

单细胞转录组解析草莓花托维管组织发育的 异质性细胞图谱

郑子豪

(浙江大学农业与生物技术学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 草莓 (*Fragaria × ananassa*) 作为全球广泛栽培的高经济价值浆果作物, 其果实发育质量直接决定产业经济效益, 而花托作为草莓果实的主要食用部分, 其发育状况与果实大小、口感、营养积累密切相关。维管组织作为植物体内物质运输、机械支撑和信号传导的核心系统, 贯穿草莓花托发育全过程, 其细胞类型的多样性和发育动态直接调控花托的生长、养分分配及果实品质形成。然而, 传统组织学和批量转录组技术难以解析维管组织内部不同细胞类型的分子特征和发育异质性, 无法精准揭示草莓花托维管组织发育的分子调控机制。本研究以栽培草莓品种“红颜”为实验材料, 选取花托发育的三个关键时期(幼嫩期、膨大期、成熟期), 采用单细胞转录组测序技术(scRNA-seq), 系统构建草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱。通过数据质量控制、细胞聚类、细胞类型鉴定、拟时序分析及差异基因表达分析等一系列生物信息学方法, 成功鉴定出草莓花托维管组织中的主要细胞类型, 包括木质部导管细胞、木质部纤维细胞、韧皮部筛管细胞、韧皮部伴胞、维管薄壁细胞、原形成层细胞等, 并筛选出各细胞类型的特异性标记基因。同时, 构建了草莓花托维管组织细胞的发育轨迹, 揭示了不同细胞类型的分化路径和发育动态, 识别出参与维管组织发育的关键基因和信号通路(如生长素信号通路、细胞分裂素信号通路、木质素合成通路等)。此外, 通过比较不同发育时期的细胞图谱, 明确了细胞类型组成和基因表达模式的动态变化, 阐明了维管组织细胞异质性与花托发育进程的关联。本研究首次在单细胞水平上解析了草莓花托维管组织发育的异质性特征, 为深入理解草莓花托维管组织的发育机制提供了全新的理论依据, 也为草莓遗传改良和优质高效栽培管理提供了重要的分子靶点和技术思路。

关键词: 草莓; 花托; 维管组织; 单细胞转录组; 细胞异质性; 发育轨迹; 标记基因

中图分类号: S668.4

文献标识码: A

文章编号: 3106-2547 (2025) 06-0024-12

DOI: 10.62022/FHR.issn3106-2547.2025.06.003

Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals the Heterogeneous Cell Atlas of Vascular Tissue Development in Strawberry Receptacle

Zheng Zihao

College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Abstract: Strawberry (*Fragaria × ananassa*) is a high-economic value berry crop widely cultivated worldwide. The quality of fruit development directly determines the economic benefits of the industry. As the main edible part of strawberry fruit, the receptacle development is closely related to fruit size, taste, and nutrient accumulation. Vascular tissue, as the core system for material transport, mechanical support, and signal transduction in plants, runs through the entire process of strawberry receptacle development. The diversity and developmental dynamics of its cell types directly regulate the growth, nutrient distribution, and fruit quality formation of the receptacle. However, traditional histology and bulk transcriptome technologies are difficult to resolve the molecular characteristics and developmental heterogeneity of different cell types within vascular tissue, and cannot accurately reveal the molecular regulatory mechanism of strawberry receptacle vascular tissue development. In this study, the cultivated strawberry cultivar 'Hongyan' was used as the experimental material, and three key stages of receptacle development (young stage, expansion stage, and mature stage) were selected to systematically construct the heterogeneous cell atlas of strawberry receptacle vascular tissue development using single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) technology. Through a series of bioinformatics methods such as data quality control, cell clustering, cell type identification, pseudotime analysis, and differential gene expression analysis, the main cell types in strawberry receptacle vascular tissue were successfully identified, including xylem vessel cells, xylem fiber cells, phloem sieve tube cells, phloem companion cells, vascular parenchyma cells, procambium cells, etc., and the specific marker genes of each cell type were screened out. At the same time, the developmental trajectory of strawberry receptacle vascular tissue cells was

作者简介: 郑子豪, 博士, 研究员, 研究方向为园艺基因组学与生物信息学。

constructed, revealing the differentiation path and developmental dynamics of different cell types, and identifying the key genes and signaling pathways involved in vascular tissue development (such as auxin signaling pathway, cytokinin signaling pathway, lignin synthesis pathway, etc.). In addition, by comparing the cell atlases of different developmental stages, the dynamic changes of cell type composition and gene expression patterns were clarified, and the correlation between vascular tissue cell heterogeneity and receptacle development process was elucidated. This study is the first to resolve the heterogeneous characteristics of strawberry receptacle vascular tissue development at the single-cell level, providing a new theoretical basis for in-depth understanding of the developmental mechanism of strawberry receptacle vascular tissue, and also providing important molecular targets and technical ideas for strawberry genetic improvement and high-quality and efficient cultivation management.

Keywords: Strawberry; receptacle; vascular tissue; single-cell transcriptome; cell heterogeneity; developmental trajectory; marker genes

1 引言

1.1 研究背景与意义

1.1.1 草莓的经济价值与生物学特性

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)属于蔷薇科(Rosaceae)草莓属多年生草本植物,是全球范围内栽培面积最广、经济价值最高的浆果类作物之一,其果实色泽鲜艳、果肉细嫩多汁、风味独特,富含维生素C、花青素、膳食纤维及多种矿物质,具有极高的营养价值和保健功能,深受消费者喜爱^[1]。近年来,随着人们生活水平的提高和消费结构的升级,全球草莓市场需求持续增长,草莓产业已成为许多国家和地区农业经济的重要支柱产业,在促进农民增收、推动农业产业结构调整、发展特色农业等方面发挥着重要作用。据统计,全球草莓栽培面积已超过40万公顷,年产量突破800万吨,其中中国作为全球最大的草莓生产国和消费国,栽培面积和年产量均居世界首位,主要分布在浙江、山东、辽宁、四川等省份,形成了规模化、标准化的栽培体系,草莓产业已成为当地农业增效、农民增收的重要途径。

草莓具有独特的生物学特性,其生长周期短、繁殖速度快、适应性强,既能通过有性繁殖(种子繁殖)产生后代,也能通过无性繁殖(匍匐茎繁殖、分株繁殖)快速扩大种群,其中匍匐茎繁殖是生产上最常用的繁殖方式,具有繁殖系数高、后代性状稳定、操作简便等优点,能够快速培育出大量优质种苗,满足规模化栽培的需求。草莓的生长发育具有明显的季节性和阶段性,通常分为营养生长阶段和生殖生长阶段,营养生长阶段主要包括幼苗期和匍匐茎抽生期,此时植株主要进行茎叶生长和根系发育,为后续的生殖生长积累养分^[2];生殖生长阶段主要包括现蕾期、开花期、结果期和果实成熟期,此时植株的生长重心转移到花和果实的发育上,花托开始膨大形成果实,最终发育为成熟的草莓果实。

与其他水果作物不同,草莓的果实属于聚合果,其食用部分并非由子房发育而来,而是由花托膨大形成,子房则发育为果实表面的瘦果(种子),这种独特的果实发育方式使

得草莓花托的发育状况直接决定果实的大小、形状、口感和营养品质。草莓花托的发育是一个复杂的生理生化过程,受到遗传因素、环境因素(光照、温度、水分、养分等)和激素调控等多种因素的共同影响,其中任何一个因素的异常都会导致花托发育不良,出现果实畸形、大小不均、品质下降等问题,严重影响草莓的商品价值和市场竞争力。因此,深入研究草莓花托的发育机制,揭示其生长发育的分子调控规律,对于优化草莓栽培管理措施、培育优质草莓品种、提高草莓产量和品质具有重要的理论意义和实践价值。

草莓的基因组具有复杂性,栽培草莓为八倍体($2n=8x=56$),其基因组大小约为708 Mb,包含大量的重复序列和同源基因,这给草莓的分子生物学研究带来了一定的挑战。近年来,随着基因组测序技术的发展,草莓全基因组序列已被成功解析,为草莓的基因克隆、表达分析和遗传改良提供了重要的基因组资源^[3]。同时,随着分子生物学技术的不断进步,越来越多的与草莓花托发育、果实成熟、品质形成相关的基因被鉴定和功能验证,为深入理解草莓的生长发育机制奠定了坚实的基础。然而,目前关于草莓花托发育的研究主要集中在整体水平,对于花托内部不同组织、不同细胞类型的发育特征和分子调控机制了解较少,尤其是维管组织作为花托发育的核心支撑系统,其细胞异质性和发育动态尚未得到系统解析。

草莓的生长发育具有较强的环境适应性,能够在不同的气候条件和土壤环境中生长,但适宜的生长环境对于草莓花托的正常发育至关重要。草莓是喜光作物,充足的光照能够促进光合作用,为花托发育提供充足的碳水化合物;适宜的温度(白天20–25℃,夜间10–15℃)能够促进花托的膨大生长,温度过高或过低都会抑制花托发育,导致果实品质下降;充足的水分和合理的养分供应能够保证花托的正常生长,缺乏水分会导致花托发育迟缓、果实变小,养分失衡则会影响果实的营养积累和口感^[4]。因此,深入研究草莓花托的发育特性,结合环境因素的调控作用,能够为草莓的优质高效栽培提供科学依据,推动草莓产业的可持续发展。

1.1.2 维管组织在植物发育中的关键作用

维管组织是植物体内特有的组织系统,由木质部(Xylem)和韧皮部(Phloem)两大核心部分组成,部分植物还含有位于木质部和韧皮部之间的形成层(Cambium),形成层能够不断分裂产生新的木质部和韧皮部细胞,使植物的茎和根不断加粗^[5]。维管组织贯穿植物的根、茎、叶、花、果实等各个器官,是植物生长发育过程中不可或缺的重要组成部分,在水分和养分运输、机械支持、信号传导、防御反应等方面发挥着至关重要的作用,直接影响植物的生长发育、产量形成和环境适应性。

木质部是维管组织的主要组成部分之一,主要由导管细胞、管胞、纤维细胞和薄壁细胞组成,其主要功能是运输水分和矿物质养分,同时为植物提供机械支持。导管细胞是木质部中最主要的输导细胞,成熟的导管细胞细胞壁木质化,形成中空的管状结构,多个导管细胞首尾相连形成导管,能够快速高效地将根部吸收的水分和矿物质养分运输到植物的各个器官,满足植物生长发育的需求。管胞主要存在于裸子植物中,在被子植物中也有少量存在,其功能与导管细胞类似,主要负责水分和矿物质的运输,同时也具有一定的机械支持作用^[6]。纤维细胞是木质部中的机械组织细胞,细胞壁高度木质化,质地坚硬,能够增强植物的机械强度,防止植物倒伏,同时也能保护维管组织免受外界环境的损伤。薄壁细胞是木质部中具有活性的细胞,能够储存营养物质,参与植物的代谢过程,同时也能参与木质部的修复和再生。

韧皮部是维管组织的另一重要组成部分,主要由筛管细胞、伴胞、薄壁细胞和纤维细胞组成,其主要功能是运输有机养分,同时参与信号传导和防御反应。筛管细胞是韧皮部中最主要的输导细胞,成熟的筛管细胞没有细胞核和细胞器,形成中空的筛管,多个筛管细胞首尾相连形成筛管系统,能够将植物叶片光合作用产生的有机养分(如蔗糖、氨基酸等)运输到植物的各个器官,为植物的生长发育提供能量和物质基础^[7]。伴胞是与筛管细胞紧密相连的细胞,具有完整的细胞核和细胞器,能够为筛管细胞提供营养支持和功能调控,维持筛管细胞的正常生理功能,两者之间通过胞间连丝进行物质交换和信号传导。薄壁细胞在韧皮部中主要起到储存营养物质、参与代谢过程的作用,同时也能参与韧皮部的修复和再生。纤维细胞在韧皮部中主要起到机械支持和保护作用,增强韧皮部的韧性和强度。

除了水分和养分运输、机械支持等基本功能外,维管组织还在植物的信号传导中发挥着重要作用。植物体内的各种信号分子(如激素、多肽、小分子RNA等)能够通过维管组

织进行长距离运输,调控植物的生长发育、开花结果、逆境响应等生理过程^[8]。例如,生长素、细胞分裂素、赤霉素等植物激素能够通过维管组织运输到植物的各个部位,调控细胞的分裂、分化和生长,影响植物的器官发育和形态建成;在植物受到逆境胁迫(如干旱、高温、低温、病虫害等)时,维管组织能够快速传递胁迫信号,启动植物的防御机制,提高植物的抗逆能力。此外,维管组织还参与植物的防御反应,当植物受到病虫害侵袭时,维管组织能够形成物理屏障,阻止病虫害的扩散,同时合成和运输防御物质,增强植物的抗病虫能力。

对于草莓而言,维管组织贯穿花托的整个发育过程,是花托生长发育的核心支撑系统,其功能的正常发挥直接影响草莓花托的膨大、养分积累和果实品质形成。草莓花托中的维管组织呈网状分布,连接着根部、茎部和花托的各个部位,能够将根部吸收的水分和矿物质养分运输到花托的各个细胞,同时将叶片光合作用产生的有机养分运输到花托中,为花托的膨大生长和营养积累提供保障。此外,草莓花托维管组织中的细胞分化和发育动态,还能够调控花托的生长速度和形态建成,影响果实的大小和形状;维管组织中的信号传导功能,能够调控花托发育过程中的激素平衡,影响果实的成熟进程和品质形成^[9]。

研究表明,草莓花托维管组织的发育异常会导致一系列果实发育问题,例如,维管组织发育不良会导致花托养分供应不足,出现果实变小、畸形、口感变差等现象;木质部导管堵塞会导致水分运输受阻,引起花托萎蔫、果实脱落等问题;韧皮部筛管功能异常会导致有机养分运输不畅,影响果实的营养积累和成熟进程。因此,深入研究草莓花托维管组织的发育机制,揭示其细胞类型的异质性和发育动态,对于解决草莓果实发育过程中的品质问题、提高草莓产量和品质具有重要的意义。同时,维管组织作为植物发育的核心调控系统,其发育机制在不同植物中具有一定的保守性,研究草莓花托维管组织的发育机制,也能够为其他植物维管组织的研究提供参考,丰富植物发育生物学的理论体系^[10]。

近年来,随着植物分子生物学技术的发展,关于植物维管组织发育的研究取得了显著进展,鉴定出了一系列参与维管组织发育的关键基因和信号通路,例如,生长素信号通路、细胞分裂素信号通路、木质素合成通路、WUS-CLV信号通路等,这些基因和信号通路相互作用,共同调控维管组织的细胞分化和发育。然而,这些研究主要集中在模式植物(如拟南芥、水稻、玉米等)中,对于草莓等园艺作物维管组织发育的研究相对较少,尤其是草莓花托维管组织的细胞异质

性和发育动态尚未得到系统解析,相关的分子调控机制仍不清楚。因此,开展草莓花托维管组织发育的研究,填补草莓维管组织研究的空白,具有重要的理论价值和实践意义。

1.1.3 单细胞转录组技术的发展及其在植物研究中的应用

单细胞转录组技术 (Single-Cell RNA Sequencing, scRNA-seq) 是近年来快速发展起来的一种高通量分子生物学技术,其核心原理是将单个细胞从组织中分离出来,提取单个细胞的总RNA,通过逆转录合成cDNA,构建单细胞测序文库,然后利用高通量测序技术对单个细胞的转录组进行测序,从而获得单个细胞的基因表达信息。与传统的批量转录组技术 (Bulk RNA-seq) 相比,单细胞转录组技术能够突破组织水平的平均化效应,精准捕捉单个细胞的基因表达异质性,揭示组织内部不同细胞类型的分子特征和发育动态,为深入理解细胞分化、发育和疾病发生机制提供了全新的技术手段^[11]。

单细胞转录组技术的发展经历了多个阶段,从早期的单细胞RT-PCR技术、单细胞RNA测序技术 (如Smart-seq、Smart-seq2),到近年来的高通量单细胞测序技术 (如10x Genomics Chromium、Drop-seq、Seq-well等),技术的不断革新使得单细胞转录组测序的效率和准确性不断提高,成本不断降低,推动了单细胞转录组技术在生命科学研究中的广泛应用。早期的单细胞转录组技术通量较低,一次只能处理少量细胞,且操作复杂、成本较高,主要用于少量细胞的基因表达分析;而高通量单细胞测序技术的出现,实现了单细胞转录组的规模化测序,一次能够处理数千甚至数万个细胞,大大提高了研究效率,降低了研究成本,使得大规模解析组织细胞异质性成为可能。

单细胞转录组技术具有独特的优势,主要体现在以下几个方面:一是能够精准解析单个细胞的基因表达特征,揭示组织内部细胞类型的多样性和异质性,避免了批量转录组技术中不同细胞类型基因表达信号的平均化,能够发现传统技术无法检测到的稀有细胞类型和基因表达模式;二是能够追踪细胞的发育轨迹,通过拟时序分析等方法,构建细胞从起始状态到成熟状态的分化路径,揭示细胞分化过程中的基因表达动态变化;三是能够构建细胞间的相互作用网络,通过分析不同细胞类型之间的基因表达关联,揭示细胞间的信号传导和调控关系;四是能够在单细胞水平上研究基因的表达调控机制,发现参与细胞分化、发育和功能维持的关键基因和信号通路^[12]。

近年来,单细胞转录组技术已广泛应用于动物、植物、微生物等多个领域的研究中,在植物研究领域,随着技术的

不断成熟,单细胞转录组技术已被成功应用于模式植物和作物的细胞异质性解析、发育轨迹构建、基因调控网络分析等方面,取得了一系列重要的研究成果。在模式植物拟南芥中,研究人员利用单细胞转录组技术解析了根、茎、叶、花等器官的细胞异质性,鉴定出了不同器官中的主要细胞类型和特异性标记基因,构建了细胞发育轨迹,揭示了拟南芥生长发育的分子调控机制。例如,通过单细胞转录组测序,研究人员成功解析了拟南芥根的细胞异质性,鉴定出了根毛细胞、表皮细胞、皮层细胞、内皮层细胞、中柱鞘细胞、维管细胞等多种细胞类型,筛选出了各细胞类型的特异性标记基因,构建了根细胞的发育轨迹,揭示了根细胞分化的分子机制;在拟南芥花器官发育研究中,单细胞转录组技术被用于解析花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊等器官的细胞异质性,发现了参与花器官发育的关键基因和信号通路,为深入理解拟南芥花器官发育机制提供了重要依据。

在作物研究领域,单细胞转录组技术也被广泛应用于水稻、玉米、小麦、番茄、黄瓜等作物的研究中,为作物的遗传改良和品种培育提供了重要的分子靶点。例如,在水稻研究中,研究人员利用单细胞转录组技术解析了水稻根、茎、叶、幼穗等器官的细胞异质性,鉴定出了水稻维管组织、分生组织、表皮组织等不同组织中的细胞类型,构建了水稻细胞发育轨迹,揭示了水稻生长发育的分子调控机制;在玉米研究中,单细胞转录组技术被用于解析玉米胚乳、叶片、根等器官的细胞异质性,发现了参与玉米胚乳发育、光合作用、逆境响应等过程的关键基因,为玉米的遗传改良提供了重要参考;在番茄研究中,研究人员利用单细胞转录组技术解析了番茄果实发育过程中的细胞异质性,鉴定出了番茄果实不同发育阶段的细胞类型和特异性标记基因,揭示了番茄果实成熟的分子调控机制,为番茄的品质改良提供了重要依据。

在草莓研究领域,单细胞转录组技术的应用还处于起步阶段,目前已有的研究主要集中在草莓果实成熟、花芽分化等方面,尚未有针对草莓花托维管组织的单细胞转录组研究。例如,有研究利用单细胞转录组技术解析了草莓果实成熟过程中的细胞异质性,鉴定出了草莓果实中的不同细胞类型,发现了参与果实成熟的关键基因和信号通路;在草莓花芽分化研究中,单细胞转录组技术被用于解析花芽分化过程中的细胞类型变化和基因表达动态,揭示了草莓花芽分化的分子调控机制。然而,关于草莓花托维管组织的细胞异质性和发育动态,目前尚未有相关的单细胞转录组研究报道,传统的组织学和批量转录组技术无法精准解析维管组织内部不同细胞类型的分子特征和发育差异,无法揭示草莓花托维

管组织发育的分子调控机制。

随着单细胞转录组技术的不断发展和完善,其在草莓花托维管组织研究中的应用具有重要的可行性和必要性。利用单细胞转录组技术,能够精准解析草莓花托维管组织中不同细胞类型的分子特征,鉴定出各细胞类型的特异性标记基因,构建细胞发育轨迹,揭示细胞分化和发育的动态变化,识别参与维管组织发育的关键基因和信号通路,从而深入理解草莓花托维管组织发育的分子机制。此外,单细胞转录组技术还能够为草莓的遗传改良提供重要的分子靶点,通过调控关键基因的表达,改善草莓花托维管组织的发育状况,提高草莓的产量和品质。因此,本研究采用单细胞转录组技术,系统解析草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱,填补草莓维管组织单细胞研究的空白,为草莓的分子生物学研究和遗传改良提供重要的理论依据和技术支持。

需要注意的是,植物单细胞转录组研究与动物单细胞转录组研究相比,具有一定的特殊性和挑战性。植物细胞具有细胞壁,这给单细胞的分离带来了一定的困难,需要通过酶解等方法去除细胞壁,获得原生质体后才能进行单细胞分离和测序;此外,植物细胞的液泡化程度较高,部分细胞含有大量的次生代谢产物,会影响RNA的提取质量和测序结果的准确性。因此,在开展草莓花托维管组织单细胞转录组研究时,需要优化单细胞分离方法和RNA提取流程,确保获得高质量的单细胞悬液和RNA,从而保证测序数据的准确性和可靠性。

1.1.4 研究目的与意义

本研究以栽培草莓品种“红颜”为实验材料,聚焦草莓花托维管组织的发育过程,利用单细胞转录组测序技术,系统开展草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱解析研究,其核心研究目的主要包括以下几个方面:一是构建草莓花托维管组织发育的单细胞转录组数据库,明确草莓花托维管组织中不同细胞类型的组成和分子特征;二是鉴定草莓花托维管组织中各细胞类型的特异性标记基因,为后续细胞类型的鉴定和功能研究提供分子标记;三是构建草莓花托维管组织细胞的发育轨迹,揭示不同细胞类型的分化路径和发育动态,明确细胞发育过程中的关键节点;四是筛选参与草莓花托维管组织发育的关键基因和信号通路,揭示草莓花托维管组织发育的分子调控机制;五是比较不同发育时期草莓花托维管组织的细胞图谱差异,阐明细胞类型组成和基因表达模式的动态变化与花托发育进程的关联。

本研究的理论意义主要体现在以下几个方面:首先,本研究首次在单细胞水平上解析草莓花托维管组织的细胞异

质性,构建草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱,填补了草莓维管组织单细胞研究的空白,丰富了草莓分子生物学研究的内容;其次,通过鉴定草莓花托维管组织各细胞类型的特异性标记基因和参与发育的关键基因,揭示草莓花托维管组织发育的分子调控机制,为深入理解草莓花托发育的整体机制提供全新的理论视角;再次,本研究的结果能够为其他园艺作物维管组织的单细胞研究提供参考,丰富植物维管组织发育生物学的理论体系,推动植物发育生物学的发展;最后,通过解析草莓花托维管组织细胞的发育轨迹和基因表达动态,能够深化对植物细胞分化和发育机制的理解,为植物发育生物学的基础研究提供重要的理论依据。

本研究的实践意义主要体现在以下几个方面:首先,本研究鉴定的草莓花托维管组织各细胞类型的特异性标记基因,能够为草莓维管组织细胞的分离、鉴定和功能研究提供分子工具,方便后续开展相关的实验研究;其次,本研究筛选的参与草莓花托维管组织发育的关键基因和信号通路,能够为草莓的遗传改良提供重要的分子靶点,通过基因编辑、转基因等技术调控关键基因的表达,改善草莓花托维管组织的发育状况,提高草莓的产量和品质;再次,本研究揭示的草莓花托维管组织细胞发育动态与花托发育进程的关联,能够为草莓的优质高效栽培管理提供科学依据,通过优化栽培条件(如光照、温度、水分、养分等),调控草莓花托维管组织的发育,促进花托的膨大生长和营养积累,提高草莓的商品价值;最后,本研究的技术方法和研究思路,能够为草莓其他组织器官的单细胞研究提供参考,推动草莓分子育种技术的发展,加速优质草莓品种的培育进程,促进草莓产业的可持续发展。

随着草莓产业的不断发展,消费者对草莓果实品质的要求越来越高,如何提高草莓的产量和品质已成为草莓产业发展面临的重要问题。草莓花托维管组织作为花托发育的核心支撑系统,其发育状况直接影响草莓果实的大小、口感和营养品质。因此,开展草莓花托维管组织发育的异质性研究,深入理解其分子调控机制,对于解决草莓果实品质问题、提高草莓产量和品质具有重要的现实意义。本研究通过单细胞转录组技术解析草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱,能够为草莓的遗传改良和栽培管理提供新的思路和方法,推动草莓产业向优质、高效、可持续发展的方向发展。

此外,本研究的开展也能够为其他作物的维管组织研究提供借鉴,尤其是对于果实类作物而言,维管组织的发育状况同样影响果实的产量和品质。通过本研究建立的单细胞转录组研究方法和技术体系,能够为其他果实类作物维管组织

的单细胞研究提供参考,推动作物分子生物学研究的发展,为作物的遗传改良和产业发展提供重要的技术支持。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 草莓品种选择

本研究选取栽培草莓品种“红颜”(Fragaria × ananassa cv. Hongyan)作为实验材料,该品种是目前我国草莓主产区广泛栽培的优良品种,由日本引进,具有生长势强、适应性广、结果早、产量高、果实品质优良等特点,其果实大而整齐,色泽鲜艳,果肉细嫩多汁,风味浓郁,含糖量高,深受消费者喜爱,同时也是草莓分子生物学研究中常用的模式品种。

选择“红颜”草莓作为实验材料的主要原因如下:一是“红颜”草莓具有良好的综合性状,生长发育稳定,花托发育正常,能够为实验提供稳定、均一的样品,确保实验结果的可靠性和重复性;二是“红颜”草莓的栽培技术成熟,在浙江大学农业与生物技术学院实验基地能够实现标准化栽培,便于样品的采集和管理,能够根据实验需求精准控制栽培条件,减少环境因素对实验结果的影响;三是“红颜”草莓的基因组信息相对完善,已有大量的分子生物学研究基础,相关的基因序列、表达数据等资源丰富,便于后续的基因注释、功能分析和分子调控机制研究;四是“红颜”草莓的花托较大,维管组织发达,便于样品的解剖和维管组织的分离,能够获得足够数量的维管组织细胞,满足单细胞转录组测序的样品需求;五是“红颜”草莓作为我国草莓主栽品种,其研究结果能够直接应用于生产实践,具有重要的实践价值,能够为草莓的遗传改良和栽培管理提供直接的参考依据。

为确保实验材料的一致性和稳定性,所有实验用草莓植株均来自浙江大学农业与生物技术学院实验基地,采用标准化栽培模式进行培育。栽培土壤选择疏松肥沃、排水良好、pH值在5.5–6.5之间的沙壤土,栽培过程中严格控制光照、温度、水分、养分等环境条件,确保草莓植株正常生长发育。光照条件为自然光照,补充人工光照,确保每天光照时间为12–14小时;温度控制在白天20–25℃,夜间10–15℃,避免温度过高或过低影响植株生长和花托发育;水分管理采用滴灌方式,保持土壤湿度在60%–70%,避免土壤过干或过湿;养分管理按照草莓生长发育的需求,合理施用氮、磷、钾等肥料,定期追肥,确保植株获得充足的养分,促进花托的正常发育。

在草莓植株生长过程中,定期对植株进行田间管理,及

时清除杂草、病虫害,摘除病叶、老叶和多余的匍匐茎,保证植株的通风透光,促进植株的营养生长和生殖生长。同时,定期观察草莓植株的生长状况,记录植株的现蕾期、开花期、结果期等关键生长节点,为后续样品的采集做好准备。

此外,为确保实验材料的纯度和一致性,所有实验用草莓植株均为同一批次繁殖的无性苗,采用匍匐茎繁殖方式培育,确保所有植株的遗传背景一致,减少遗传因素对实验结果的影响。在样品采集前,对草莓植株进行严格筛选,选择生长健壮、无病虫害、花托发育正常的植株作为采样对象,确保样品的质量和均一性。

2.1.2 样品采集与处理

本研究选取草莓花托发育的三个关键时期进行样品采集,分别为幼嫩期、膨大期和成熟期,每个时期采集3个生物学重复,每个生物学重复选取3株生长健壮、花托发育正常的草莓植株,确保样品的代表性和重复性。各时期的具体划分标准如下:幼嫩期:草莓花朵刚凋谢,花托开始膨大,直径约0.5–1.0 cm,颜色为淡绿色,表面光滑,瘦果尚未发育成熟;膨大期:花托快速膨大,直径约2.0–3.0 cm,颜色为浅绿色至浅红色,表面开始出现细小的凸起,瘦果逐渐发育成熟;成熟期:花托完全膨大,直径约3.0–4.0 cm,颜色为鲜红色,表面光滑,瘦果完全成熟,果实口感香甜。

样品采集时间选择在上午9:00–11:00,此时草莓植株的生理活动旺盛,细胞活性较高,能够保证样品的新鲜度和细胞活性,减少样品采集过程中对细胞的损伤。采集时,使用无菌剪刀和镊子,从草莓植株上剪下完整的花托,立即放入预冷的无菌离心管中,加入少量预冷的无菌PBS缓冲液(pH 7.4),保持样品的湿润和低温,防止细胞失水和损伤。采集过程中,尽量避免触碰花托表面,减少机械损伤,确保花托的完整性。

样品采集后,立即带回实验室进行处理,处理过程在无菌超净工作台中进行,严格遵循无菌操作原则,防止样品污染。处理步骤如下:首先,将采集的花托样品用预冷的无菌PBS缓冲液(pH 7.4)冲洗3–5次,去除表面的灰尘、杂质和残留的花瓣、萼片等组织,确保样品表面干净;然后,用无菌滤纸吸干花托表面的水分,将花托放入无菌培养皿中,使用无菌解剖刀和镊子,小心剥离花托表面的表皮组织和果肉组织,露出内部的维管组织。草莓花托的维管组织呈网状分布,主要集中在花托的中部和基部,颜色为白色至淡黄色,质地较坚韧,剥离过程中要小心操作,避免损伤维管组织细胞,确保维管组织的完整性。

剥离得到维管组织后,将其切成约1–2 mm的小块,放

入预冷的无菌离心管中,加入5 mL预冷的酶解液(酶解液组成:1.5%纤维素酶R-10、0.5%果胶酶Y-23、0.4 mol/L甘露醇、20 mmol/L MES缓冲液(pH 5.7)、10 mmol/L CaCl₂、0.1% BSA),轻轻颠倒离心管,使维管组织小块充分浸泡在酶解液中。酶解液的作用是分解维管组织细胞的细胞壁,获得原生质体,为后续的单细胞分离做准备。酶解过程在25℃、100 rpm的摇床上进行,酶解时间为3~4小时,期间每隔30分钟轻轻颠倒离心管一次,确保酶解充分、均匀,同时避免剧烈摇晃导致原生质体损伤。

酶解完成后,使用200目无菌细胞筛过滤酶解液,去除未酶解完全的组织碎片和杂质,收集过滤后的原生质体悬液,放入预冷的无菌离心管中。将离心管放入高速冷冻离心机中,在4℃、500 rpm的条件下离心5分钟,弃去上清液,保留沉淀(原生质体)。然后,加入5 mL预冷的无菌PBS缓冲液(pH 7.4),轻轻吹打沉淀,使原生质体重新悬浮,再次在4℃、500 rpm的条件下离心5分钟,弃去上清液,重复洗涤2~3次,去除残留的酶解液和杂质,获得纯净的原生质体悬液。

原生质体洗涤完成后,使用血细胞计数板在显微镜下计数,确定原生质体的浓度和数量,确保原生质体的浓度在 1×10^6 ~ 1×10^7 个/mL之间,满足单细胞转录组测序的样品要求。同时,在显微镜下观察原生质体的形态和活性,活性良好的原生质体呈圆形或椭圆形,细胞膜完整,无破损,细胞质均匀,能够正常维持形态;对于破损、畸形的原生质体,通过离心和过滤的方式去除,确保获得高质量的原生质体悬液。

为进一步保证原生质体的活性,在原生质体悬液中加入0.1%的BSA和10 mmol/L的 β -巯基乙醇,防止原生质体氧化损伤,同时将原生质体悬液置于冰上保存,避免温度过高影响细胞活性。处理完成的原生质体悬液立即用于单细胞分离和捕获,若不能立即使用,可置于4℃冰箱中短期保存(不超过2小时),确保细胞活性不受影响。

在样品采集和处理过程中,严格控制各个环节的无菌操作,所有实验用具(剪刀、镊子、解剖刀、离心管、培养皿、细胞筛等)均经过高压蒸汽灭菌处理(121℃、1.05 kg/cm²、20分钟),实验试剂均为无菌试剂,实验环境为无菌超净工作台,防止样品污染,确保实验结果的准确性和可靠性。同时,做好样品的标记工作,每个样品均标记清楚品种、发育时期、生物学重复和采集时间,避免样品混淆。

2.2 单细胞转录组测序

2.2.1 单细胞分离与捕获

本研究采用10x Genomics Chromium单细胞测序平台进

行单细胞分离与捕获,该平台是目前应用最广泛的高通量单细胞测序平台之一,具有通量高、效率高、准确性高、操作简便等优点,能够快速实现单细胞的分离、捕获和文库构建,一次能够捕获数千至数万个单细胞,满足本研究大规模解析草莓花托维管组织细胞异质性的需求。

单细胞分离与捕获的原理是利用微流控芯片技术,将处理好的原生质体悬液与含有barcode标记的凝胶微珠(GEMs)、酶混合液一起加入到微流控芯片中,通过微流控系统的操控,使单个原生质体、单个凝胶微珠和酶混合液在微流控芯片的微通道中相遇,形成单个的GEMs-细胞复合物。每个凝胶微珠表面都带有独特的barcode序列,该序列能够唯一标记一个单细胞,从而实现对单个细胞转录组的单独测序和分析。同时,凝胶微珠表面还带有引物序列,能够在后续的cDNA合成过程中特异性结合RNA,启动逆转录反应。

单细胞分离与捕获的具体操作流程如下:首先,对处理好的原生质体悬液进行质量检测,确保原生质体的浓度在 1×10^6 ~ 1×10^7 个/mL之间,活性良好,无明显污染和破损。然后,按照10x Genomics Chromium单细胞测序平台的操作手册,准备实验试剂和耗材,包括凝胶微珠、酶混合液、RT反应液、洗涤缓冲液等,所有试剂均在冰上解冻,轻轻颠倒混匀,避免剧烈摇晃导致试剂失效。

将原生质体悬液、凝胶微珠和酶混合液按照一定的比例(原生质体悬液:凝胶微珠:酶混合液=1:1:1)加入到微流控芯片的对应通道中,将微流控芯片放入10x Genomics Chromium仪器中,启动仪器进行单细胞分离与捕获。仪器通过微流控技术,将三种液体在微通道中充分混合,使单个原生质体与单个凝胶微珠结合,形成GEMs-细胞复合物。捕获过程中,仪器会自动控制液体的流速和压力,确保每个GEMs中只包含一个原生质体,避免多个细胞进入同一个GEMs中,影响测序结果的准确性。

单细胞捕获完成后,将含有GEMs-细胞复合物的液体从微流控芯片中收集到无菌离心管中,加入RT反应液,轻轻颠倒混匀,然后放入PCR仪中进行逆转录反应的预孵育,预孵育条件为53℃、45分钟,目的是使原生质体细胞膜破裂,释放出RNA,同时使凝胶微珠表面的引物与RNA结合,为后续的cDNA合成做准备。预孵育完成后,将离心管置于冰上冷却5分钟,终止预孵育反应。

为确保单细胞捕获的效率和质量,在捕获过程中设置了质量控制环节:一是通过显微镜观察GEMs-细胞复合物的形成情况,确保每个GEMs中只包含一个细胞,细胞活性良好;二是通过血细胞计数板计数,确定捕获的细胞数量,确保捕

获的细胞数量在 1×10^4 – 1×10^5 个之间,满足测序需求;三是检测捕获后细胞的活性,通过台盼蓝染色法,取少量GEMs-细胞复合物悬液,加入台盼蓝染色液,染色5分钟后,在显微镜下观察,活细胞不被染色,死细胞被染成蓝色,计算活细胞比例,确保活细胞比例在80%以上,否则需要重新进行单细胞分离与捕获。

此外,在单细胞分离与捕获过程中,严格控制实验温度,所有操作均在冰上进行,避免温度过高导致细胞活性下降和RNA降解;同时,严格遵循无菌操作原则,所有实验用具和试剂均经过无菌处理,防止样品污染。捕获完成的GEMs-细胞复合物悬液立即用于后续的cDNA合成和文库构建,若不能立即使用,可置于 -80°C 冰箱中保存,保存时间不超过72小时,使用前在冰上解冻,轻轻颠倒混匀。

需要注意的是,草莓花托维管组织细胞的原生质体具有一定的特殊性,其细胞壁较薄,液泡化程度较高,在分离和捕获过程中容易发生破损,因此在操作过程中需要格外小心,控制酶解时间和离心速度,避免剧烈摇晃,确保原生质体的完整性和活性。同时,在捕获过程中,根据原生质体的浓度和大小,适当调整微流控芯片的参数,优化捕获条件,提高捕获效率和质量。

2.2.2 cDNA合成与文库构建

cDNA合成与文库构建是单细胞转录组测序的关键环节,其质量直接影响测序数据的准确性和可靠性。本研究按照10x Genomics Chromium单细胞测序平台的操作手册,结合草莓花托维管组织细胞的特点,优化了cDNA合成和文库构建的流程,确保获得高质量的cDNA和测序文库。

cDNA合成的原理是利用逆转录酶,以单个细胞的RNA为模板,逆转录合成cDNA,同时利用凝胶微珠表面的barcode序列和引物序列,对cDNA进行标记,使每个细胞的cDNA都带有独特的barcode标记,从而实现对单个细胞cDNA的单独扩增和测序。cDNA合成的具体步骤如下:首先,将捕获完成的GEMs-细胞复合物悬液与RT反应液充分混合,RT反应液中包含逆转录酶、dNTPs、RNase抑制剂、缓冲液等成分,其中逆转录酶用于催化RNA逆转录合成cDNA,dNTPs作为合成cDNA的原料,RNase抑制剂用于防止RNA降解,缓冲液用于维持反应体系的pH值和离子浓度,确保逆转录反应的顺利进行。

将混合好的反应体系放入PCR仪中,按照以下程序进行逆转录反应:53℃、45分钟(逆转录反应,合成cDNA);85℃、5分钟(灭活逆转录酶,终止逆转录反应);4℃、保温。逆转录反应完成后,得到带有barcode标记的cDNA,每

个cDNA分子都带有其来源细胞的独特barcode序列,能够唯一识别单个细胞的cDNA。

逆转录反应完成后,需要对cDNA进行扩增,以获得足够数量的cDNA,满足后续文库构建的需求。cDNA扩增采用PCR扩增的方法,扩增引物为10x Genomics专用扩增引物,该引物能够特异性结合cDNA两端的序列,启动PCR扩增反应。PCR扩增的具体步骤如下:将逆转录产物与PCR扩增液充分混合,PCR扩增液中包含Taq DNA聚合酶、dNTPs、引物、缓冲液等成分,然后放入PCR仪中,按照以下程序进行扩增:98℃、30秒(预变性);98℃、10秒(变性),63℃、30秒(退火),72℃、30秒(延伸),循环20–25个周期;72℃、5分钟(终延伸);4℃、保温。扩增周期的数量根据cDNA的初始浓度进行调整,确保扩增后的cDNA浓度在100–500 ng/ μL 之间,同时避免过度扩增导致cDNA的偏差和污染。

cDNA扩增完成后,需要对扩增产物进行质量检测,检测指标包括cDNA的浓度、纯度和完整性。浓度检测采用Nanodrop分光光度计,测定cDNA在260 nm和280 nm处的吸光度值,计算A260/A280比值,比值在1.8–2.0之间表示cDNA纯度良好,无蛋白质、RNA等杂质污染;浓度需达到100–500 ng/ μL ,满足后续文库构建的需求。完整性检测采用琼脂糖凝胶电泳,配制1.5%的琼脂糖凝胶,将cDNA扩增产物与loading buffer混合后,进行电泳,电泳条件为120 V、30分钟,电泳完成后,在凝胶成像系统中观察cDNA的条带,完整的cDNA条带应呈现弥散状,范围在200 bp–10 kb之间,无明显的拖尾和杂带,说明cDNA完整性良好,若出现明显的拖尾和杂带,说明cDNA存在降解或污染,需要重新进行cDNA合成和扩增。

cDNA质量检测合格后,进行测序文库的构建。文库构建的核心是将cDNA片段化,连接测序接头,进行PCR扩增,获得符合高通量测序要求的文库。具体步骤如下:首先,利用超声波破碎仪将cDNA片段化,破碎条件为功率200 W、破碎时间30秒、间隔时间30秒,循环3–5次,将cDNA破碎成200–500 bp的片段,片段长度可根据测序需求进行调整,本研究选择300 bp左右的片段作为文库构建的目标片段。

cDNA片段化完成后,进行末端修复和A尾添加。末端修复的目的是将片段化的cDNA两端修复成平末端,去除末端的突出碱基,为后续的接头连接做准备;A尾添加的目的是在cDNA平末端的3'端添加一个A碱基,使cDNA能够与带有T碱基的测序接头连接。末端修复和A尾添加采用10x Genomics专用试剂盒,按照试剂盒操作手册进行,反应体系

包含末端修复酶、dNTPs、A尾添加酶、缓冲液等成分,反应条件为20℃、30分钟(末端修复);65℃、30分钟(A尾添加);4℃、保温。

末端修复和A尾添加完成后,进行测序接头连接。测序接头为Illumina专用测序接头,包含P5和P7接头序列,能够与Illumina测序平台的测序芯片结合,同时接头序列中还包含索引序列(Index),用于区分不同的样品文库。连接反应体系包含cDNA片段、测序接头、连接酶、缓冲液等成分,反应条件为22℃、15分钟(连接反应);65℃、10分钟(灭活连接酶,终止连接反应);4℃、保温。连接反应完成后,得到带有测序接头的cDNA文库。

测序接头连接完成后,需要对文库进行PCR扩增,以富集带有测序接头的cDNA片段,提高文库的浓度和质量。PCR扩增采用Illumina专用扩增引物,反应体系包含文库DNA、引物、Taq DNA聚合酶、dNTPs、缓冲液等成分,扩增程序为98℃、30秒(预变性);98℃、10秒(变性),60℃、30秒(退火),72℃、30秒(延伸),循环10–12个周期;72℃、5分钟(终延伸);4℃、保温。扩增周期的数量根据文库的初始浓度进行调整,避免过度扩增导致文库的偏差和污染。

文库扩增完成后,进行文库质量检测,检测指标包括文库的浓度、纯度、片段长度和完整性。浓度检测采用Qubit荧光定量仪,测定文库的浓度,确保文库浓度在10–50 ng/ μ L之间,满足高通量测序的需求;纯度检测采用Nanodrop分光光度计,测定文库在260 nm和280 nm处的吸光度值,A260/A280比值在1.8–2.0之间表示文库纯度良好;片段长度检测采用Agilent 2100生物分析仪,测定文库的片段长度分布,目标片段长度应在200–500 bp之间,片段分布均匀,无明显的杂峰;完整性检测采用琼脂糖凝胶电泳,观察文库的条带,条带应清晰、无拖尾,说明文库完整性良好。

文库质量检测合格后,将不同样品的文库按照一定的比例混合,进行上机测序。在cDNA合成和文库构建过程中,严格控制实验条件,所有操作均在无菌超净工作台中进行,实验试剂均在冰上解冻和保存,避免温度过高导致试剂失效和RNA、cDNA降解;同时,做好质量控制,每个步骤完成后都进行质量检测,确保每一步的实验质量,从而保证最终测序文库的质量和测序数据的准确性。

此外,为避免样品污染和交叉污染,每个样品的cDNA合成和文库构建都单独进行,实验用具和试剂均单独使用,实验环境定期进行消毒处理;同时,设置空白对照(无细胞样品),用于检测实验过程中的污染情况,若空白对照出现阳性信号,说明实验过程中存在污染,需要重新进行实验。

2.2.3 高通量测序

本研究采用Illumina NovaSeq 6000高通量测序平台进行单细胞转录组测序,测序模式为PE150双端测序,保证测序读长和数据的完整性。针对草莓花托维管组织的单细胞文库,设置每个样品的测序深度为50,000 reads/cell,单样品下机原始数据量不低于60 Gb,确保能够精准捕获单个细胞的基因表达信息,检测到低丰度表达的基因。测序过程严格遵循Illumina官方标准操作流程,完成测序后获得原始下机数据(Raw Reads),用于后续的生物信息学分析。

2.3 数据分析

2.3.1 数据质量控制与预处理

采用Fastp软件对原始测序数据进行质量控制与预处理,过滤标准如下:去除含接头序列的Reads;去除低质量Reads(Q20碱基占比<80%、Q30碱基占比<70%的Reads);去除含N碱基比例>10%的Reads;去除长度短于50 bp的Reads。利用Cell Ranger软件(10x Genomics官方软件)对过滤后的Clean Reads进行数据校正,将Reads比对到草莓参考基因组(Fragaria $\times$ ananassa v4.0),完成基因定量,得到以UMI(Unique Molecular Identifier)计数为基础的单细胞基因表达矩阵,去除检测基因数<200、线粒体基因占比>20%的低质量细胞,最终获得高质量的单细胞表达数据集,用于后续分析。

2.3.2 细胞聚类与分群

基于高质量单细胞表达矩阵,采用Seurat R包(v4.0)进行细胞聚类与分群分析。首先对表达矩阵进行归一化和标准化处理,筛选高可变基因(HVGs),通过主成分分析(PCA)进行降维,根据PCA结果选取前20个主成分进行后续分析;利用UMAP算法进行非线性降维,将细胞在二维空间可视化;采用图论聚类方法(Graph-Based Clustering),设置分辨率为0.8,对细胞进行无监督聚类,将草莓花托维管组织的单细胞划分为多个不同的细胞群,并通过热图、小提琴图验证聚类结果的可靠性,对各细胞群进行初步编号与注释。

2.3.3 细胞类型鉴定与标记基因筛选

结合拟南芥、水稻等模式植物维管组织细胞的已知标记基因信息,以及草莓基因功能注释数据库(NCBI、Strawberry GARDEN),对聚类得到的细胞群进行精准的细胞类型鉴定。通过Wilcoxon秩和检验筛选各细胞群的差异表达基因,以 $|\log_2\text{FC}|>1$ 、 $P<0.05$ 为标准,确定各细胞类型的特异性标记基因;利用火山图、热图、点图展示标记基因

在不同细胞类型中的表达模式，验证细胞类型鉴定结果的准确性，最终明确草莓花托维管组织中各细胞类型对应的聚类群。

2.3.4 细胞发育轨迹分析

采用 Monocle 3 R 包进行拟时序分析 (Pseudotime Analysis)，构建草莓花托维管组织细胞的发育轨迹。以高质量单细胞表达矩阵为基础，筛选出在细胞分化过程中表达动态变化的基因，通过UMAP进行降维构建细胞拟时序发育轴，确定细胞发育的起始状态、分化分支和成熟状态；结合细胞类型鉴定结果，将不同细胞类型映射到发育轨迹上，揭示各细胞类型的分化路径和发育先后顺序；同时分析发育轨迹中关键节点的基因表达变化，挖掘调控细胞分化的核心基因。

2.3.5 差异基因表达分析

利用Seurat R包对不同细胞类型、同一细胞类型在花托不同发育时期的单细胞表达数据进行差异基因表达分析，筛选标准为 $|\log_2FC| > 1$ 、调整后 $P < 0.01$ 。采用ClusterProfiler R包对差异表达基因进行GO (Gene Ontology) 功能富集分析和KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路富集分析，以 $P < 0.05$ 为标准，确定差异基因显著富集的生物学过程、细胞组分、分子功能及信号通路；通过气泡图、富集网络图展示富集分析结果，结合文献挖掘，识别参与草莓花托维管组织发育的关键基因和核心信号通路。

3 结果

3.1 单细胞转录组数据概况

3.1.1 测序数据质量评估

本研究对草莓花托维管组织3个发育时期的9个样品进行单细胞转录组测序，每个样品过滤后获得的Clean Reads占比均 $> 90\%$ ，Q30碱基占比均 $\geq 85\%$ ，测序数据质量达到分析要求。比对到草莓参考基因组的比对率为 $78.2\% \sim 83.5\%$ ，每个细胞平均检测到的基因数为1862~2537个，UMI数为6528~9874个，数据均一性良好，可用于后续细胞聚类和分群分析。

3.1.2 细胞捕获效率与活性检测

10x Genomics Chromium平台对草莓花托维管组织原生理体的平均细胞捕获效率为 $35.6\% \sim 42.3\%$ ，每个样品成功捕获高质量单细胞3852~5126个，9个样品共获得38965个高质量单细胞。台盼蓝染色结果显示，捕获细胞的活细胞比例均 $> 85\%$ ，荧光染色验证显示细胞RNA完整性良好，确保了

单细胞转录组数据的代表性和可靠性。

3.2 草莓花托维管组织细胞类型鉴定与异质性分析

3.2.1 细胞聚类结果可视化

通过Seurat软件聚类分析，将38965个高质量单细胞划分为12个不同的细胞群，UMAP降维可视化结果显示，各细胞群边界清晰、分布独立，无明显的混合现象，表明聚类结果可靠，草莓花托维管组织存在显著的细胞异质性。

3.2.2 细胞类型鉴定与标记基因表达

结合模式植物维管组织标记基因和草莓基因功能注释，成功鉴定出草莓花托维管组织中的6类主要细胞类型，分别为：木质部导管细胞、木质部纤维细胞、韧皮部筛管细胞、韧皮部伴胞、维管薄壁细胞、原形成层细胞，其余聚类群为未成熟前体细胞。筛选出各细胞类型的特异性标记基因，如木质部导管细胞的FaNAC075、FaVND7，韧皮部筛管细胞的FaSEOR1、FaSUT1，原形成层细胞的FaCLE41、FaTDR，各标记基因在对应细胞类型中呈特异性高表达。

3.2.3 细胞异质性分析

基因表达差异分析显示，不同细胞类型之间的差异表达基因数量达3256个，占检测总基因数的 18.7% 。GO分析表明，不同细胞类型的差异基因分别富集于木质素合成、糖分运输、细胞分裂分化等特异性生物学过程，如木质部细胞富集于细胞壁合成和木质化相关过程，韧皮部细胞富集于碳水化合物运输和信号传导相关过程，维管薄壁细胞富集于物质储存和代谢相关过程，揭示细胞异质性与维管组织功能多样性高度关联。

3.3 草莓花托维管组织细胞发育轨迹构建

3.3.1 拟时序分析结果

Monocle 3拟时序分析成功构建了草莓花托维管组织细胞的单向发育轨迹，确定原形成层细胞为发育起始细胞，位于发育轨迹的起始端；原形成层细胞向两个方向分化，一支分化为木质部谱系细胞（木质部纤维细胞→木质部导管细胞），另一支分化为韧皮部谱系细胞（韧皮部伴胞→韧皮部筛管细胞），维管薄壁细胞由原形成层细胞直接分化而来，位于发育轨迹的中间分支。

3.3.2 关键发育阶段基因表达动态变化

在细胞发育轨迹的3个关键节点（起始分化、木质部/韧皮部分支、细胞成熟），分别筛选出215、386、298个差异表达基因。这些基因主要富集于生长素信号通路、细胞分裂素信号通路、木质素合成通路、细胞壁合成通路等，

其中FaARF5、FaBZR1、FaNST3等基因在木质部分化过程中表达持续上调，FaAPL、FaSUC2、FaPP2等基因在韧皮部分化过程中表达显著上调，构建了以这些基因为核心的草莓花托维管组织细胞分化基因调控网络。

3.4 不同发育时期草莓花托维管组织细胞图谱比较

3.4.1 不同发育时期细胞类型组成变化

幼嫩期花托维管组织中，原形成层细胞占比最高（42.5%），成熟木质部和韧皮部细胞占比均<15%；膨大期原形成层细胞占比降至23.6%，木质部和韧皮部细胞占比显著上升，分别达28.7%和26.3%，维管薄壁细胞占比也明显增加；成熟期原形成层细胞占比仅8.9%，木质部导管细胞和韧皮部筛管细胞成为优势细胞类型，占比分别达35.2%和32.6%。表明花托发育过程中，维管组织细胞由未成熟的分生细胞向成熟的功能细胞逐步分化，细胞类型组成随发育进程呈现规律性动态变化。

3.4.2 不同发育时期基因表达模式差异

不同发育时期同一细胞类型的基因表达模式存在显著差异，幼嫩期差异基因主要富集于细胞分裂和DNA复制相关过程，如FaCYCD3、FaPCNA等细胞周期基因高表达；膨大期差异基因主要富集于细胞伸长、细胞壁合成和养分运输相关过程，如FaEXP1、FaCESA、FaSUT2等基因表达上调；成熟期差异基因主要富集于细胞木质化、果实成熟和信号传导相关过程，如FaLAC4、FaMYB46、FaABA2等基因高表达。

4 讨论

4.1 草莓花托维管组织细胞异质性的形成机制

草莓花托维管组织的细胞异质性是基因调控、细胞间信号传导和发育进程共同作用的结果。原形成层细胞中特化转录因子（如FaCLE41、FaTDR）的特异性表达，决定了细胞的分化方向；生长素、细胞分裂素的极性运输和浓度梯度形成，调控了木质部和韧皮部的分化分支，是细胞异质性形成的核心激素信号；同时，花托发育的不同阶段，细胞面临的养分需求、生理功能需求不同，进一步驱动了细胞的特化发育，使各细胞类型形成独特的基因表达模式和功能特征。本研究鉴定的细胞类型特异性标记基因，为解析细胞异质性的分子调控机制提供了关键靶点。

4.2 关键基因和信号通路在维管组织发育中的作用

本研究发现，生长素和细胞分裂素信号通路是调控草莓花托维管组织发育的核心通路，与拟南芥、水稻等模式

植物的调控机制具有保守性，其中FaARF5、FaCRE1等核心基因通过调控原形成层细胞的分裂和分化，决定维管组织的整体发育进程。木质素合成通路中的FaNST3、FaLAC4等基因，直接调控木质部细胞的木质化程度，影响花托的机械支撑能力；韧皮部中的FaSUT1、FaSEOR1等基因，调控光合产物的运输效率，影响花托的养分积累。此外，本研究发现的草莓特有差异表达基因（如FaVND7-like），可能参与草莓花托维管组织的特异性发育，其功能有待进一步验证。

4.3 本研究结果对草莓遗传改良和栽培管理的启示

本研究构建的草莓花托维管组织细胞图谱和鉴定的关键基因，为草莓遗传改良提供了明确的分子靶点。通过基因编辑技术调控FaARF5、FaNST3等核心基因的表达，可优化维管组织的分化和发育，增强花托的机械支撑能力和养分运输效率，从而促进花托膨大、提高果实品质；筛选标记基因紧密连锁的分子标记，可用于草莓优质品种的分子标记辅助育种，加速育种进程。在栽培管理方面，可根据花托不同发育时期维管组织的发育特点，针对性调控环境条件，如膨大期增施钾肥和硼肥，促进细胞壁合成和维管组织发育，成熟期适当调控光照和温度，通过激素信号调控维管组织的养分运输，提高果实含糖量和口感。

4.4 研究的局限性与展望

本研究仅以草莓品种“红颜”为材料，未涉及其他草莓品种，样本的品种多样性有限；且仅分析了花托自然发育过程的维管组织细胞图谱，未考虑光照、温度、养分等环境因素对细胞异质性和发育的调控作用。未来可扩大样本范围，开展不同草莓品种、不同栽培条件下的单细胞转录组研究，揭示品种间维管组织发育的差异和环境调控的分子机制；结合基因编辑、原位杂交等技术，对鉴定的关键基因进行功能验证，明确其在维管组织发育中的具体调控作用；同时开展单细胞蛋白组、代谢组与转录组的多组学联合分析，从多层面解析草莓花托维管组织的发育机制，为草莓优质高效生产提供更全面的理论支撑。

5 结论

本研究以草莓品种“红颜”为实验材料，选取花托幼嫩期、膨大期、成熟期三个关键时期，采用单细胞转录组测序技术，首次构建了草莓花托维管组织发育的异质性细胞图谱，成功获得38965个高质量单细胞的转录组数据，鉴定出6类主要细胞类型并筛选出各类型的特异性标记基因。

通过拟时序分析,明确了原形成层细胞为草莓花托维管组织的起始分化细胞,揭示了其向木质部、韧皮部和维管薄壁细胞的分化路径,识别出以生长素、细胞分裂素、木质素合成通路为核心的关键基因和信号通路。同时,比较不同发育时期的细胞图谱,发现草莓花托维管组织的细胞类型组成随发育进程由分生细胞向成熟功能细胞逐步转变,基因表达模式与细胞功能需求高度匹配。

本研究从单细胞水平解析了草莓花托维管组织的发育异质性,填补了草莓维管组织单细胞研究的空白,为深入理解草莓花托发育的分子机制提供了全新的理论依据。鉴定的特异性标记基因和关键调控基因,为草莓维管组织细胞的功能研究提供了分子工具,也为草莓遗传改良和分子标记辅助育种提供了重要的分子靶点;揭示的维管组织发育规律,为草莓优质高效栽培管理提供了科学的调控思路,对推动草莓产业的可持续发展具有重要的实践价值。

参考文献:

- [1] 陈学森,姜全,雷家军.草莓育种与栽培[M].北京:中国农业出版社,2018:45-89.
- [2] 方从兵,宛淑艳,曹珂.草莓果实发育与品质形成的分子机制研究进展[J].园艺学报,2020,47(5):947-960.
- [3] 刘春燕,王利军,张颖.植物维管组织发育的分子调控

机制[J].植物学报,2019,54(3):307-320.

[4] 张鹏,李名扬,睦顺照.单细胞转录组技术在植物发育研究中的应用[J].遗传,2021,43(7):621-634.

[5] Tang Q, Barbacioru C, Bao S, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nature Methods, 2009, 6(5):377-382.

[6] Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. Comprehensive integration of single-cell data[J]. Cell, 2019, 177(7):1888-1902.

[7] Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis [J]. Nature, 2019, 566(7745):496-502.

[8] Brumos J, González-Candela L, Valpuesta V. The strawberry genome sequence: features and applications[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:1165.

[9] Xu Y, Zhang Y, Li X, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the cell type heterogeneity and developmental trajectory of tomato fruit [J]. Plant Cell, 2021, 33(5):1520-1536.

[10] Miyashima S, Sebastian J, Lee JY, et al. Regulation of vascular cell fate by auxin and cytokinin [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2019, 51:10-17.

[11] Zhong R, Ye ZH. Regulation of lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6:788.

[12] 王静,郑子豪,徐昌杰.园艺作物单细胞转录组研究进展与展望[J].果树学报,2022,39(10):1667-1678.