X, Wong CE, et al. Genomic profiling of rice sperm cell transcripts reveals conserved and distinct elements in the flowering plant male germ lineage. *New Phytol*, 2012, 195(3): 560-573
- [84] Santos MR, Bispo C, Becker JD. Isolation of *Arabidopsis* pollen, sperm cells, and vegetative nuclei by fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Methods Mol Biol*, 2017: 193-210
- [85] Luo C, Li X, Zhang Q, et al. Single gametophyte sequencing reveals that crossover events differ between sexes in maize. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 785
- [86] Washburn M, Alaniz-Fabián J, Scroggs T, et al. Single-cell RNA-seq of maize meiocytes and pollen grains. *Nat Protoc*, 2023, 18(11): 3512-3533

- [87] Hasegawa K, Kamada S, Takehara S, et al. Rice putative methyltransferase gene OsPMT16 is required for pistil development involving pectin modification. [Front Plant Sci](#), 2020, 11: 475
- [88] Suen HC, Luk ACS, Liao J. scATAC-Seq reveals heterogeneity associated with spermatogonial differentiation in cultured male germline stem cells. [Sci Rep](#), 2022, 12(1): 21482
- [89] Li Q, Guo Y, Wu Z, et al. scNanoSeq-CUT&Tag: a single-cell long-read CUT&Tag sequencing method for efficient chromatin modification profiling within individual cells. [Nat Methods](#), 2024, 21(11): 2044-2057
- [90] Guo Y, Cai L, Liu X, et al. Single-cell quantitative proteomic analysis of human oocyte maturation revealed high heterogeneity in *in vitro*-matured oocytes. [Mol Cell Proteomics](#), 2022, 21(8): 100267
- [91] Hu W, Zeng H, Shi Y, et al. Single-cell transcriptome and translome dual-omics reveals potential mechanisms of human oocyte maturation. [Nat Commun](#), 2022, 13(1): 5114
- [92] Zhu P, Bu G, Hu R, et al. Lipidomic characterization of oocytes at single-cell level using nanoflow chromatography-trapped Ion mobility spectrometry-mass spectrometry. [Molecules](#), 2023, 28(10): 4202