

基于空间转录组的地黄块根细胞群体组成研究

张朋雨, 周梦杰, 高俊鸽, 胡靖翊, 郝秋雯, 丁 宁, 王丰青*

河南农业大学农学院, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 以地黄 *Rehmannia glutinosa* 品种 85-5 为试验材料, 借助 Stereo-seq 空间转录组技术解析地黄块根基因原位表达模式, 揭示块根细胞的表达空间异质性。方法 通过荧光信号与灰度值分析筛选地黄块根的最优透化时间和透化条件, 对比不同 Bin 分辨率的基因检出量与细胞聚类效果确定适配地黄块根分析的最佳 Bin 参数, 利用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 降维与均匀流形近似与投影 (uniform manifold approximation and projection, UMAP) 聚类方法完成块根细胞类群划分, 利用 Seurat 软件筛选各细胞类群差异表达基因, 以 qRT-PCR 验证空间转录组分析结果的可靠性。结果 18 min 为地黄块根冷冻切片的最佳透化时间。Bin 200 分辨率更适用于地黄块根的宏观细胞类群的解析。经 PCA 降维和 UMAP 聚类, 将地黄块根划分为 5 个细胞类群, 各细胞类群具有明显空间区位特异性, 其中类群 1 和类群 2 主要分布于韧皮部, 类群 3 主要分布于周皮, 类群 4 则主要分布于形成层。qRT-PCR 结果显示, *DH2020-016897* 为周皮特异表达的基因, *DH2020-009767* 和 *DH2020-009768* 在形成层中优势表达。结论 成功构建了地黄块根空间转录组图谱, 揭示了不同细胞类群的空间分布格局与部分基因的表达特征, 为深入解析地黄块根发育、次生代谢产物的合成及逆境应答的空间分子调控机制提供了重要参考。

关键词: 地黄; 块根; 空间转录组测序; 细胞群; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)18-7431-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.029

Study on cell population composition of *Rehmannia glutinosa* tuberous roots based on spatial transcriptomics

ZHANG Pengyu, ZHOU Mengjie, GAO Junge, HU Jingyi, HAO Qiuwen, DING Ning, WANG Fengqing

College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective Using cultivar 85-5 as the experimental material, Stereo-seq spatial transcriptomics technology was employed to analyze the *in situ* gene expression patterns of tuberous roots, thereby revealing the spatial heterogeneity of gene expression in root cells. **Methods** The optimal permeabilization duration was determined by fluorescence intensity and grayscale quantification, and the best bin resolution was identified by comparing gene detection efficiency and cell clustering performance across multiple parameter groups. Principal component analysis (PCA) and uniform manifold approximation and projection (UMAP) were used for cell clustering. Cluster-specific differentially expressed genes (DEGs) were identified using the Seurat package, and qRT-PCR was performed to validate the reliability of spatial transcriptomic data. **Results** The optimal permeabilization time for frozen sections of *R. glutinosa* tuberous roots is 18 min, and a bin size of 200 is more suitable for the analysis of macroscopic cell populations in *R. glutinosa* tuberous roots. Root cells of *R. glutinosa* were classified into five distinct populations with unique spatial localization via PCA and UMAP. Specifically, clusters 1 and 2 were predominantly distributed in the phloem, cluster 3 in the periderm, and cluster 4 in the cambium. The qRT-PCR verified that gene *DH2020-016897* was specifically expressed in the periderm, whereas *DH2020-009767* and *DH2020-009768* exhibited predominant expression in the cambium. **Conclusion** In this study, we established a high-resolution spatial transcriptomic atlas of *R. glutinosa* tuberous roots, delineating spatial distribution patterns of individual cell clusters and the expression profiles of key genes. These findings provide a fundamental resource for exploring tuberous roots development, secondary metabolite biosynthesis, and spatially resolved molecular regulatory networks underlying stress responses in *R. glutinosa*.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch.; tuberous root; spatial transcriptomics; cell cluster; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2026-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82373985); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

作者简介: 张朋雨, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源可持续利用。E-mail: lanqingxuan123@outlook.com

*通信作者: 王丰青, 教授, 研究方向为中药资源和分子生药学。E-mail: heauzyxcw@126.com

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 为玄参科草本植物, 以其地下膨大的块根为入药部位, 是著名的“四大怀药”之一^[1]。作为我国传统的大宗药材之一, 其药用历史悠久, 最早记载于《神农本草经》, 被列为上品。传统中医药理论认为地黄具备清热凉血、养阴生津等功效, 临床应用价值突出。现代药理学研究表明地黄含有丰富的环烯醚萜苷类成分、苯乙醇苷类成分和多糖类等多种活性成分^[2-3], 是地黄发挥药效作用的物质基础。研究表明, 地黄块根不同组织部位中梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、糖类等的含量有显著差异^[4-6]。而且, 不同的地黄品种^[7]、栽培密度^[8]、光照条件^[9-10]等对地黄的块根发育和药效成分积累均影响较大。目前, 基于常规转录组测序技术对地黄药效成分积累和块根发育有关基因表达的分子特征研究已有一些报道^[11-13]。然而, 由于地黄块根膨大历时长、组织结构复杂、微管组织分散、形成层细胞分布深等原因, 限制了地黄块根膨大和品质形成的分子机制研究。近年来, 空间转录组学技术的发展, 为地黄药效成分的区室化积累和块根膨大的分子机制解析提供了新思路和方法

揭示基因表达在植物组织内的空间异质性, 以及不同细胞类型之间的转录组差异, 是理解药用植物发育与进化、环境适应性及药效成分合成和积累的核心基础。空间转录组学 (spatial transcriptomics, ST) 能够在组织形态学背景下, 同步分析基因表达水平及其在组织中的空间位置^[14]。因此, 自 2016 年 Joakim Lundeberg 课题组首次提出空间转录组学的概念^[15]后, ST 迅速成为生命科学领域的热点研究技术。尤其是近期发展起来的增强分辨率转录组测序 (spatial enhanced resolution omics sequencing, Stereo-seq), 能够以超大视野 (13 cm×13 cm) 和高分辨率 (500 nm) 鉴定细胞的时空转录组学变化和相互作用^[16], 进一步拓宽了空间转录组技术在植物中的应用场景。Xia 等^[17]首次将 Stereo-seq 技术应用于拟南芥叶片, 成功区分了上、下表皮细胞以及海绵状与栅栏状叶肉细胞, 并发现了维管细胞和保卫细胞不同的空间发育轨迹。Wang 等^[18]利用 Stereo-seq 技术构建了玉米幼穗发育的高分辨率空间转录组图谱, 揭示了玉米穗发育过程中的细胞类型、基因表达模式及其调控网络, 并发现了 2 个控制穗发育的关键 MADS-box 基因。Dong 等^[19]对发育阶段的黄瓜与番茄花芽开展了空间转录组测序

及细胞谱系重构, 成功识别出参与下位子房和两性花形成过程的不同细胞类型, 并解析了与之相关的基因调控网络。虽然 Stereo-seq 技术在鉴定植物区域特异性细胞亚型方面呈现出独特的优势, 但在植物时空转录组研究中的应用仍处于起步阶段, 在大量非模式植物上的应用仍有待验证。

本研究首次利用 Stereo-seq 技术对地黄块根的空间转录组进行研究, 解析了基因在不同组织部位的空间表达特异性, 筛选并验证了地黄块根中组织特异表达的 Marker 基因, 为地黄块根发育、品质形成和调控关键基因的挖掘与分子鉴定等提供新的思路和数据支撑。

1 材料与仪器

1.1 样品

本研究以地黄 85-5 为实验材料, 经河南农业大学王丰青教授鉴定为地黄 *R. glutinosa* Libosch.。

1.2 仪器

DNBSEQ-T7 超高通量基因测序仪 (深圳华大智造科技股份有限公司), NanoDrop™ Lite 超微量分光光度计 (美国赛默飞世尔科技公司), CryoStar™ NX70 冷冻切片机 (美国赛默飞世尔科技公司), CFX96 Touch 实时定量 PCR 检测系统 (美国伯乐生命医学产品有限公司)。

2 方法

2.1 样品的处理

2024 年 5 月中旬, 将地黄 85-5 的种栽种植于河南农业大学认知园, 常规管理, 出苗后 100 d 挖出生长状态良好的地黄块根, 用无菌水洗去表面土壤后迅速切成薄片, 取 1/4 薄片置于预冷过的含有 OTC 试剂的包埋盒中, 保存在 -80 ℃。采用冷冻切片机制备厚度为 10 μm 的切片, 用于后续 RNA 提取与质量检测, 因组织切片面积大于芯片尺寸, 选取部分目标组织区域进行贴片, 再依次开展组织透化、文库构建及测序实验。

2.2 透化时间测试

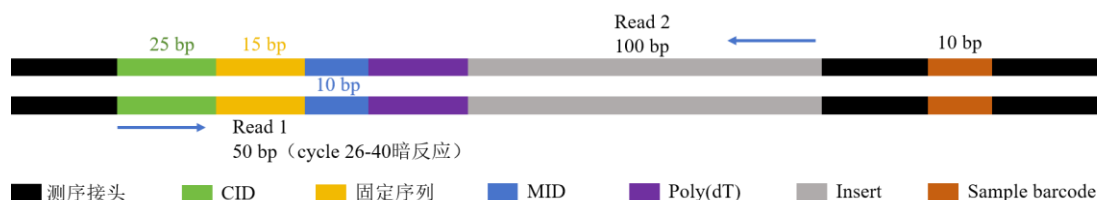
将冷冻切片转移至 Stereo-seq 芯片 P 载体上, 采用甲醇对切片进行固定处理。随后在相同的拍照参数下, 分别设置 6、12、18、24 min 4 个时间梯度, 依次进行组织透化与反转录反应。反应结束后对芯片进行组织去除处理, 并开展荧光成像检测。在确保组织被完全清除干净的前提下, 综合筛选组织形态保持完整、荧光信号强度最高且无明显荧光扩散现象的时间点, 将其确定为最佳透化时间, 从

而为后续 cDNA 文库构建实验提供稳定可靠的最佳实验条件。

2.3 cDNA 文库制备与测序

将冷冻切片平整放置于 Stereo-seq 芯片 P 载体上, 利用甲醇对组织切片进行固定, 以维持组织形态并起到保护核酸的作用。随后, 进行荧光染色及拍照,

根据透化时间测试选择平均荧光信号最强的时间进行组织透化, 切片组织释放出的 mRNA 与芯片上的带有寡糖苷酸 poly T 序列的探针特异性结合, 反转录成对应的 cDNA。随后 cDNA 经 PCR 扩增、酶切、筛选、再扩增、成环、构建可用于 DNBSEQ-T7 测序的标准文库后, 进行上机测序。文库结构如图 1 所示。



CID-用于标识空间位置信息的人工合成核酸序列; MID-用于标识从样本组织捕获到的核酸序列, 不同的 mRNA 序列片段可以来自相同的分子, 使用相同的 MID 标识; Insert-芯片捕获的 mRNA 片段。

CID-a synthetic nucleic acid sequence used to encode spatial positional information; MID-a nucleic acid tag used to label sequences captured from sample tissues; distinct mRNA fragments derived from the same original molecule carry the same MID; Insert-an mRNA fragment captured by the chip.

图 1 Stereo-seq 测序文库结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of Stereo-seq sequencing library structure

2.4 数据分析

使用专用于处理华大时空组学数据的软件 STOmics Analysis Workflow (SAW) 对原始测序数据进行质量控制, 将质控后的有效序列比对至地黄栽培种 Qinhuai 参考基因组 ASM16008111v2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_016081115.2/), 并完成转录组注释分析。在此基础上, 运用 Seurat 与 Stereopy 软件开展数据矩阵统计、细胞聚类及差异表达基因筛选等后续生物信息学分析。对筛选得到的差异表达基因进行功能注释, 并进一步解析各细胞类群 (Cluster) 对应的基因功能及代谢通路特征。

2.5 qRT-PCR 分析

采用 Trans ZolPlant 总 RNA 提取试剂盒提取地黄块根周皮部位、韧皮部、形成层和木质部 4 个组织的总 RNA, 利用 NanoDrop™ Lite 超微量分光光度计检测总 RNA 质量及浓度, 随后使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒对总 RNA

进行反转录获得 cDNA。

采用 SYBR Green 荧光染料法进行定量 PCR 检测候选基因在 4 个组织的表达量, 选取 *RgTIP41* 为内参基因, 定量引物序列见表 1。qRT-PCR 的反应体系 (25 μ L) 为 1 μ L 反转录 cDNA 产物, 差异基因/内参基因定量的正反向引物各 1 μ L, 12.5 μ L TB Green Premix Ex Taq II, 9.5 μ L ddH₂O。qRT-PCR 的反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 循环数 40 个。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同差异基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 切片透化测试结果

使用 Stereo-seq 芯片 p (0.5 cm $\times$ 0.5 cm), 切片厚度 10 μ m, 分别进行 6、12、18、24 min 透化, 发现根据透化测试荧光拍照和灰度测量结果, 相同曝光条件, 不同透化时间下, 地黄块根样本组织区域荧光信号基本完整, 与明场切片形态结构基本一致 (图 2)。4 个透化时间处理下的灰度测量值分别

表 1 qRT-PCR 引物序列的信息

Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	扩增片段大小/bp
<i>RgTIP41</i>	TGGCTCAGAGTTGATGGAGTG	TCTCCAGCAGCTTTCTCGGA	105
<i>DH2020-016897</i>	TGACTGAACTAAGAGCGACG	TTGCACTTGTGCTTATGATGC	187
<i>DH2020-009767</i>	GTGGACGAGAGAGTTGTTCC	CCGAGCAAGAGTAGTGGATG	127
<i>DH2020-009768</i>	GTCCCCAACGATACGAGAAA	TCCACAATTTCCACCGAGTG	127
<i>DH2020-026044</i>	CAAGATGTACCCAGGCTTGA	CAGAGCCAGTCATCTTTGG	196

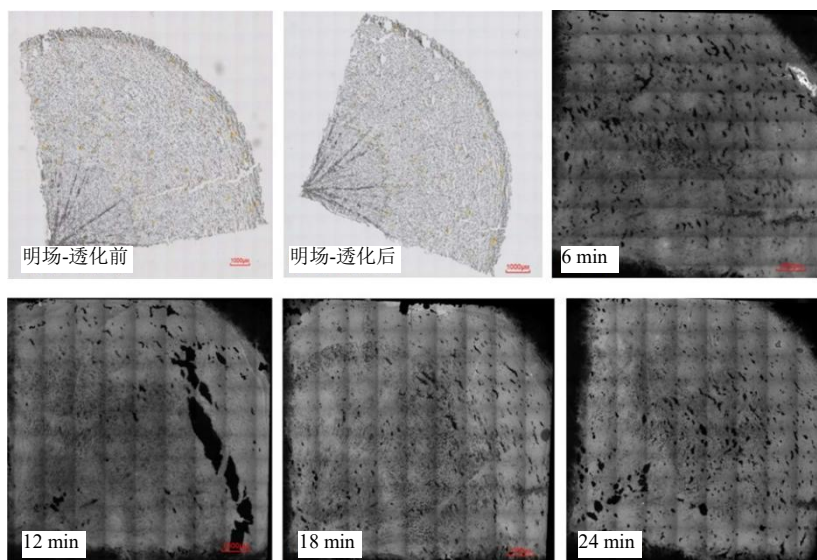


图2 地黄块根切片透化测试荧光图片

Fig. 2 Fluorescence images of *Rehmannia glutinosa* root slices permeabilization

为 82.714、84.024、103.107 和 95.684，其中地黄块根样本在透化 18 min 平均荧光信号较强，选取透化时间 18 min 进行后续研究。

3.2 测序数据的质量评估

本研究共获得 1 327 889 526 个 Read，去除低质量 Read 后获得 398 066 155 个 clean read，约占总 Read 的 46.1%。质量值大于 30 的碱基所占的比例 (Q_{30}) 为 92.45%。将 clean read 与地黄参考基因组进行比对，88.6% 的 clean read 比对到参考基因组上，说明测序的各项数据指标满足后续分析的条件。

3.3 利用 SAW 分析获得不同 Bin 下的细胞聚类结果

为平衡空间分辨率与数据信噪比，本研究采用 Stereo-seq 技术特有的 Bin 合并策略，将芯片上相邻的 $N \times N$ 个数据单元合并为单个分析单元 (记为 Bin N)，并以单像素形式进行可视化与后续分析。SAW 分析流程默认提供 Bin 20、Bin 50 和 Bin 200 3 种分辨率的数据集，分别对应 10、25、100 μm 的空间分辨率。结果 (表 2) 表明，不同 Bin 分辨率下的测序指标存在显著差异。Bin 20、

Bin 50 与 Bin 200 的单 Bin 平均 Reads 数分别为 979、5 995 与 89 545，单 Bin 平均检测到的基因数分别为 4.94、19.6 与 200。与之对应，基因表达热图的信号质量随 Bin 增大而显著提升 (图 3)，低分辨率 (Bin 20) 下信号稀疏且背景噪声显著，中等分辨率 (Bin 50) 下组织信号初步显现，高合并度的 Bin 200 分辨率下，单 Bin 有效测序数据量充足，背景噪声被有效抑制，基因表达信号集中。

进一步的细胞聚类分析结果 (图 4) 表明，Bin 20 分辨率下，由于单元内有效基因数过少，数据信噪比极低，聚类产生了高达 970 个簇，聚类呈现严重碎片化，无法界定生物学界限，结果缺乏生物学意义。Bin 50 分辨率下，聚类的类群降至 54 个，其中类群 15 呈现明显的组织特异性，主要分布在形成层部位，少量分布在韧皮部。而 Bin 200 分辨率下，单元内数据量足以支撑稳健的聚类分析，最终得到 19 个空间分布清晰、边界明确的细胞类群。综合不同 Bin 分辨率下的测序指标、表达热图特征与聚类分析结果，Bin 50 分辨率下可以挖掘在形成层

表2 不同 Bin size 下的测序覆盖

Table 2 Sequencing coverage at different Bin sizes

Bin大小	单Bin平均读段数	单Bin读段中位数	单Bin平均基因类型数	单Bin基因类型中位数	单Bin平均MID值	单Bin MID值中位数
20	979	884	4.94	4	7.61	7
50	5 995	5 493	19.60	18	46.14	42
200	89 545	82 902	200.00	196	687.00	641

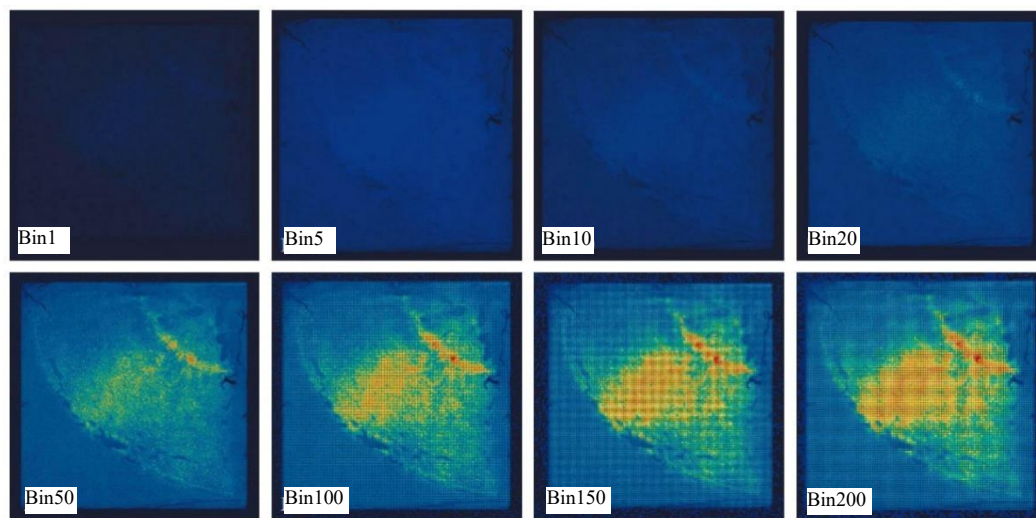
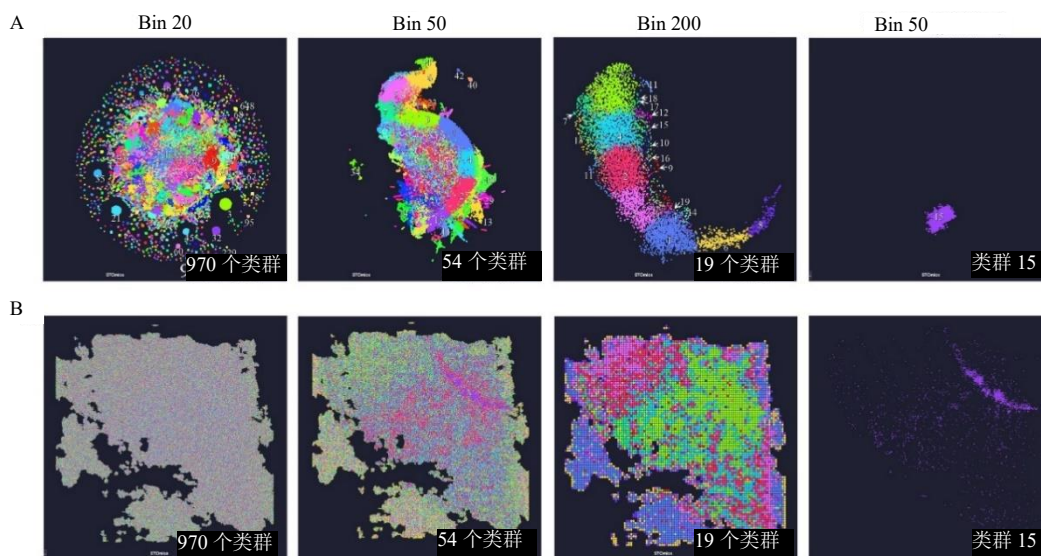


图 3 不同 Bin 下的基因表达热图
Fig. 3 Heatmap of gene expression in different bins



A-降维聚类图；B-组织空间聚类映射图。
A-dimensionality-reduction clustering plot; B-spatial clustering mapping of tissue sections.

图 4 3 种 bin 下细胞聚类分析结果
Fig. 4 Results of cell clustering analysis with three Bin sizes

部位特异表达的基因, Bin 200 可以用于分析地黄块根不同部位的细胞类群。

3.4 基于 SAW 分析的细胞形成层特异表达基因鉴定

对 Bin 50 分辨率下的类群 15 中前 30 个基因的功能注释进行分析, 发现其中 DH2020-013556、DH2020-016652 和 DH2020-039921 可能与地黄的块根膨大有关(表 3)。其中 DH2020-013556 编码糖双向转运蛋白 SWEET14, 可能参与地黄块根膨大

过程中的糖转运。DH2020-016652 编码玉米素 O-木糖基转移酶, 可能在地黄块根膨大过程中细胞分裂与增殖过程中发挥重要作用。DH2020-039921 编码剪接因子 U2AF 小亚基 A, 可能参与了块根的形态建成。同时还发现部分基因与抗病抗逆有关, 如 DH2020-012474 编码 Bet v 1 家族病程相关蛋白, 可能直接参与植物对病原菌侵染的防御反应。DH2020-032065 编码 MLP 相关蛋白 34, 可能在高温、干旱、病原菌等胁迫中发挥重要作用。

表 3 基于 SAW 分析的 Bin 50 下类群 15 中前 30 个高表达的基因
Table 3 Top 30 highly expressed genes in cluster 15 at Bin 50 based on SAW analysis

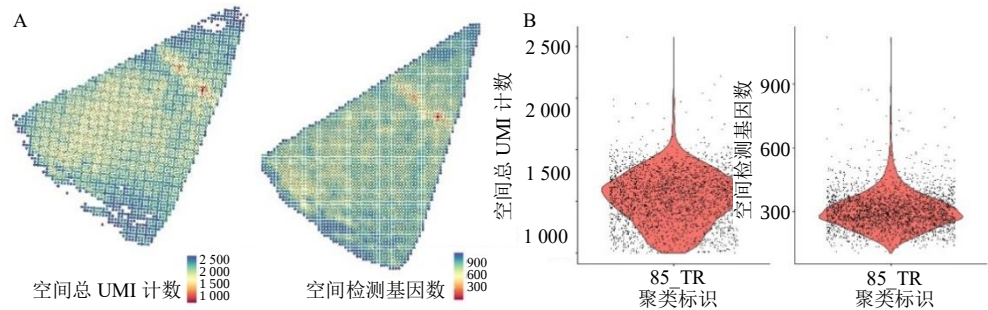
基因ID	类群15的Log2差异	在类群15中的表达比	基因描述及注释
DH2020-011291	1.927	0.094	预测的蛋白
DH2020-032065	1.855	0.065	MLP相关蛋白34
DH2020-009468	1.009	0.056	预测的蛋白
DH2020-016934	1.708	0.049	逆转录酶
DH2020-046079	1.216	0.046	60S 核糖体大亚基蛋白RL19(60 S ribosomal protein L19, RPL19)
DH2020-045931	1.861	0.041	类受体蛋白41 (receptor-like protein 41, RLP41)
DH2020-029306	0.904	0.042	含有锌结合逆转录酶结构域(Zinc-finger reverse-transcriptase domain, zf-RVT)
DH2020-005306	1.253	0.045	马铃薯抑制剂I家族蛋白
DH2020-016900	1.248	0.038	40S核糖体小亚基蛋白S8
DH2020-012474	3.918	0.032	Bet v 1 家族病程相关蛋白 (Bet v 1 family pathogenesis-related protein 10, PR-10)
DH2020-002687	1.573	0.026	胍脂质酶家族成员2
DH2020-043566	1.022	0.027	40S 核糖体小亚基蛋白S3a (40S ribosomal protein S3a, RPS3A)
DH2020-011335	1.402	0.016	预测的蛋白
DH2020-021884	1.586	0.018	编码Neprosin型天冬氨酸蛋白酶N端激活肽 (前肽结构域)
DH2020-046040	1.468	0.012	编码DEAD-box家族的ATP依赖型RNA解旋酶24 (DEAD-box ATP-dependent RNA
DH2020-002526	1.797	0.014	核苷二磷酸激酶家族成员1
DH2020-030910	2.259	0.009	质体定位的丙酮酸激酶家族成员4
DH2020-032294	1.207	0.009	磷脂酰肌醇4-激酶家族γ亚型成员7
DH2020-032343	2.255	0.009	RNA依赖性RNA聚合酶1
DH2020-020089	1.749	0.008	钙调素结合转录激活因子5 (calmodulin-binding transcription activator 5, CAMTA5)
DH2020-013556	1.977	0.008	双向糖转运蛋白SWEET14
DH2020-019160	2.605	0.006	预测的蛋白
DH2020-004207	2.935	0.006	含锌结合逆转录酶结构域蛋白
DH2020-016652	2.233	0.006	玉米素O-木糖基转移酶
DH2020-002068	2.472	0.006	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶fray
DH2020-039921	2.173	0.005	剪接因子U2AF小亚基A
DH2020-008195	1.658	0.005	半胱氨酸蛋白酶RD21A
DH2020-046003	2.127	0.005	FKBP型肽基脯氨酰顺反异构酶
DH2020-014408	2.142	0.005	CBL互作丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶24
DH2020-010393	1.708	0.005	60S酸性核糖体蛋白 (P蛋白家族)

3.5 地黄块根组织的细胞类群空间鉴定

基于上述筛选确定的 Bin 200 分辨率数据，首先进行基因表达矩阵的质量控制与定量评估。对每个分析单元的空间总 UMI 计数及空间检测基因数进行统计（图 5）。结果显示，绝大多数 Bin 单元的空间总 UMI 计数集中于 1 000~2 500，空间检测基因数介于 300~900，数据分布均匀且无明显异常

值，表明数据质量可靠，适用于后续分析。

随后，采用 Seurat 4.0 对表达矩阵进行标准化及降维分析。通过主成分分析（principal component analysis, PCA）提取主要生物学变异来源，并利用 UMAP 算法进行非线性降维与无监督聚类。UMAP 可视化结果显示，分析单元被划分为 5 个细胞类群（Cluster 0~4），各类群在低维空间中界限清晰，且簇间距离与基因表



A-总 UMI 数及空间检测基因数统计结果；B-小提琴图。
A-statistics of total UMI counts and spatially detected gene numbers; B-violin plot.

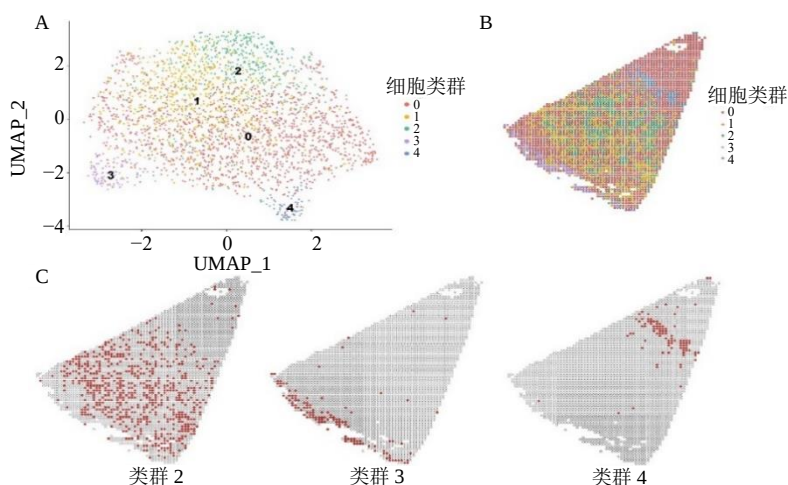
图 5 基因表达矩阵统计 (Bin 200)
Fig. 5 Statistical analysis of gene expression matrix (Bin 200)

达谱的相似度呈正相关, 5 个类群中 0 类群的细胞分布范围更广, 2、3 和 4 类群的细胞特异性更强 (图 6-A)。为进一步解析其空间异质性, 将上述聚类结果映射回组织切片的原始坐标, 发现不同细胞类群表现出显著的空间特异性 (图 6-B)。其中类群 0 分布在整个切片位置, 类群 3 和类群 4 的空间特异性更强。进一步分别在切片上呈现不同类群的空间位置, 发现类群 2 主要分布在韧皮部区域, 类群 3 特异性分布于周皮部位, 类群 4 主要特异地富集于形成层区域 (图 6-C)。上述结果表明, 地黄块根的细胞类群中基因的表达模式在转录组水平上存在明确的空间分区特征, 为后续

解析不同解剖结构的分子调控机制奠定了基础。

3.6 地黄块根不同细胞类群中的差异基因表达分析

通过 Seurat 软件分别计算 Bin 200 聚类结果下每一类细胞类群与其它细胞类群之间的差异表达基因, 为进一步筛选 marker 基因提供依据。通过对分析得到的不同细胞类群的差异基因进行功能注释发现, 这些基因主要与植物的生长发育、逆境胁迫应对和对环境的适应有关 (表 4)。对得到的这 12 个差异高表达基因, 分析其在不同细胞类群中的表达情况 (图 7), 发现核糖核酸内切酶编码基



A-细胞聚类结果; B-细胞类群在样品中的空间排布; C-3 个细胞类群在样品中的空间位置; 不同颜色代表不同功能的细胞类群, 细胞类群距离的远近代表表达模式间的关联程度。

A-cell clustering results; B-spatial distribution of cell clusters in the sample; C-spatial locations of three cell clusters in the sample. Different colors represent cell clusters with distinct functions, and the distance between cell clusters indicates the correlation degree among their expression profiles.

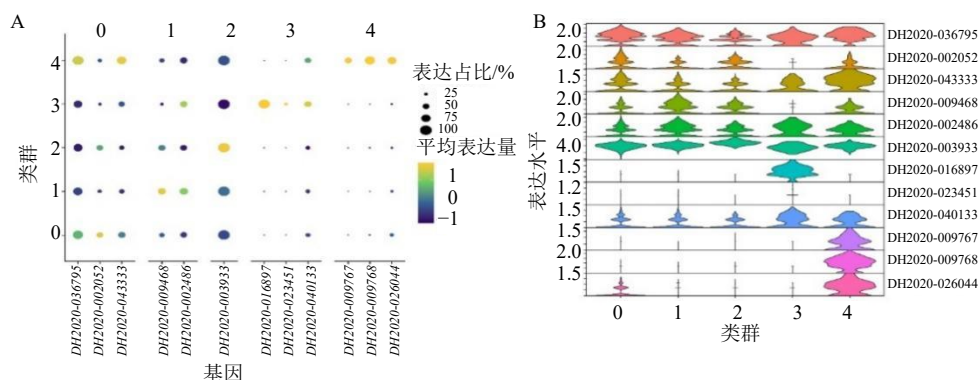
图 6 UMAP 算法细胞聚类结果和细胞类群在地黄块根样品组织切片的空间排布

Fig. 6 UMAP-based cell clustering and their spatial distribution in tissue sections of *R. glutinosa* tuberous roots

表 4 差异基因描述及功能注释

Table 4 Description and functional annotation of differentially expressed genes

类群	基因ID	基因描述及注释
0	DH2020-036795	核糖体蛋白S12亚基, 构成核糖体的一部分, 与蛋白质的翻译和生物发生有关
	DH2020-002052	转录抑制因子MYB5
	DH2020-043333	地黄属植物致病相关蛋白 (PR-10) mRNA, 可能直接参与地黄的免疫防御、胁迫适应
1	DH2020-009468	通过生物信息学方法预测的、沟酸浆转录因子TFIIIB B亚基同源蛋白
	DH2020-002486	热休克同源蛋白80编码基因
2	DH2020-003933	核酸外切酶-内切酶-磷酸酶家族蛋白 (exonuclease-endonuclease-phosphatase family protein, EEP)
3	DH2020-016897	与芝麻YSH1型同源的末端核糖核酸酶
	DH2020-023451	非特异性脂质转移蛋白1型亚家族, 与脂肪酸、磷脂、糖脂、类固醇的转移的跨膜运输与关, 也涉及到脂质的运输和组装
	DH2020-040133	与独角金热激70000蛋白同源
4	DH2020-009767	与独角金的6-磷酸葡萄糖醛酸裂解酶同源, 具有连接葡萄糖的氧化代谢和戊糖的生成的作用
	DH2020-009768	与独角金的6-磷酸葡萄糖醛酸裂解酶同源, 具有连接葡萄糖的氧化代谢和戊糖的生成的作用
	DH2020-026044	与鸡骨草类金属硫蛋白样蛋白2基因同源



A-差异高表达基因的气泡图; B-差异高表达基因的小提琴图。

A-bubble plot of differentially highly-expressed genes; B-violin plot of differentially highly-expressed genes.

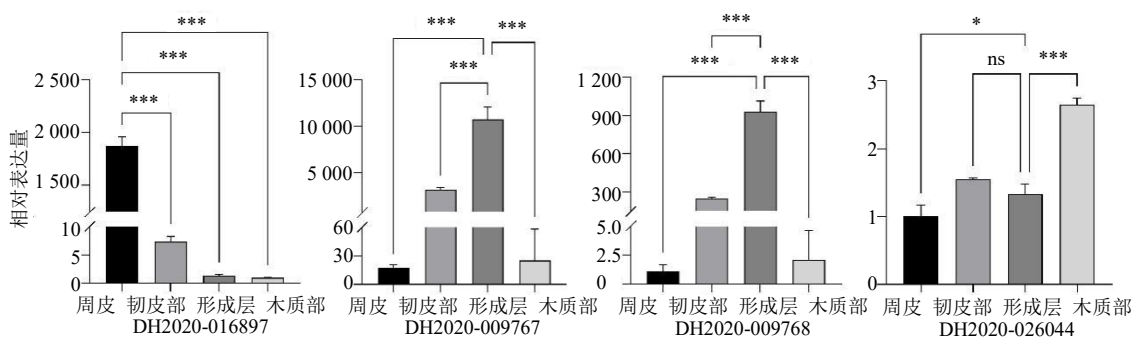
图 7 差异高表达基因表达分布图 (Bin 200)

Fig. 7 Expression distribution plots of differentially highly expressed genes (Bin 200)

因 DH2020-016897 在周皮(类群 3)中优势高表达,可能与植物的生长发育、逆境响应等有关。催化 6-磷酸葡萄糖酸内酯水解生成 6-磷酸葡萄糖酸的 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶编码基因 DH2020-009767 和 DH2020-009768 在维管束形成层(类群 4)中特异表达,为细胞代谢提供核糖和还原力,可能参与地黄块根的细胞分裂和增殖。此外,编码金属硫蛋白样蛋白的基因 DH2020-026044 在类群 4 和类群 0 中特异表达,螯合重金属离子、维持必需金属稳态、清除活性氧,可能参与植物的逆境胁迫相应。

3.7 空间转录组测序结果的 qRT-PCR 验证

为了验证空间转录组测序分析的准确性,利用 qRT-PCR 对类群 3 特异表达的基因 DH2020-016897、类群 4 特异表达的基因 DH2020-009767 和 DH2020-009768,类群 4 和类群 0 特异表达基因 DH2020-026044 的表达模式进行分析,结果(图 8)表明,DH2020-016897、DH2020-009767 和 DH2020-009768 的表达特征与空间转录组测序结果基本一致。DH2020-026044 在块根的各个组织均有表达,但在木质部细胞中表达量较高,与空间转录组结果有所差异,可能与其本身组织表达特异性不强有关。

ns 表示 $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

ns indicates no significant difference; *indicates significant difference; ***indicates extremely significant difference.

图 8 差异表达基因的 qRT-PCR 验证结果

Fig. 8 qRT-PCR validation of DEGs

4 讨论

转录组测序(RNA-seq)为研究生命“动态蓝图”提供了一个强有力的工具,不再仅仅是发现基因,而是阐释基因如何协同工作、分子网络如何运行,从而在整体上理解复杂生命现象。与常规转录

组测序相比,空间转录组测序在药用植物的研究中具有十分突出的技术优势。它就像一张高精度的分子导航地图,不仅能看清基因的表达,更能精确揭示这些基因参与的复杂生物化学过程具体在哪个细胞、哪个组织位置发生^[20],这对于解析药

用植物器官发育和药物活性成分的生物合成机制至关重要。

已有研究表明,植物的次生代谢产物合成和积累具有明显的区室化特征,表现为某些特化代谢产物在高度特异的组织、器官或细胞类型中合成与积累^[21]。如青蒿素特异地在黄花蒿的腺毛中合成并积累,单细胞转录组和空间转录组分析把青蒿素的生物合成严格限定在腺毛中的 6 个分泌细胞^[22]。人参皂苷主要储存在根的木栓层、茎和叶的表皮,人参皂苷生物合成相关基因在保卫细胞、栅栏组织叶肉细胞等不同细胞类型中特异性表达,且上下游基因分布存在区室分工^[23]。穿心莲内酯、新穿心莲内酯、14-脱氧穿心莲内酯和脱氢穿心莲内酯在叶片中主要在叶肉中积累,而在茎中则分布在韧皮部及外皮层,关键合成酶基因 *ApCPS2* 在叶肉细胞亚群中特异性高表达^[24]。在地黄块根中药效成分的积累也具有明显的组织特异性分布,如梓醇主要储存在块根的韧皮部和木质部的薄壁细胞^[25],毛蕊花糖苷主要在叶中积累^[26],类胡萝卜素衍生物 *rehmannins A~D* 主要分布在韧皮部组织^[27]。然而,由于缺乏空间转录组数据,尚无法明确这些次生代谢产物在地黄中的合成细胞和组织。

块根是地黄的入药部位,由地黄的侧根或不定根发育而来,主要用于储藏营养物质和合成并积累次生代谢产物。地黄块根的膨大源于根系旺盛生长,形成层细胞持续快速分裂,不断分化形成大量薄壁贮藏细胞,最终发育形成肉质块根^[28]。前人利用传统转录组测序对地黄块根形成启动和膨大生长的分子进程进行了研究,取得了一些阶段性的进展,在膨大初期块根(ITRs)与苗期初生须根(IFRs)间共鉴定出 6 032 个差异基因^[11],推测参与光信号通路、激素应答及信号转导的基因可能调控块根起始建成,细胞分裂、细胞壁代谢相关基因可能参与启动初生须根的膨大进程。为了解析脱落酸和赤霉素拮抗调控块根起始分化的机制,Yang 等^[29]对经外源脱落酸、赤霉素处理的地黄根系开展转录组测序,分别得到 7 416 个和 9 034 个差异表达基因,筛选出 DREB、ERF、PER 家族基因是介导脱落酸/赤霉素拮抗调控块根起始分化的关键调控因子。研究地黄块根发育的分子机制,在于通过分析形成层细胞活动的转录组特征,揭示生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯等激素协同调控形成层细胞的分化、分裂增殖的机制。然而,由于形成层细胞

在块根中所占比例极小,利用传统转录组测序很难精确锁定调控形成层细胞分化和分裂的关键基因,限制了地黄块根的发育生物学研究。

本研究利用 Stereo-seq 进行地黄块根的空间转录组分析,成功筛选出在地黄周皮和形成层部位的特异表达细胞类群,同时鉴定出在形成层细胞部位特异高表达的基因 DH2020-009767 和 DH2020-009768,以及周皮特异表达的基因 DH2020-016897,可作为单细胞转录组测序的候选 marker 基因,实现对单细胞测序获得的细胞类群进行精确分类。同时还鉴定到糖转运蛋白编码基因 DH2020-013556、参与激素调节和转运的蛋白编码基因 DH2020-016652 和 DH2020-039921,为进一步揭示地黄块根的膨大机制提供了依据。然而,由于膨大的肉质地黄块根含有大量糖类、水分和其它多种化学成分,影响组织切片和透化处理的效果,检测到的荧光信号较弱,捕获到的基因数较少,限制了地黄块根发育和药效成分合成基因的挖掘。相信随着空间转录组测序技术的不断发展完善,其在解析药用植物生长发育、次生代谢产物合成及逆境胁迫响应等方面的分子机制必将发挥重要的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王丰青,谢彩侠,孙瑞斌,等.地黄种质创新与品种选育研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(21):4203-4209.
- [2] 冯卫生.地黄化学成分及药理作用研究进展[J].中医学报,2025,40(10):1-23.
- [3] 陈金鹏,张克霞,刘毅,等.地黄化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(6):1772-1784.
- [4] 张朋雨,高俊鸽,杨雅贺,等.地黄中地黄苷 D 的测定方法、含量变化规律和药理作用研究进展[J].中草药,2026,57(1):355-363.
- [5] 谢彩侠,李雅静,张苗,等.不同种质地黄块根菊花心与非菊花心部位有效成分特征分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(20):75-83.
- [6] 宋梦娇,董诚明,魏悦,等.怀地黄“菊花心”性状与化学成分的相关性研究[J].时珍国医国药,2023,34(5):1133-1137.
- [7] 马梦雨,谢小龙,田梦平,等.地黄主要品种的药材品质评价研究[J].时珍国医国药,2023,34(4):983-986.
- [8] 王丰青,杨超飞,李铭铭,等.密度对地黄生长及基因转录特性的影响分析[J].中国中药杂志,2021,46(17):4367-4379.
- [9] 王丰青,李欣容,杨超飞,等.遮阴对地黄块根性状、

- 光合特性及基因转录的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4419-4429.
- [10] 刘春琰, 黄勇, 郭猛, 等. 遮阴对地黄生长及生理特性的影响 [J]. 河南农业科学, 2022, 51(4): 59-67.
- [11] Li M J, Yang Y H, Li X Y, *et al.* Analysis of integrated multiple ‘omics’ datasets reveals the mechanisms of initiation and determination in the formation of tuberous roots in *Rehmannia glutinosa* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(19): 5837-5851.
- [12] Wang F Q, Li X R, Zuo X, *et al.* Transcriptome-wide identification of WRKY transcription factor and functional characterization of *RgWRKY37* involved in acteoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 739853.
- [13] Dong T Y, Du Y J, Huang T T, *et al.* Integrated multi-omics demonstrates DNA demethylation-driven activation of the *RgMYB2-RgG10H4* axis enhancing iridoid glycoside biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Phytochemistry*, 2026, 242: 114705.
- [14] 陈永孜, 王化, 王维轩. 空间转录组学的发展及其应用进展 [J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(11): 23-31.
- [15] Ståhl P L, Salmén F, Vickovic S, *et al.* Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics [J]. *Science*, 2016, 353(6294): 78-82.
- [16] Liu C, Li R, Li Y, *et al.* Spatiotemporal mapping of gene expression landscapes and developmental trajectories during zebrafish embryogenesis [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(10): 1284-1298.
- [17] Xia K K, Sun H X, Li J, *et al.* The single-cell stereo-seq reveals region-specific cell subtypes and transcriptome profiling in *Arabidopsis* leaves [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(10): 1299-1310.e4.
- [18] Wang Y B, Luo Y, Guo X, *et al.* A spatial transcriptome map of the developing maize ear [J]. *Nat Plants*, 2024, 10(5): 815-827.
- [19] Dong Z N, Liu X L, Guo X, *et al.* Developmental innovation of inferior ovaries and flower sex orchestrated by KNOX1 in cucurbits [J]. *Nat Plants*, 2025, 11(4): 861-877.
- [20] Yao J, Chu Q J, Guo X, *et al.* Spatiotemporal transcriptomic landscape of rice embryonic cells during seed germination [J]. *Dev Cell*, 2024, 59(17): 2320-2332.e5.
- [21] Fu X Q, Zhang Y J, Yu M Y, *et al.* Specialized structures and developmental mechanisms of secondary metabolite-synthesizing organs and tissues in medicinal plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 2026, 68(4): 926-941.
- [22] Zhang M H, Li M Y, An Y Y, *et al.* Single-nucleus transcriptomics reveal the morphogenesis and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* glandular trichomes [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 8646.
- [23] Wang R B, Zhang L Y, Li X, *et al.* Single-cell sequencing and mass spectrometry imaging reveal the multicellular compartmentalization map of plant triterpenes: A ginsenoside in *Panax ginseng* example [J]. *Plant Biotechnol J*, 2025, 23(10): 4461-4476.
- [24] Zeng H S, Shi M H, Chen Z R, *et al.* Mass spectrometry imaging combined with single-cell transcriptional profiling reveals the multidimensional spatial distributions and biosynthetic pathways of medicinal components in *Andrographis paniculata* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2026, 24(5): 2876-2890.
- [25] 王太霞, 司源, 李景原, 等. 怀地黄块根内含梓醇结构的组织化学和超微结构研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(5): 928-931.
- [26] 王丰青, 王丽娜, 智惊宇, 等. 不同品种地黄中毛蕊花糖苷的动态积累规律变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 78-83.
- [27] Zhong L W, Sun P, *et al.* Rehmannins A–D, anti-inflammatory carotenoid pigments from the fresh root of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Org Lett*, 2026, 28(4): 1153-1158.
- [28] 张志鹏, 徐杰, 刘佩仪, 等. 基于标准汤剂的鲜地黄配方颗粒质量标准研究 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1127-1137.
- [29] Yang R X, Du Y Y, Fang Z Y, *et al.* Transcriptome profiling of *Rehmannia glutinosa* uncovers ABA/GA antagonism mechanisms in tuberous root initiation [J]. *Funct Integr Genomics*, 2026, 26(1): 68.

[责任编辑 时圣明]