

# 单细胞分辨率下的植物干细胞组织和分化

宫亚运

贝瑞基因科技服务部

# 文章概括

## 单细胞分辨率下的植物单细胞组织和分化

Plant stem-cell organization and differentiation at single-cell resolution

- ◆ 关键词语：茎尖分生组织、玉米、单细胞转录组、细胞分化
- ◆ 研究单位：康奈尔大学
- ◆ 发表期刊：PNAS
- ◆ 发表时间：2020.12.17
- ◆ 影响因子：9.412

# 思路设计

- ✓ 1、SAM+P2单细胞转录组分析
- ✓ 2、SAM组织中细胞分裂速率研究
- ✓ 3、SAM组织干细胞基因组完整性分析
- ✓ 4、SAM组织干细胞调控的分歧
- ✓ 5、玉米HAM-LIKE基因在SAM核中的WUS独立功能研究
- ✓ 6、轨迹分析
- ✓ 7、SAM+P6单细胞转录组研究
- ✓ 8、候选基因的验证工作 (RT-PCR)
- ✓ 9、异位表达的KN1基因分析
- ✓ 10、正常WT和KN1-O/+同胞SAM+P6处理对照分析
- ✓ 11、不同品种玉米的共性和差异分析 (未涉及)

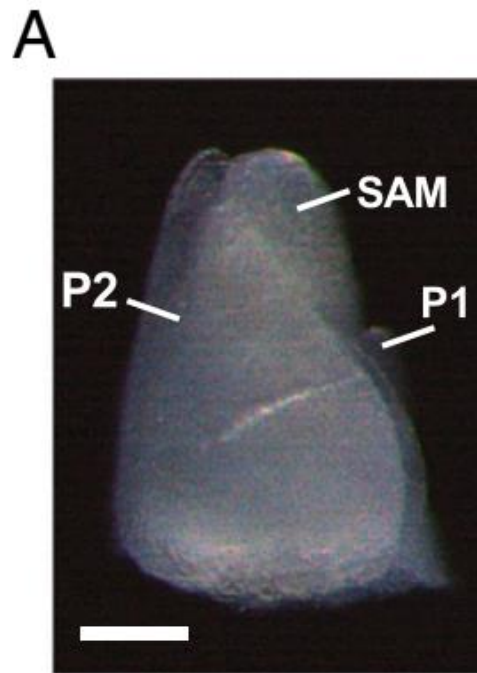
# 研究背景

- ❑ 器官发生通常在幼年阶段完成，植物在胚胎发生后很长时间内通过多能干细胞群的持续存在来启动新的器官。
- ❑ 在植物茎中，这些干细胞被容纳在茎顶端分生组织中，该分生组织产生植物的所有地上器官。
- ❑ 开花植物中SAM组织的典型描述包括SAM顶端中心区内的干细胞生态位，由干细胞组织中心包围，以及SAM侧面周围的外围区，为器官发生提供初始细胞。
- ❑ 干细胞生态位的遗传维护和组织，以及细胞如何获得分化的命运，仍然是植物发育中感兴趣的基本领域。
- ❑ 植物细胞的单细胞转录组分析需要原生质体的制备，原生质体是活细胞，其坚硬的纤维素细胞壁需要被酶促去除。

# 实验方法

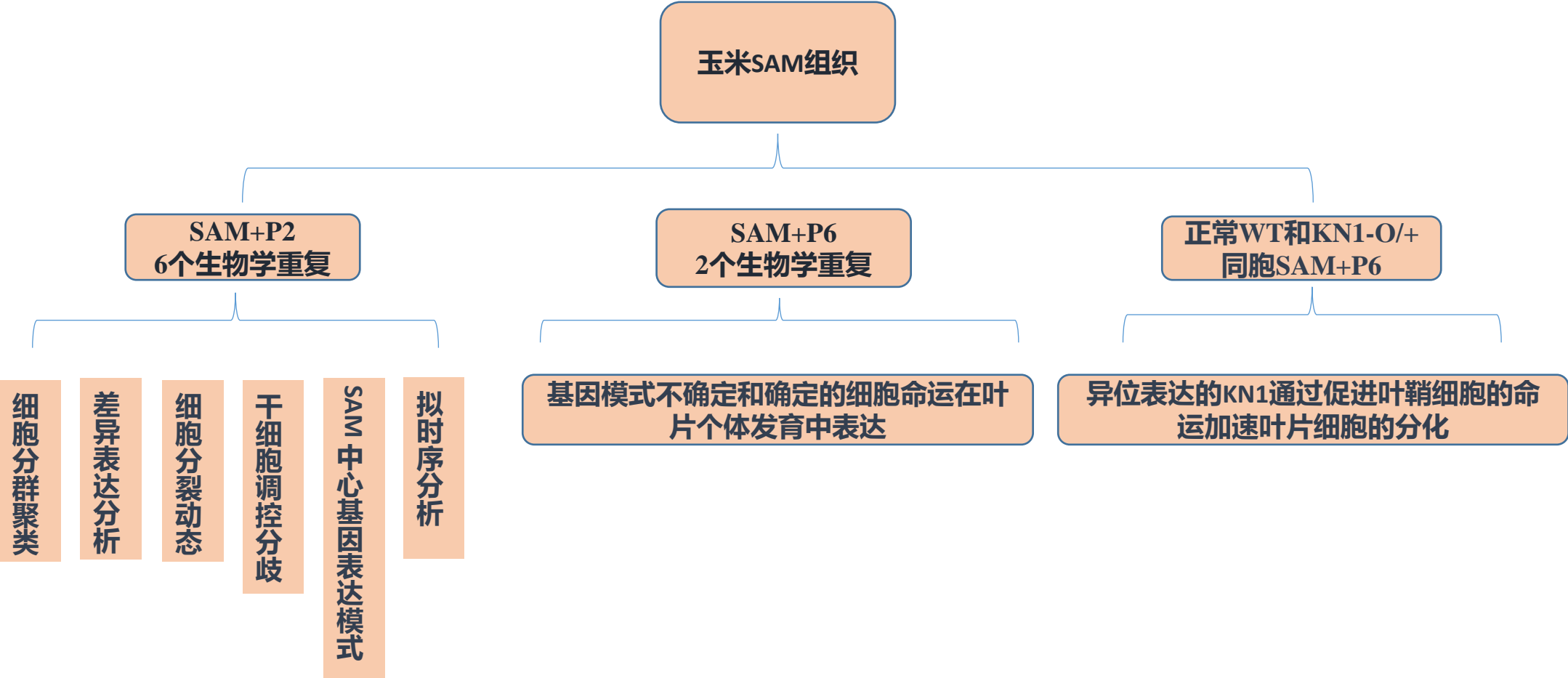
## 实验处理

- 植物细胞的单细胞转录组分析需要原生质体的制备，原生质体是活细胞，其坚硬的纤维素细胞壁需要被酶促去除。
- 为了获得更高的活细胞回收率，用L-精氨酸补充原生质体溶液，这适度提高了细胞活力。增加培养基的pH值进一步增强了原生质体活力。总之，这些对原生质体方案的修改使细胞活力提高了10到30倍。
- 为了从显微镜下的幼苗SAM中捕获细胞，从解剖的顶端人工收获原生质体，包括SAM和两个最近启动的叶原基（SAM+P2）（图1A）



图A：细胞是从SAM和两个最近启动的叶原基(SAM + P2)中分离出来的

# 技术路线



本研究技术路线

# 研究结果1——单细胞转录组学方法分析玉米SAM细胞

- ❑ 玉米茎尖分生组织（SAM）中分离单个细胞，并对植物茎分生组织进行单细胞转录组学分析。本研究对玉米茎尖的发育遗传组织进行了无偏分析，揭示了SAM稳态的进化差异和保守特征。利用单细胞分析的精细尺度分辨率重建了野生型和突变型玉米幼苗的地上部细胞分化过程，从而使干细胞在发育过程中获得不同的细胞命运。
- ❑ 6个生物学重复共捕获327个细胞进行scRNA-seq分析（检测到的转录中位数=8955，检测到的基因中位数=2221）。首先使用k-均值聚类对转录相似的细胞进行分类。使用均匀流形近似和投影（UMAP）进行降维，将得到的七个簇绘制在二维空间中。由于SAM+P2组织中有丰富的循环细胞（49%在S/G2/M期），在细胞聚集上回归了细胞周期引起的变异。
- ❑ 根据已知茎尖标记基因的表达将细胞类型识别分配给簇，并确定了与来自表皮、原基和脉管系统的主要细胞类型相对应的簇，以及来自SAM的不确定细胞类型（图1B）。大多数富含SAM的细胞并没有形成离散的、孤立的细胞团，而是表现出中间同一状态的连续性（图1B），这表明玉米SAM和幼叶原基中的差异是高度动态和连续的。

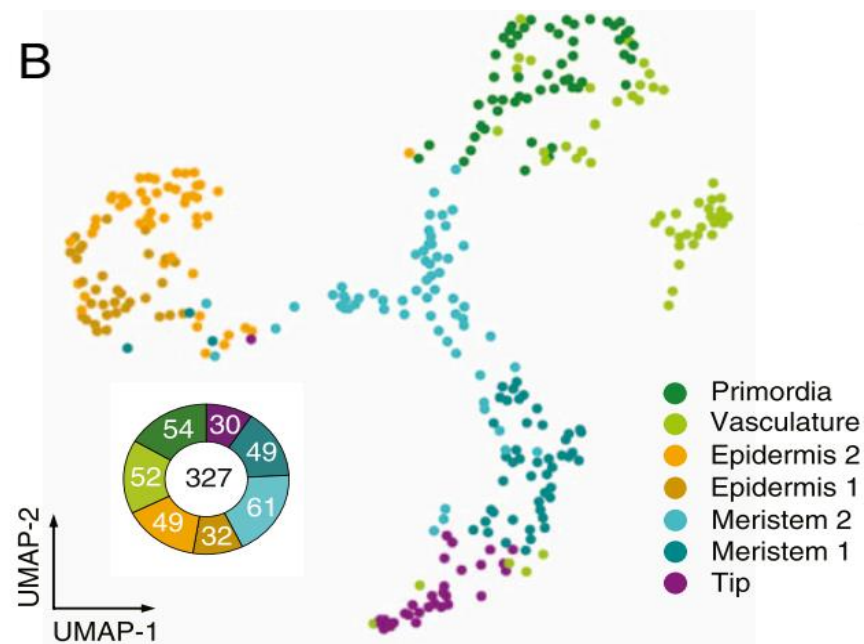


图1B SAM+P2数据集中细胞的降维和细胞分类。甜甜圈图显示每个分类中的单元格数



## 研究结果2——玉米干细胞基因组完整性的控制

- 玉米SAM的顶端被认为是干细胞的所在地，干细胞是产生玉米植株地上体细胞组织以及产生种系的细胞所必需的。细胞聚类分析独立地鉴定了一个转录不同的细胞群，其中（DYN）是玉米SAM中先前鉴定的尖端细胞标记物，在更广泛的表达KN1的分生组织细胞群中上调（图1C—E）。因此，将属于该簇的细胞指定为居住在SAM尖端内的假定干细胞，并使用差异表达分析来确定89个在该群体中优先表达的基因（图1F）。其中包括在细胞间信号传导、小RNA生物发生、DNA维持、对植物激素生长素和细胞分裂素的反应以及转录调控中具有确定或预测作用的基因（图1F）。
- 对参与RNA生物发生的众多基因的检查表明，叶尖细胞参与RNA依赖的基因沉默活动。在重复的、富含逆转录转座子的玉米基因组区域维持异染色质。事实上，异染色质的维持对于动物干细胞群体的基因组稳定性和内稳态同样至关重要。
- 植物在营养发育阶段缺乏分离的生殖细胞谱系。参与DNA修复相关过程的基因的上调，可能反映了在具有体细胞和生殖细胞命运潜力的细胞中保持高基因组保真度的优势。总的来说，这些数据表明玉米SAM末端的细胞参与了与其植物干细胞特性一致的基因组保护功能。

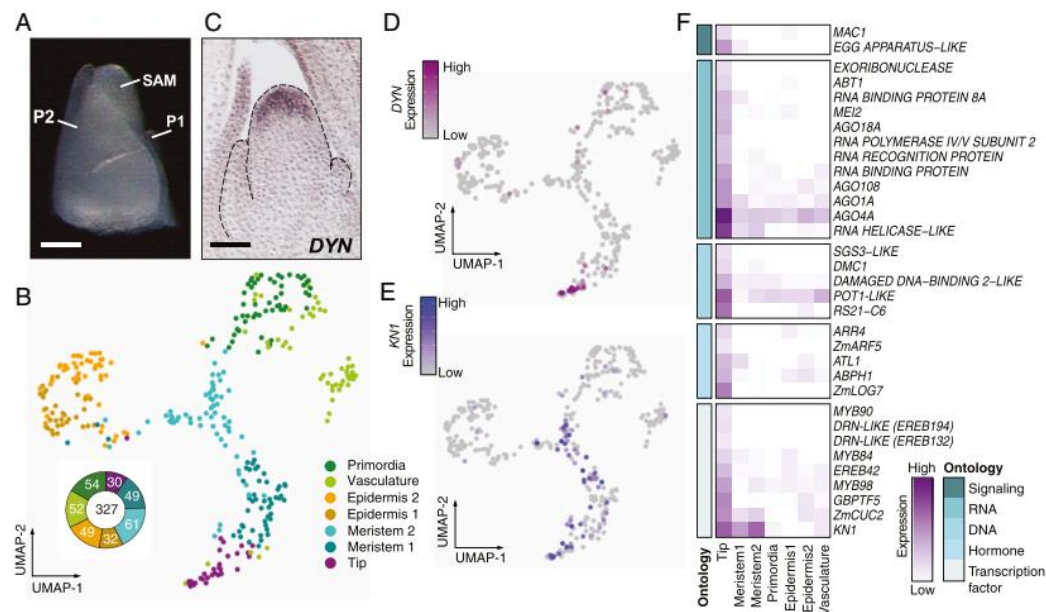


图1C 动态蛋白（DYN）反义探针RNA原位杂交研究

图1D DYN是SAM尖端和假定的干细胞结构域的标记物，在SAM + P2数据集中与假定的尖端细胞数量相关

图1E KN1的表达标志着更广泛的不确定细胞群，包括尖端细胞群

图1F 基于GO对尖端域分组的差异表达基因选择的热图



# 研究结果3——在SAM干细胞群中，细胞分裂率保持在较低水平

- 为了探究玉米SAM尖端的干细胞是否表现出细胞分裂率的差异发现随着分化的进行，G1期SAM+P2细胞的比例减少，表明细胞分裂率较高（图2A）。例如，SAM尖端群体中G1期细胞所占比例比分生组织、叶原基或脉管系统细胞群体中的其余细胞所占比例更大，这表明干细胞之间的细胞分裂率较低。为了验证这一点，分别在S期和G2/M期积聚在细胞中的组蛋白H3和细胞周期蛋白1转录物进行了RNA原位杂交。将内侧SAM切片沿近中轴细分为五个高度相等的箱子，并通过组蛋白H3和CYCLIN1染色的图像阈值推断细胞分裂阶段的空间分布（图2 B—E）。
- 在包含SAM的tipmost区域的bin 1中的细胞始终具有最低数量的分裂细胞。当与检测编码促进SAM末端基因组和表观基因组稳定性因子的转录物一起考虑时（图1F），干细胞群体中的低细胞分裂率可以解释在个体发育早期没有分离生殖系的情况下，植物如何避免遗传负荷在连续几代中的不利增加。
- 在SAM的其余部分，在尖端以下的细胞显示出更高的细胞分裂率，这些增殖细胞在运输扩增细胞中分裂，为确定的侧器官产生原生质，避免了对干细胞高分裂率的要求。
- 最后，观察到在腋生分生组织（AMs）中，与SAM相比，分裂细胞的最高浓度通常出现在更靠近AM顶端的地方（图2D），这表明细胞分裂模式在不同的茎分生组织类型中受到动态调节，可能是由于分生组织活性的相对差异。

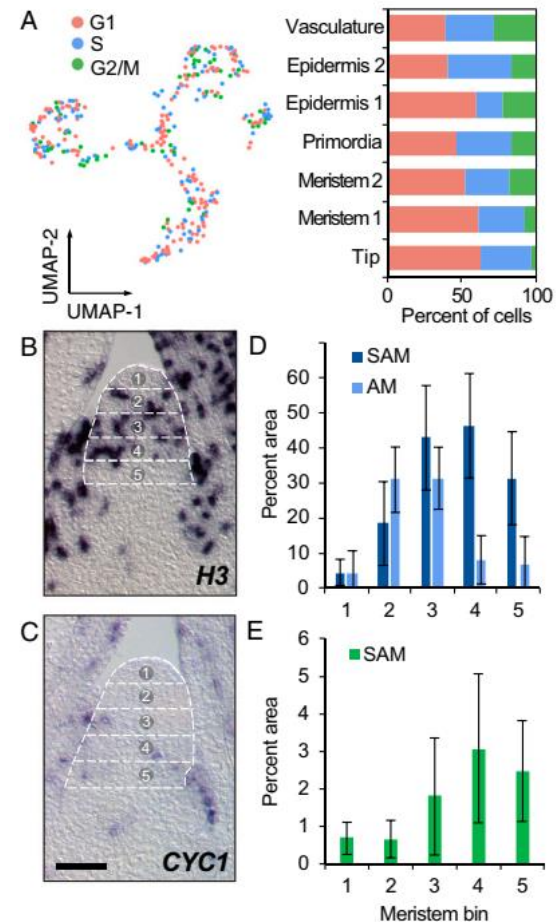


图2 整个玉米SAM的细胞分裂动态

## 研究结果4——SAM干细胞调控的分歧

- 分析SAM+P2组织中干细胞维持调节因子的细胞特异性表达模式。（FCP1）是在分生组织顶端细胞中检测到的唯一CLV3样配体编码转录物（图3A）。
- RNA原位杂交检测到FCP1在SAM顶端下方的弱表达，以及最初报道的在SAM周边和叶原基的表达。FCP1肽配体被FEA3受体感知以抑制干细胞特性。FEA3转录物在SAM外围显示出低和弥漫的积累，在叶原基中表达增强（图3B）。
- 在SAM末端，WUS从那里被运输来促进干细胞的命运。玉米花序分生组织中也描述了类似的干细胞组织功能。没有在SAM中检测到ZmWUS表达细胞，尽管鉴定了几种玉米WUS同源物的转录物，包括ZmWOX3a、ZmWOX9b和ZmWOX9c（图3C）
- 研究没有发现在玉米B73 SAM中表达的候选WOX基因可能作为干细胞组织中心，与拟南芥中的WUS和玉米花序分生组织中的ZmWUS同源。为了扩展这些发现，进行了RT-PCR分析，试图检测ZmWUS1和ZmWUS2转录物的积累。虽然这两种转录物在含有花序分生组织的未成熟穗中都可以检测到，但没有在营养枝顶端组织中检测到它们的表达，包括SAM和最近启动的三个叶原基（图3D）。
- 总之，这些结果表明典型的CLV1 CLV3 WUS通路在玉米B73 SAM中被绕过，相应的玉米旁基因的空间表达模式的变化是一个决定性的特征。

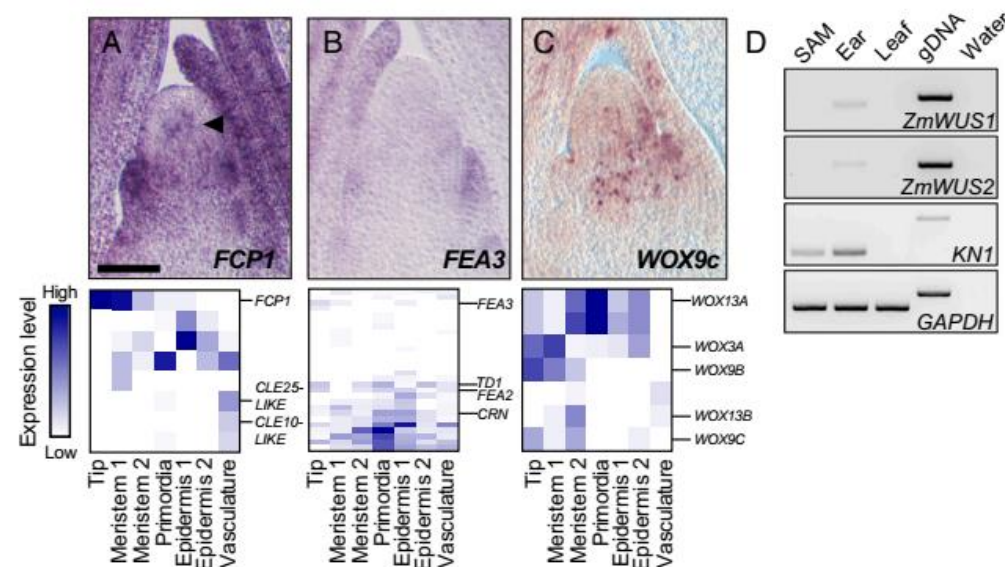


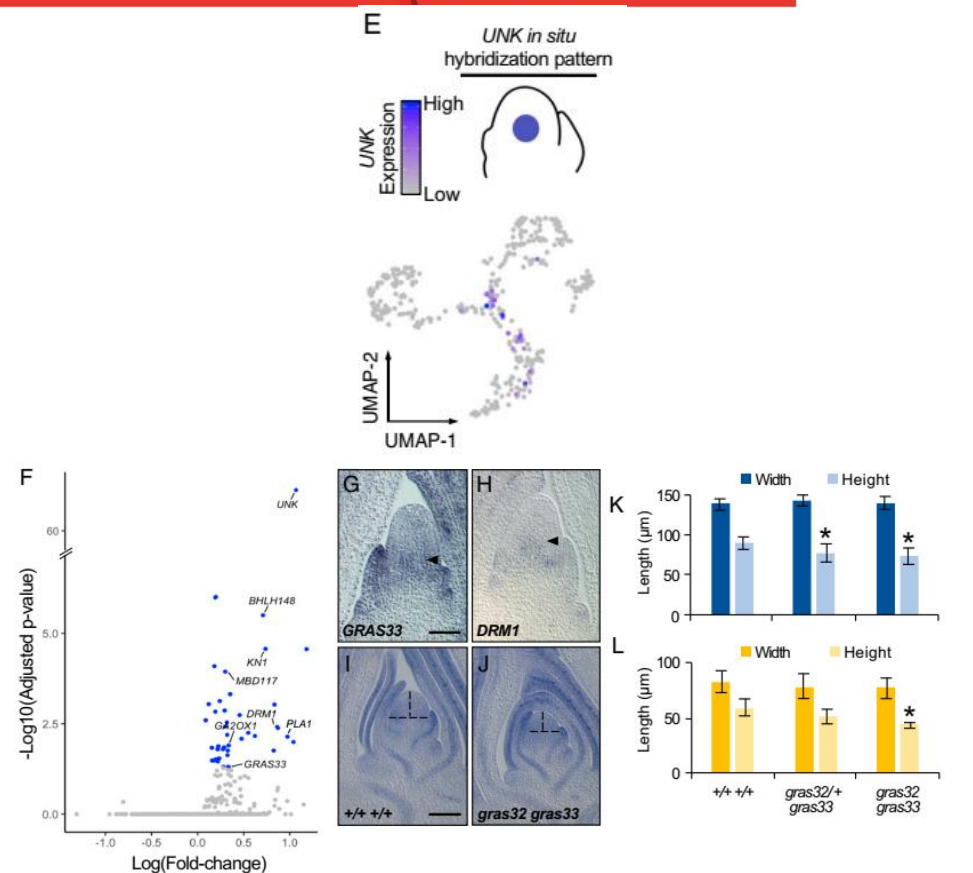
图3 SAM核心的特征

A—C: 用反义探针与FCP1 (A)、FEA3 (B) 和WOX9c (C) 进行RNA原位杂交（顶部），并在SAM+P2数据集进行差异分析和paralog基因表达（底部）

D: 玉米SAM和最近启动的三个叶原基（SAM）、2-mm未成熟穗（ear）、成熟叶3组织（leaf）、基因组DNA（gDNA）和无模板对照（water）的ZmWUS1/2、GAPDH和KN1转录物的RT-PCR

# 研究结果5——玉米HAM-LIKE基因在SAM核中的WUS独立功能

- 检测了位于SAM中心或核心区域的结构域的细胞中的基因表达模式，该结构域以GRMZM2G049151的表达为标志。通过GRMZM2G049151的转录物积累来鉴定核心区域内的细胞，并使用差异分析来表征其表达谱（图3 E和F）。
- SAM核心细胞显示PLASTOCHRON1 (PLA1) 基因表达上调。PLA1以生长素依赖的方式促进细胞分裂和生长，并且在多个玉米器官和组织中也表达。对SAM中细胞分裂动力学的分析表明，相对于SAM尖端，核心区域具有更高的细胞增殖活性（图2）。生长素促进的休眠相关基因DRM1和HAM3同源基因GRAS33也在SAM核心上调，如RNA原位杂交所证实（图3 F-H）。
- 为了确定核心结构域中的GRAS33活性是否在玉米SAM的维持中具有保守作用，在GRAS33和它的同源GRAS32之间产生了双突变体，并分析了幼苗中的SAM大小。与野生型（WT）同胞相比，*gras32/+gras33*幼苗和*gras32-gras33*双突变体显示出更短的SAM（图3 I—K）。只有*gras32 gras33* SAM具有较短的AMs，可能是由于AMs中这些因素之间的遗传冗余（图3L）。这些数据表明，玉米GRAS32和GRAS33与它们的拟南芥同源物一样，在与玉米SAM核心结构域重叠的干细胞周围区域调节SAM稳态中发挥作用。这些结果进一步表明，玉米SAM核心可能在功能上类似于拟南芥中表达HAM基因的SAM末端区域，其中玉米HAM基因具有潜在的WUS独立SAM调控功能。



(E)在SAM + P2数据集中表达未知标记基因的细胞。

(F)火山图显示了表达未知SAM核心标记基因的细胞中基因的差异表达(蓝色)。

(G和H) RNA在SAM中的GRAS33 (G)和DRM1 (H)反义探针原位杂交。

(I和J)甲苯胺蓝染色正常兄弟姐妹(I)和*gras32 gras33*双突变体(J) SAM的中间纵切面。纵、横虚线分别表示SAM高度和宽度。正常兄弟姐妹和*gras32-gras33*双突变体的SAM (n = 5 ~ 8) (K)和AM (n = 3) (L)高度和宽度的定量



# 研究结果6——细胞分化遵循连续的转录状态

- 研究发现假时间进程与细胞从不确定到确定的细胞命运的转变有关；**不确定分生组织特性的关键标志物KN1在假时间早期高度表达，并随着假时间进程而下降（图4A）**。为了调查与细胞分化相关的转录变化，进行了差异分析，以确定与假时间进程显著相关的转录积累模式。总的来说，超过2000个基因在假时间内表现出显著的表达变化。**层次聚类根据表达模式对每个转录物进行分组，并确定与细胞分化的特定阶段相对应的转录物积累的几种模式（图4B）**。
- 在伪时期早期，富含干细胞功能的RNA代谢和染色质组织的基因被富含谷胱甘肽转移酶和阳离子结合活性以及DRM1和GRAS33表达的基因所取代。接下来，细胞通过一个假定的边界结构域身份进行进展，尽管它们的细胞谱系不同，SAM尖端细胞类型之间的独特转录谱只有在离开SAM的边界区域后才能被检测到。实际上，表皮标记基因如LTP1, LTP3, OCL4首先出现在SAM边缘的原真皮层，在SAM尖端外。增加玉米SAM的取样可能是必要的，以揭示更细微的表达差异，从而区分叶尖原皮细胞和底层细胞群。
- 发现表皮细胞分化与外细胞层（OCL）同源结构域亮氨酸拉链IV转录因子的上调相关，该转录因子编码促进表皮细胞特性的基因。此外，原基和维管细胞显著富集与翻译相关的转录物，表明蛋白质合成的大量爆发伴随着叶片的起始和扩展。**通过RNA原位杂交检测与假时间进程显著相关的选定基因，以验证其在发育轨迹上的表达模式（图4C—F）**。这些结果支持了这样一个观点，即分化细胞的转录组在伪时间进程定义的连续统中是高度动态的。

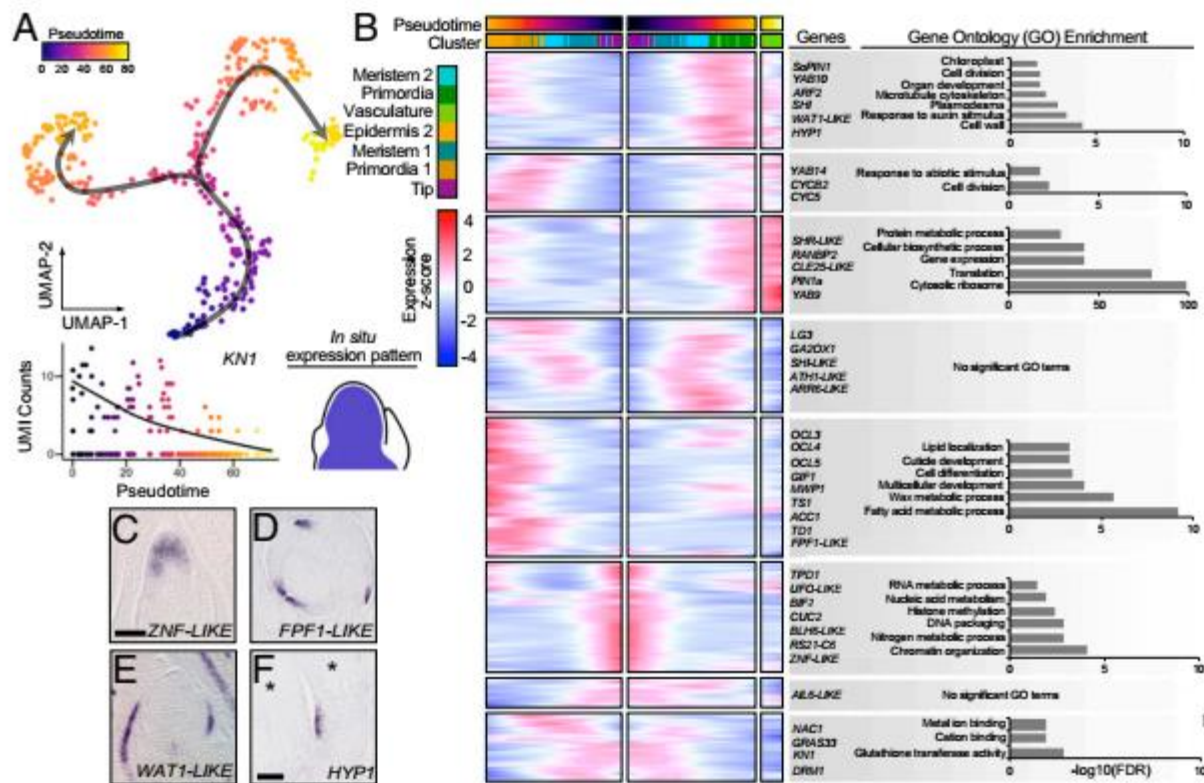


图4A-F 追踪与细胞分化相关的基因表达模式

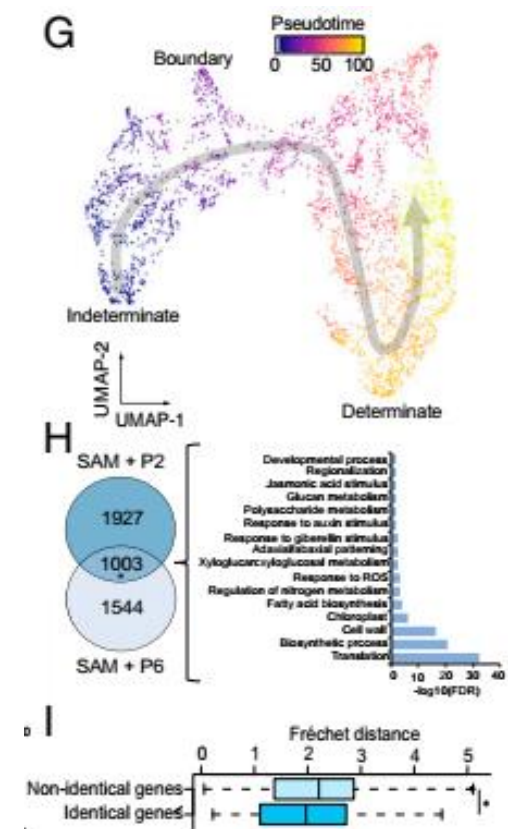
# 补充实验——SAM+P6单细胞转录组

## 实验处理

- 在SAM外围的叶起始后，细胞继续在叶近端区域增殖，远远超过P6阶段（即SAM的第六片叶），需要在叶和茎的连接处通过个体发育继续维持不确定和确定的区域。为了分析这一后期的模式和分化过程，从2周龄的幼苗中制备了包含3 mm玉米茎尖的组织，解剖以包括六个最近启动的叶原基和SAM，用于scRNA-seq分析。
- 总的来说，用微流控液滴捕获法捕获了12967个原生质体（两个生物复制体）的转录组（检测到的转录中位数=14992，检测到的基因中位数=4965）。进行维度缩减，发现与表皮、维管、叶原基、不确定和细胞周期状态相对应的细胞簇，这些细胞簇与在SAM+P2数据集中个体发育早期检测到的细胞类型非常相似。然而，SAM+P6数据集中的细胞绝大多数来自芽个体发育的后期（即P4到P6），这是由于这些老叶原基和相关茎的显著增大。例如，尽管根据转录因子基因KN1的表达鉴定了不确定细胞，但在SAM+P6数据集中没有鉴定出具有幼苗SAM干细胞生态位转录组特征的细胞（图1 C—F）。尽管如此，确定了许多不确定到确定细胞命运转变的特征。

# 研究结果7——基因模式不确定和确定的细胞命运在叶片个体发育中表达

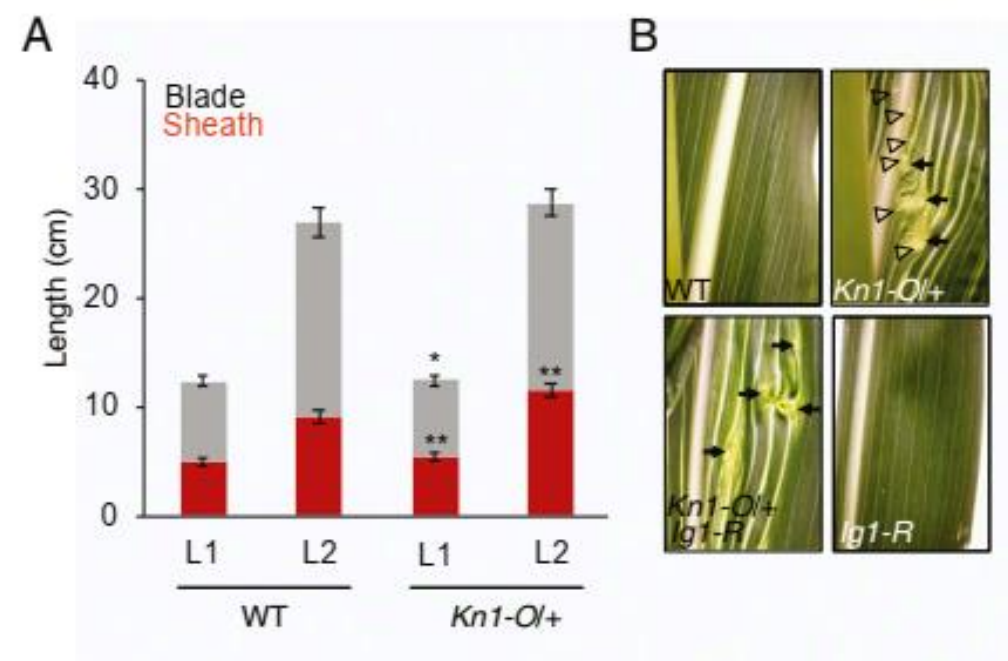
- 假设在叶片发育的早期和晚期，细胞分化的转录组学特征是相似的，反映了植物地上部系统的迭代和模块化模式。为了验证这一点，研究再次使用轨迹推断来为细胞分配一个伪时间值，该值反映了细胞在不确定到确定转换中的位置，并使用去分析来识别具有伪时间相关表达模式的基因（图4G）。总的来说，我们鉴定了3000个符合严格意义界限的基因，并将它们与SAM+P2数据集中的假时间相关基因进行了比较。发现，在这两个数据集中，大约三分之一的转录物显示出与假时间的显著相关性，这表明基因的核心模块控制着个体发育过程中不确定到确定的细胞转变，包括KN1（图4H和数据集S10）。
- 使用RNA原位杂交来验证这些模式，并在SAM+P2和SAM+P6数据集中确认与细胞分化显著相关的共享基因。此外，两个数据集中相同基因的表达曲线的中位数Fréchet距离低于非相同基因，表明个体发育过程中的表达行为相似（图4I）。在1003个共享基因中，与翻译、细胞壁、器官极性、生长素和赤霉素相关过程相关的GO功能得到了丰富，可能反映了生长素和赤霉素激素在促进分化中的作用，而与KN1相反，KN1具有不确定性



- (G)从SAM + P6数据集中提取一组细胞，重新聚类，并使用轨迹推断在从不确定细胞命运过渡到确定细胞命运的过程中分配细胞伪时间分数
- (H) SAM + P2和SAM + P6数据集轨迹相关基因的重叠及其GO term富集
- (I)在SAM + P2和SAM + P6数据集中显示相同和不相同基因的Fréchet距离中位数的箱形图

# 研究结果8——异位表达的KN1通过促进叶鞘细胞的命运加速叶片细胞的分化

- 单细胞转录组学分析一致区分了表达KN1的不确定细胞类型和低KN1表达的确切细胞类型。鉴于KN1在促进不确定性方面的作用，试图确定异位KN1表达对细胞命运进程的影响。所述玉米叶包括远端的光合叶片和插入叶节并包围茎的近端鞘。一个铰链状的耳廓和一个称为叶舌的表皮衍生组织的边缘在叶片和叶鞘的分界处发育。这种近轴模式始于幼叶原基。KN1显性的功能获得性突变使其在发育中的叶原基中错误表达导致叶片组织中异位鞘的形成。为了支持这个模型，发现与野生型同胞相比，Kn1-O/+幼苗的鞘长显著增加(图5A)。
- 在叶鞘和叶片的交界处，叶舌1 (LG1) 基因的功能是叶舌和耳廓形成所必需的。在Kn1-O/+植物中，叶鞘组织的异位节出现在叶片中，在这个异位的叶鞘边界处伴随着相邻的叶舌形成(图5B)。然而，在Kn1-O lg1双突变体中，在这些异位叶鞘边界处没有形成叶舌，这进一步证明KnO-1/+突变体叶片中的节包括错开的鞘状结构的斑块(图5B)。



KN1的异位表达加速了叶细胞向鞘方向的分化

- (A) WT和Kn1-O/+的幼苗叶片1 (L1)和叶片2 (L2)的叶片和叶鞘长度。
- (B) 成熟叶片Kn1-O与lg1-R的遗传互作。箭头表示异位舌，箭头表示具有鞘状同一性



# 补充实验——异位KN1表达对玉米幼苗茎中假时间进程的影响

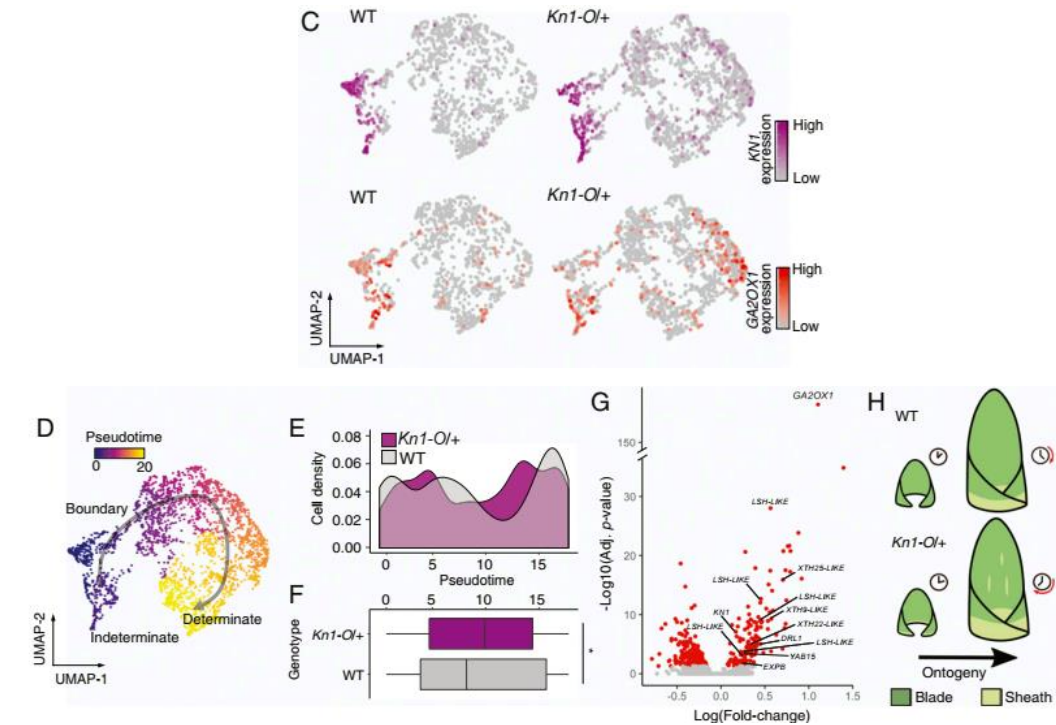
## 实验处理

- 在为了研究异位KN1表达对玉米幼苗茎中假时间进程的影响，从正常WT和KN1-O/+同胞SAM+P6组织中分离原生质体，并对其进行scRNA-seq，共捕获2761个细胞，跨越不确定到确定的细胞身份转变（检测到的转录中位数=7235，检测到的基因中位数=3427。）

# 研究结果8——异位表达的KN1通过促进叶鞘细胞的命运加速叶片细胞的分化

虽然KN1及其直接靶基因GA2OX1主要只在WT的不确定细胞中表达，但这两个基因在KN1-O/+背景的确定的细胞类型中更广泛地表达（图5C）。轨迹重建显示，相对于WT细胞群，Kn1-O/+细胞的命运进程发生了改变（图5D和E）。令人惊讶的是，来自Kn1-O/+背景的细胞在假时间进程中比来自WT的细胞显著提前（图5F），这表明叶片中的Kn1活性促进而不是延迟细胞分化。为了评估与异位KN1活性相关的基因表达特征，比较了KN1-O/+背景下异位表达GA2OX1的细胞和WT背景下确定的细胞中的差异表达基因。通过靶向体外表达KN1直接靶基因GA2OX1的细胞，增加了分析异位KN1积极调节基因表达的可能性。正如预期的那样，GA2OX1的异位表达与增加的KN1表达相关（图5G）。检测到关键的决定性促进基因如下垂叶1（DRL1）。除了这些基因外，还观察到编码假定的细胞壁修饰酶的几个基因以及属于光敏下胚轴（LSH）家族的五個基因的表达上调。有趣的是，RNA原位杂交显示其中一个上调的LSH样基因（GRMZM2G816289）的转录物在叶原基基积累，位于与发育鞘重叠的区域。

综上所述，这些结果表明，当在叶片中错误表达时，KN1促进鞘细胞分化，并加速叶片发育的个体发育进程，如假时间内细胞转录组的变化所反映的（图5H）。



(C) 正常(WT)和KN1 - o /+兄弟姐妹细胞中KN1和GA2OX1的表达，以及(D)由此产生的不确定到不确定的细胞分化轨迹重建

(E)密度图显示了WT和Kn1-O/+兄弟姐妹在假时间内的细胞分布

(F)显示来自WT和Kn1-O/+姐妹细胞的中位伪时间值的箱形图

(G) Kn1-O/+特异表达GA2OX1的细胞与WT特异表达GA2OX1的细胞中差异表达基因的火山图(红色)

(H) KN1过表达对叶片影响的模型。Kn1-O/+的叶鞘生长增加和异位叶鞘发育加快了叶片个体发生的进程

# 文章亮点和不足

## 亮点

01

单细胞转录组首次在玉米茎尖组织上的研究，为开花植物的茎尖干细胞分化机制提供了参考资料

02

从单细胞层面上对SAM稳态的进化差异和保守特征进行了详细的解释

03

除了单细胞转录组数据层面的分析外，进行了详细的验证分析，对差异表达结果进行了充分证明

## 不足

01

可以选择多个玉米品种的SAM组织同时进行分析，寻找品种间茎尖分生组织干细胞分化的差异和共性

# Thank You!



官方网站



官方微信