麦类作物学报 2026,46(10):1338－1345
Journal of Triticeae Crops doi:10.7606/j.issn.1009-1041.2026.10.08

网络出版时间:2026-05-25
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20260525.1038.006

大麦叶片原生质体制备条件的优化与体系建立

张晓玉,陈静静,彭依玲,邓锋林,覃 元,曾凡荣

(农业农村部长江中游作物绿色高效生产重点实验室(部省共建),涝渍灾害与湿地农业湖北省重点实验室,长江大学农学院,湖北荆州 434025)

摘 要:为建立一套稳定、高效的大麦下表皮原生质体制备体系,以啤酒大麦 Golden Promise 三叶一心期叶片为材料,采用正交实验设计,系统优化了原生质制备过程中的纤维素酶 R-10 与离析酶 R-10 浓度、酶解时间、渗透压等关键参数。结果表明,酶浓度与酶解时间显著影响原生质体产量与形态。低浓度酶组合(1.5% 纤维素酶+0.75% 离析酶)无法有效释放原生质体;提高酶浓度(2% 纤维素酶+1% 离析酶)后原生质体产量有所提升,但仍较低;当离析酶浓度增至 1.5% 并结合 6 h 酶解时,细胞壁降解最充分,原生质体产量与完整性显著提高。渗透压优化后,当甘露醇浓度从 54.7 g·kg^{-1} 提高至 98.4 g·kg^{-1}(酶解液渗透压略高于组织渗透势 630 mmol·kg^{-1})时,原生质体产量从 4.8×10^5 cells·mL^{-1} 提升至 5.8×10^5 cells·mL^{-1},且形态由不规则伴碎片转变为完整规则的圆球形。最终确定最优组合为 2% 纤维素酶 R-10、1.5% 离析酶 R-10、酶解 6 h、98.4 g·kg^{-1} 甘露醇,此条件下原生质体产量最高且形态完整,呈规则圆球形。该体系不仅适用于大麦叶片下表皮组织,对叶肉组织同样高效,可为大麦相关细胞生物学与分子生物学研究提供可靠的技术支持。

关键词:大麦;叶片;原生质体;正交试验;渗透压优化

中图分类号:S512.3;S330 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2026)10-1338-08

Optimization and Establishment of a Protocol for Protoplast Isolation from Barley Leaves

Zhang Xiaoyu, Chen Jingjing, Peng Yiling, Deng Fenglin, Qin Yuan, Zeng Fanrong

(MARA Key Laboratory of Sustainable Crop Production in the Middle Reaches of the Yangtze River(Co-construction by Ministry and Province)/Hubei Key Laboratory of Waterlogging Disaster and Agricultural Use of Wetland, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: To establish an efficient protocol for isolating high-quality protoplasts from barley leaf epidermal tissue, thereby providing technical support for studies on stomatal development, gene functional validation, and molecular breeding for stress resistance, this study used leaves of barley(*Hordeum vulgare* 'Golden Promise') at the three-leaf stage as experimental material. An orthogonal experimental design was employed to systematically optimize key parameters, including the concentrations of Cellulase R-10 and Macerozyme R-10, digestion time, and osmotic pressure. The results showed that enzyme concentration and digestion time significantly affected protoplast yield and morphology. The low-concentration enzyme combination(1.5% Cellulase R-10+0.75% Macerozyme R-10) failed to effectively release protoplasts. Increased enzyme concentrations(2% Cellulase R-10+1% Macerozyme R-10) improved yield, but levels remained relatively low. When the Macerozyme R-10 concentration was increased to 1.5% combined with a 6 h digestion, cell wall degradation was most complete, leading to significantly enhanced yield and improved morphological integrity. Osmotic pressure optimization revealed that increasing the mannitol concentration from 54.7 g·kg^{-1} to 98.4 g·kg^{-1}(resulting in an enzyme solution osmolality slightly higher than the leaf tissue osmotic potential

收稿日期:2026-01-30 修回日期:2026-03-05
基金项目:湖北省重点实验室开放课题(KFK202401;KFG202410)
第一作者 E-mail:2022720843@yangtzeu.edu.cn(张晓玉)
通讯作者 E-mail:qinyuan@yangtzeu.edu.cn(覃 元);fanrong.zeng@yangtzeu.edu.cn(曾凡荣)

of 630 mmol · kg^{-1}) increased protoplast yield from 4.8×10^5 cells · mL^{-1} to 5.8×10^5 cells · mL^{-1}. Furthermore, protoplast morphology transitioned from irregular shapes with debris to intact, uniformly spherical forms. The optimal conditions were determined to be 2% Cellulase R-10, 1.5% Macerozyme R-10, a 6 h digestion time, and a mannitol concentration of 98.4 g · kg^{-1}, under which the protoplast yield was highest and the protoplasts were intact and uniformly spherical. This system is not only applicable to the lower epidermis of barley leaves but is also highly efficient for mesophyll tissue, providing reliable technical support for related cell biology and molecular biology research.

Keywords: *Hordeum vulgare*; Leaf blade; Protoplast; Orthogonal array design; Osmotic pressure optimization

大麦(*Hordeum vulgare*)是全球第四大粮食作物，其产量仅次于玉米、小麦和水稻[1]。大麦已完成基因组测序，遗传背景清晰，是开展基因组学与遗传学研究的理想材料[2]。在形态结构方面，禾本科植物的气孔通常由两个哑铃型的保卫细胞及两个副卫细胞组成，其复杂结构有助于气孔高效地响应环境变化[3]。此外，与其他主要禾谷类作物相比，大麦表现出较强的非生物胁迫耐受性，能够较好适应干旱、盐碱、土壤贫瘠等多种逆境条件。

气孔是陆生植物叶片表皮中调节气体交换与水分蒸腾的关键结构，直接影响植物的光合效率与水分利用效率[4]。在干旱等逆境条件下，气孔通过动态开闭参与调控植物的水碳平衡，不仅对植株生长发育至关重要，也在全球水循环与碳循环中发挥重要作用[5]。近年来，随着单细胞转录组学等技术的发展，气孔的发育过程与运动调控机制已成为植物生物学研究的热点之一。叶片表皮原生质体是开展气孔相关研究的重要实验材料，为在细胞水平解析气孔功能与调控网络提供了有效体系。通过酶解法可分离获得相对纯净的表皮细胞群体，其中包含处于不同发育阶段的气孔相关细胞。结合单细胞转录组学，在高分辨率下通过揭示保卫细胞与副卫细胞在气孔发育及运动过程中的基因表达动态，可阐明气孔功能建成的分子机制[6]。尽管表皮原生质体解离技术与单细胞测序的结合，可通过富集目标细胞类型提升气孔研究的针对性，但目前该体系仍面临一些技术瓶颈。未来需优化原生质体制备方案，以降低细胞损伤、延长体外活性、减少杂细胞污染，从而提高气孔相关单细胞研究的精确度和可重复性。

植物原生质体是指经机械或酶解方法去除细胞壁后，由质膜包被并保持生理活性的裸露植物细胞[7]。细胞壁的去除不仅解除了外源物质进入的物理屏障，还可将遗传物质的瞬时转化效率提高至农杆菌介导法的 5～8 倍[8]，从而形成基因功能瞬时验证、蛋白亚细胞定位、信号转导解析及基因组编辑测试中的高效研究体系[9]。随着单细胞组学技术的发展，原生质体技术也逐步应用于转录组学、蛋白质组学等研究中。然而，现有研究多集中于根尖、茎尖、幼叶等分裂活跃的幼嫩组织[10-12]，对叶片表皮等分化组织的原生质体分离体系仍缺乏系统优化。因此，建立高效、稳定的叶片表皮原生质体制备体系，是深入开展相关细胞与分子研究的重要基础。以大麦为例，叶片表皮原生质体在去除了细胞壁阻碍后，可作为理想的单细胞研究系统，用于快速开展基因功能验证、信号通路解析、外源基因转化及病原互作早期机制等研究[13]。该体系的建立不仅有助于在离体条件下探究表皮细胞的结构与功能，也将为大麦功能基因组学研究与遗传改良提供关键技术支撑。

当前，酶解法是高效、快速分离原生质体的主流技术手段[14]。该方法基于多酶协同作用原理，通过纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶及兼具纤维素酶与果胶酶活性的离析酶，特异性降解植物细胞壁中的关键组分，从而实现原生质体的有效释放。酶解过程中，酶浓度、酶解时间、渗透压等关键参数直接影响原生质体的最终产量与活性[15]。尽管该技术体系已相对成熟，但由于不同植物乃至同一植物的不同组织在细胞壁组成与结构上存在显著差异，其最优分离条件往往不尽相同。因此，针对特定植物组织建立并优化酶解体系，是获得高质量原生质体的必要前提。

本研究以大麦幼叶下表皮为材料，参考拟南芥原生质体分离的经典酶解方法[16]，通过系统调节酶组合配比、酶解时间、渗透压稳定剂浓度等关键变量，探讨上述因素对大麦下表皮原生质体产量与形态的影响，旨在建立一套稳定、高效的大麦下表皮原生质体制备体系，为后续开展大麦单细

胞研究、基因功能验证及相关分子机制解析提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料培养

试验选用啤酒大麦(*Hordeum vulgare*)品种 Golden Promise 为材料。选取饱满种子 40 粒,用 30% H_2O_2 溶液表面消毒 10 min,随后以无菌去离子水冲洗 5～7 次。将种子置于无菌水中浸泡 12 h,之后转入垫有湿润滤纸的培养皿中,于黑暗条件下萌发 48 h。萌发后,将幼苗移栽至基质与蛭石(体积比 3∶1)的混合土壤中,置于人工气候室内培养。培养条件:光周期 13 h 光照/11 h 黑暗,恒温 25 ℃,湿度 70%。定期浇水保持土壤湿润。待幼苗生长至三叶一心期时,取完全展开的第二片叶用于原生质体制备。

1.2 酶解液配制

母液配制均使用去离子水作为溶剂,方法如下:甘露醇母液为将 18.2 g 甘露醇溶解于适量去离子水中,定容至 100 mL;$CaCl_2$ 母液为将 11.1 g $CaCl_2$ 溶解后定容至 100 mL;MES 母液为将 1.95 g MES 溶解并调节 pH 值至 5.7,定容至 100 mL;PBS 缓冲液包含 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na_2HPO_4、0.24 g KH_2PO_4 及 0.1%(w/v)BSA,溶解后定容至 1 L,调节 pH 值至 7.4。

以正交实验组合 M1(总体系 10 mL,表 1)为例,纤维素酶和离析酶的混合酶解液按以下步骤配制:取洁净离心管或三角瓶,依次加入 3 mL 甘露醇母液、1 mL MES 母液(pH 5.7)和 5.989 mL 去离子水。建议在加酶前将 MES 母液于 70 ℃预热 2～3 min 以促进溶解。随后加入 0.15 g 纤维素酶 R-10 和 0.075 g 离析酶 R-10,混匀后置于 55 ℃水浴中加热 10 min,以抑制蛋白酶活性并促进酶的溶解。待溶液冷却至室温后,加入 10 μL $CaCl_2$ 母液和 0.01 g 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)。混合均匀后,使用 0.45 μm 滤膜过滤除菌,所得酶解液呈澄清淡褐色,置于 4 ℃保存备用(建议现配现用)。

1.3 原生质体的酶解与纯化

使用经消毒的手术刀、镊子及剪刀小心剥离叶片下表皮。共取 20 片叶片的下表皮或相应叶肉组织,将其剪切成约 0.5 cm 长片段,置于酶解液中。对混合物进行抽真空处理 30 min,以使组织与酶解液充分浸润。随后将容器密封,置于摇床中,在 28 ℃、黑暗条件下以 100 r·min^{-1} 振荡酶解 3～6 h。

酶解结束后,加入等体积预冷的 1×PBS 缓冲液以终止反应,静置 5 min。将酶解产物经 40 μm 细胞筛过滤,收集滤液。滤液于 4 ℃、100×g 离心 5 min,小心弃去上清,收集沉淀中的原生质体。为提升纯度,上述洗涤步骤重复两次。最终获得的原生质体重悬于适量缓冲液中,置于冰上暂存。

采用血球计数板测定原生质体浓度:取 10 μL 悬液加至计数板,盖上盖玻片,于倒置显微镜下观察并计数原生质体,再计算其浓度。

1.4 正交实验设计

为探究纤维素酶 R-10 浓度、离析酶 R-10 浓度及酶解时间对大麦叶片下表皮原生质体产量与形态的影响,本研究采用 $L_6(2\times3\times2)$ 正交表进行实验设计。3 个因素及水平分别为纤维素酶浓度(1.5%、2%)、离析酶浓度(0.75%、1%、1.5%)和酶解时间(3 h、6 h),共构成 6 种处理组合(表 1)。通过显微镜观察并统计各处理下原生质体的产量与形态,以评估不同酶解条件的影响。

1.5 数据统计与分析

本研究采用正交实验设计优化原生质体制备条件,数据分析包含极差分析与方差分析两部分。首先,通过极差分析计算各因素(纤维素酶浓度、离析酶浓度、酶解时间)在不同水平下的原生质体平均产量及极差(R)值,依据 R 值大小确定各因素对原生质体产量影响的主次顺序,并根据各水平原生质体平均产量的最大值确定理论最优组合。其次,采用 SPSS 软件对正交实验结果进行方差分析(以处理组合为自变量,原生质体产量为因变量),评估不同处理组合间差异的统计学意义($\alpha=0.05$)。在此基础上,对各处理组间进行 Duncan 多重比较,以验证最优组合与其他组合的差异显著性。对于渗透压优化实验中的数据比较,采用独立样本 t 检验。所有数据均以平均值±标准差表示,每组实验重复 3 次($n=3$)。

2 结果与分析

2.1 不同酶组合与酶解时间对原生质体产量的影响

通过对比不同酶浓度配比与酶解时间下大麦叶片下表皮原生质体产量,结果(表 1)显示,当纤维素酶与离析酶浓度较低(M1、M2)时,无论酶解时间为 3 h 或 6 h,原生质体产量均极低,镜下几

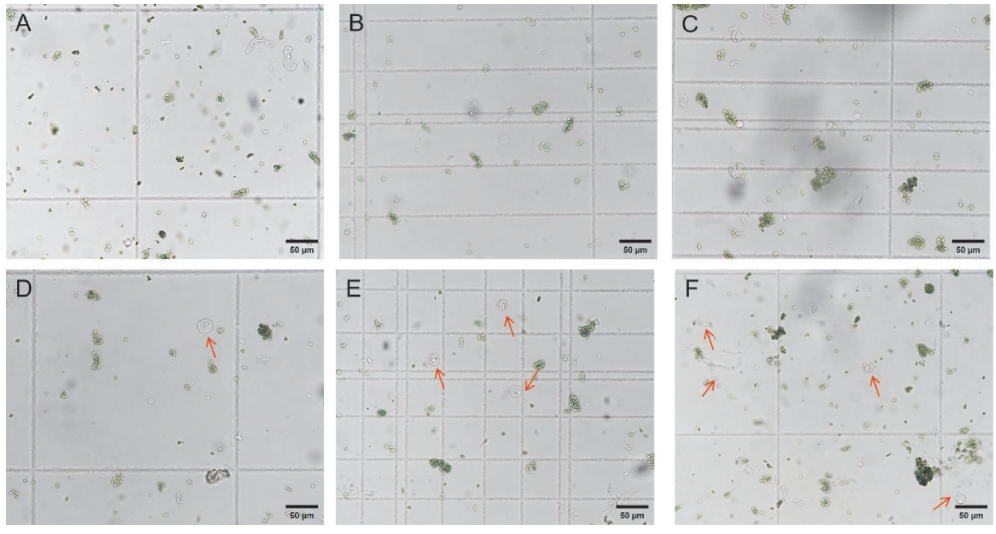
乎观察不到完整原生质体(图 1A 和图 1 B)。提高酶浓度(M3、M4)后,原生质体产量有所上升,但仍处于较低水平(0.15×10^5～0.40×10^5 cells·mL^{-1}),且原生质体游离不充分(图 1C 和图 1D),说明此时酶活性仍不足以高效降解细胞壁。

继续增加离析酶浓度至 1.5%(M5)后,在 3 h 酶解条件下原生质体产量提高至 1.6×10^5 cells·mL^{-1},但原生质体形态不完整,伴有碎片(图 1E)。而当酶解时间延长至 6 h(M6)时,在相同酶浓度下原生质体产量达到最高(4.8×10^5 cells·mL^{-1}),原生质体游离充分、形态相对完整(图 1F)。这表明在较高酶浓度基础上,充足的作用时间是实现细胞壁充分降解、提高原生质体产量与完整性的关键。综合原生质体产量与形态特征,M6(2%纤维素酶 R10 + 1.5%离析酶 R10,酶解 6 h)为本实验条件下的最优处理组合。

表 1　正交实验结果与分析($n=3$)

Table 1　Experimental results of the orthogonal array design($n=3$)

处理编号 Treatment code	因素 Factor			原生质体 Protoplast	
	纤维素酶浓度 Cellulase concentration/%	离析酶浓度 Macerozyme concentration/%	酶解时间 Digestion time/h	产量 Yield/($\times10^5$ cells·mL^{-1})	形态 Morphology
M1	1.5	0.75	3	0	几乎无原生质体 Few to no protoplasts
M2	1.5	0.75	6	0	几乎无原生质体 Few to no protoplasts
M3	2	1	3	0.15±0.04	原生质体游离较少 Sparse protoplast release
M4	2	1	6	0.4±0.08	原生质体游离较少 Sparse protoplast release
M5	2	1.5	3	1.6±0.2	原生质体游离较少,形态不完整,有碎片 Low yield, irregular morphology with debris
M6	2	1.5	6	4.8±0.3	原生质体游离较多,形态较完整,有碎片 High yield, mostly intact with some debris



A:1.5%纤维素酶 R-10 和 0.75%离析酶 R-10,酶解 3 h;B:1.5%纤维素酶 R-10 和 0.75%离析酶 R-10,酶解 6 h;C:2%纤维素酶 R-10 和 1%离析酶 R-10,酶解 3 h;D:2%纤维素酶 R-10 和 1%离析酶 R-10,酶解 6 h;E:2%纤维素酶 R-10 和 1.5%离析酶 R-10,酶解 3h;F:2%纤维素酶 R-10 和 1.5%离析酶 R-10,酶解 6 h。

A:1.5% cellulase R-10 and 0.75% macerozyme R-10, digested for 3 h; B:1.5% cellulase R-10 and 0.75% macerozyme R-10, digested for 6 h; C:2% cellulase R-10 and 1% macerozyme R-10, digested for 3 h; D:2% cellulase R-10 and 1% macerozyme R-10, digested for 6 h; E:2% cellulase R-10 and 1.5% macerozyme R-10, digested for 3 h; F:2% cellulase R-10 and 1.5% macerozyme R-10, digested for 6 h.

图 1　不同酶解条件下大麦叶片下表皮原生质体的显微观察结果

Fig. 1　Microscopic observation results of protoplasts isolated from the lower epidermis of barley leaves under different enzymatic digestion conditions

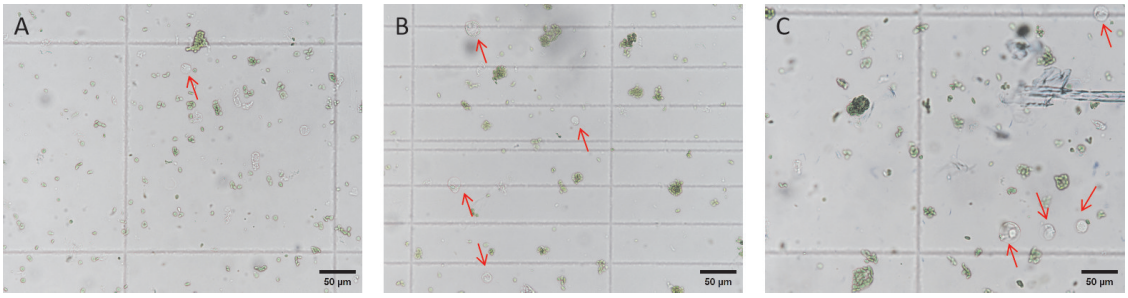
2.2 渗透压对原生质体产量和形态的影响

除酶组成与酶解时间外，渗透压是影响原生质体产量与形态的另一关键因素。在本研究中，首先测定了大麦叶片组织的渗透势为 630 mmol·kg^{-1}。然而，初始酶解液（M6 组合，甘露醇浓度 54.7 g·kg^{-1}）的渗透势为 410 mmol·kg^{-1}，显著低于叶片组织，可能会导致原生质体在酶解过程中因吸水而破裂。为此，通过补充甘露醇将酶解液渗透势分别调节至与组织等渗（630 mmol·kg^{-1}，甘露醇浓度 85.6 g·kg^{-1}）及略高于组织（680 mmol·kg^{-1}，甘露醇浓度 98.4 g·kg^{-1}）的状态，以探讨渗透压对原生质体分离效果的影响。结果表明（表 2 和图 2），当甘露醇浓度为 54.7 g·kg^{-1} 时，虽然原生质体产量较多（4.8×10^5 cells·mL^{-1}），但形态完整性一般，碎片较多（图 2A）。提高甘露醇浓度至 85.6 g·kg^{-1}（等渗条件）后，原生质体产量升至 5.6×10^5 cells·mL^{-1}，形态完整性有所改善，碎片减少（图 2B）。当甘露醇浓度提升至 98.4 g·kg^{-1}（略高渗）时，原生质体产量达到最高（5.8×10^5 cells·mL^{-1}），且绝大多数原生质体形态完整，呈规则圆球形（图 2C）。上述结果说明，将酶解液渗透压调节至接近或略高于组织渗透势，可有效维持原生质体的形态稳定性，并显著提高原生质体产量。

表 2 渗透压对原生质体产量和形态的影响（n=3）

Table 2 Effect of osmotic pressure on protoplast yield and morphology（n=3）

处理编号 Treatment code	甘露醇浓度 Mannitol concentration/(g·kg^{-1})	原生质体 Protoplast	
		产量 Yield/(×10^5 cells·mL^{-1})	形态 Morphology/(×10^5 cells·mL^{-1})
L1	54.7	4.8±0.3	原生质体游离较多，形态较完整，有碎片 Moderate yield; morphology mostlyintact but with debris
L2	85.6	5.6±0.1	原生质体游离较多，形态较完整，有少量碎片 Moderate yield; morphology mostly intact, slight debris
L3	98.4	5.8±0.2	原生质体游离多，形态完整，大多呈圆球形 High yield; morphology intact and predominantly spherical



A：甘露醇浓度 54.7 g·kg^{-1}；B：甘露醇浓度 85.6 g·kg^{-1}；C：甘露醇浓度 98.4 g·kg^{-1}。

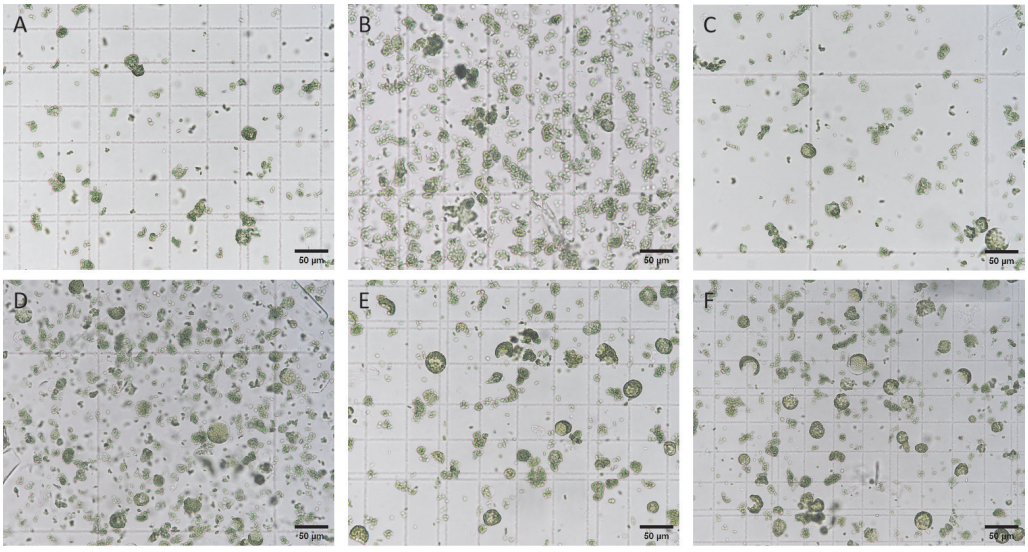
A: Mannitol concentration 54.7 g·kg^{-1}; B: Mannitol concentration 85.6 g·kg^{-1}; C: Mannitol concentration 98.4 g·kg^{-1}.

图 2 不同渗透压下大麦叶片下表皮原生质体的显微观察结果

Fig. 2 Microscopic observation results of protoplasts from the lower epidermis of barley leaves under different osmotic pressures

2.3 优化后的酶解体系对叶肉组织的适用性评估

为评估上述优化条件对叶肉组织是否适用，再次采用相同酶解体系（M1～M6）及渗透压条件（L1～L3）对大麦叶肉组织进行了原生质体分离，并进行了显微观察观测。结果（图 3）显示，叶肉组织的分离效率与下表皮细胞呈现出相似的变化趋势。在 M1、M2 处理条件下，叶肉原生质体释放极少，视野中可见大量细胞碎片（图 3A 和图 3B）。M3、M4 处理下，原生质体产量有所增加，但细胞形态仍不完整，游离不充分（图 3C 和图 3D）。M5 处理可获得较多形态相对完整的原生质体，但仍伴有明显碎片（图 3E）。而在 M6 处理条件下，叶肉原生质体释放量显著提高，形态完整，仅伴有少量碎片（图 3F）。结果表明，对于表皮组织最优的 M6 处理，对叶肉组织同样具有高效的原生质体分离效果，且酶浓度与酶解时间的变化对叶肉组织的影响趋势与表皮组织趋于一致。



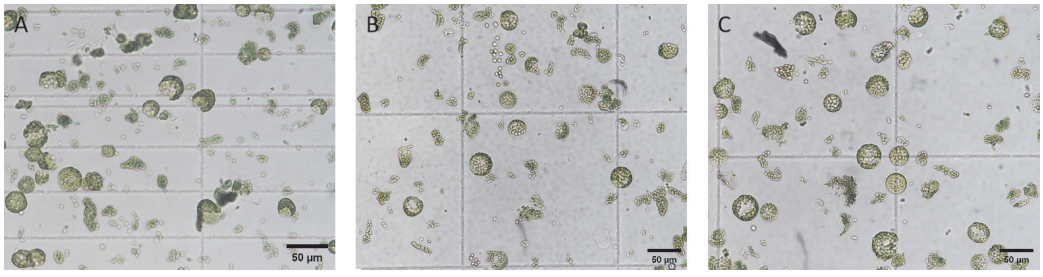
A:1.5%纤维素酶 R-10 和 0.75%离析酶 R-10,酶解 3 h;B:1.5%纤维素酶 R-10 和 0.75%离析酶 R-10,酶解 6 h;C:2%纤维素酶 R-10 和 1%离析酶 R-10,酶解 3 h;D:2%纤维素酶 R-10 和 1%离析酶 R-10,酶解 6 h;E:2%纤维素酶 R-10 和 1.5%离析酶 R-10,酶解 3 h;F:2%纤维素酶 R-10 和 1.5%离析酶 R-10,酶解 6 h。

A:1.5% cellulase R-10 and 0.75% macerozyme R-10,digested for 3 h; B:1.5% cellulase R-10 and 0.75% macerozyme R-10, digested for 6 h; C:2% cellulase R-10 and 1% macerozyme R-10, digested for 3 h; D:2% cellulase R-10 and 1% macerozyme R-10, digested for 6 h; E:2% cellulase R-10 and 1.5% macerozyme R-10, digested for 3 h; F:2% cellulase R-10 and 1.5% macerozyme R-10, digested for 6 h.

图 3　不同酶解条件下大麦叶肉原生质体的显微观察结果

Fig. 3　Microscopic observation results of mesophyll protoplasts isolated from barley leaves under different enzymatic digestion conditions

用 3 种渗透压对叶肉组织进行处理,当甘露醇浓度为 54.7 g·kg^{-1} 时,叶肉原生质体形态稍不规则,伴有细胞碎片(图 4A)。甘露醇浓度提升至 85.6 g·kg^{-1} 时,原生质体形态趋于球形,但仍见少量碎片(图 4B)。当甘露醇浓度增至 98.4 g·kg^{-1} 时,原生质体数量显著增加,形态完整,多数呈规则圆球形(图 4C)。结果表明,叶肉细胞对渗透压的敏感性与下表皮细胞相似。对于表皮组织最优的高渗条件(98.4 g·kg^{-1})对叶肉组织也具有高效的原生质体分离效果。



A:甘露醇浓度 54.7 g·kg^{-1};B:甘露醇浓度 85.6 g·kg^{-1};C:甘露醇浓度 98.4 g·kg^{-1}。

A:Mannitol concentration54.7 g·kg^{-1}; B:Mannitol concentration 85.6 g·kg^{-1}; C:Mannitol concentration 98.4 g·kg^{-1}.

图 4　不同渗透压下大麦叶肉原生质体的显微观察结果

Fig. 4　Microscopic observation results of mesophyll protoplasts from barley leaves under different osmotic pressures

3　讨论

在植物原生质体制备中,组织部位、酶解条件与渗透压调节等因素共同影响原生质体的产量、形态及活性,是获得高质量单细胞体系的关键环节[11,17,18]。本研究通过正交实验设计与渗透压优化,建立了一套适用于大麦叶片下表皮的高效原生质体制备方案,以下围绕酶解时间、酶液组成及渗透压 3 个核心因素展开讨论。

酶解时间是决定细胞壁降解程度与原生质体完整性的重要参数。酶解时间过短,细胞壁降解不充分,原生质体释放量低;酶解时间过长,则易

导致膜结构损伤，降低细胞活力[10,19]。不同物种乃至不同组织的最适酶解时间存在差异，这与细胞壁组成及细胞间连结特性密切相关。例如，甘薯叶片因纤维素含量高，需酶解 6 h 方可充分解离[9]，而青稞叶片组织相对疏松，5 h 即可获得较高产量[15]。本研究发现，在大麦叶片下表皮中，6 h 酶解结合适宜的酶浓度配比可显著提高原生质体产量与完整性，体现了组织特异性优化的重要性。

酶液组成是高效降解细胞壁的基础。纤维素酶主要分解纤维素成分，离析酶则作用于果胶类物质以解除细胞间粘连，二者协同促进单细胞释放[20]。不当酶配比易导致解离不完全或局部过度降解。由于不同植物细胞壁结构与组分存在差异，必须针对具体物种优化酶的种类、浓度及作用时间[18]。本研究通过正交实验发现，2%纤维素酶 R-10 与 1.5%离析酶 R-10 的组合对大麦叶片下表皮表现出最佳解离效果，说明该配比能有效平衡细胞壁降解与细胞膜保护之间的关系。

渗透压对维持原生质体形态与活力至关重要。细胞壁移除后，原生质体直接暴露于外界渗透环境中：低渗条件下易吸水膨胀破裂，高渗条件下则失水皱缩，均会导致活力下降[15,18,21]。本研究通过测定组织渗透势，将酶解液渗透压调节至略高于组织的水平（对应甘露醇 98.4 g·kg^{-1}），从而在维持原生质体形态圆整的同时获得最高产量。不同植物所需的最适渗透压存在种间差异，如铁冬青叶片需 127.5 g·kg^{-1} 甘露醇[18]，青稞叶片则在 91.1 g·kg^{-1} 时效果最佳[15]。这表明在实际研究中，需结合组织渗透势测定进行针对性优化。

综上所述，酶解时间、酶液组成及渗透压三者协同作用，共同决定植物原生质体的产量与质量。本研究通过正交试验与渗透压优化，确立了大麦叶片下表皮原生质体制备的适宜条件。该体系为大麦单细胞研究、基因功能验证及逆境应答分析提供了可靠的技术基础，同时也可为其他禾谷类作物原生质体分离体系的优化提供参考。

4 结论

本研究通过正交实验与渗透压优化，系统探究了酶组合、酶解时间及渗透压对大麦叶片下表皮原生质体制备的影响，确立了高效、稳定的原生质体分离体系。当纤维素酶 R-10 浓度为 2%、离析酶 R-10 浓度为 1.5%、酶解 6 h 时，细胞壁降解最为充分，原生质体产量最高且形态完整。在渗透压调控方面，提高甘露醇浓度至 98.4 g·kg^{-1}（渗透压略高于组织渗透势）可提升原生质体产量，并使其保持规则圆球形。将优化后的酶解体系应用于叶肉组织进行效果评估，发现该体系对叶肉组织也适用。综上，大麦叶片下表皮原生质体制备的最佳条件：2%纤维素酶 R-10 + 1.5%离析酶 R-10，酶解 6 h，甘露醇浓度 98.4 g·kg^{-1}。该体系不仅适用于大麦叶片下表皮组织，对叶肉组织同样高效，为大麦相关细胞生物学与分子生物学研究提供了可靠的技术支持。

参考文献：

[1]Yang Y，Fan B，Mu Y W，*et al*. A comparative metabolomics study of polyphenols in highland barley（*Hordeum vulgare* L.）grains with different colors [J]. *Food Research International*，2023，174：113672.

[2]Guo W B，Schreiber M，Marosi V B，*et al*. A barley pan-transcriptome reveals layers of genotype-dependent transcriptional complexity [J]. *Nature Genetics*，2025，57(2)：441.

[3]薛姗姗，郑 林，李璧滢，等. 环境因子调控气孔发育的分子机制[J]. 植物生理学报，2024，60(9)：1375.
Xue S S，Zheng L，Li B Y，*et al*. The molecular mechanisms of environmental factors guiding stomatal development [J]. *Plant Physiology Journal*，2024，60(9)：1375.

[4]Hou S G，Rodrigues O，Liu Z Y，*et al*. Small holes，big impact：Stomata in plant-pathogen-climate epic trifecta [J]. *Molecular Plant*，2024，17(1)：26.

[5]刘梦龙，魏 健，任姿蓉，等. 气孔研究进展：从保卫细胞到光合作用[J]. 生命科学，2024，36(10)：1289.
Liu M L，Wei J，Ren Z R，*et al*. Research progress of stomata：From guard cells to photosynthesis [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*，2024，36(10)：1289.

[6]Peng Y M，Liu Y，Wang Y F，*et al*. Stomatal maturomics：Hunting genes regulating guard cell maturation and function formation from single-cell transcriptomes [J]. *Journal of Genetics and Genomics*，2024，51(11)：1286.

[7]陈思慧，孙大宽，沙合热扎提·吾素云，等. 云南松原生质体制备及优化[J]. 云南农业大学学报，2024，39(11)：133.
Chen S H，Sun D K，Wusuyun S，*et al*. Preparation and optimization of *Pinus yunnanensis* protoplast [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*（*Social Science*），2024，39(11)：133.

[8]姜倩倩，陈 磊，李正男，等. 多年生黑麦草原生质体制备及瞬时表达体系的建立[J]. 分子植物育种，2021，19(9)：2941.
Jiang Q Q，Chen L，Li Z N，*et al*. Protoplast isolation and establishment of gene transient expression system in *Lolium perenne* L. [J]. *Molecular Plant Breeding*，2021，19(9)：2941.

[9]赵 昊，周晓晴，马遇乐，等. 甘薯叶片原生质体快速制备方法

的优化[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2023,40(4):283.
Zhao H,Zhou X Q,Ma Y L,*et al*. Optimization of rapid protoplast preparation method for sweet potato leaves [J]. *Journal of Qingdao Agricultural University*(*Natural Science*),2023,40(4):283.

[10]高成昱,王艺衡,靳江周,等. 梨叶片原生质体制备方法的建立及其基因瞬时转化试验[J]. 园艺学报,2023,50(5):1141.
Gao C Y,Wang Y H,Jin J Z,*et al*. Method for high efficiency isolation of protoplasts from pear leaves and its utility for gene transient expression [J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2023,50(5):1141.

[11]尚娟花,尹启琳,陈 磊,等.'济麦 22 号'原生质体制备及瞬时表达体系的建立[J]. 分子植物育种,2025,23(13):4363.
Shang J H,Yin Q L,Chen L,*et al*. Protoplast isolation and establishment of gene transient expression system in 'Jimai 22' [J]. *Molecular Plant Breeding*,2025,23(13):4363.

[12]汪子扬,李云芳,赵 星,等. 珠芽魔芋原生质体制备体系优化及瞬时转化[J/OL]. 分子植物育种,2024. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240618.1532.012.
Wang Z Y,Li Y F,Zhao X,*et al*. Optimization of the preparation system and transient transformation of amorphophallus bulbifer protoplasts [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*,2024. https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240618.1532.012.

[13]张向歌,朱雅婧,陆莉莉,等. 油莎豆原生质体制备的组织筛选及条件优化[J]. 河南农业科学,2023,52(12):49.
Zhang X G,Zhu Y J,Lu L L,*et al*. Tissue screening and condition optimization of protoplast preparation of *Cyperus esculentus* [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*,2023,52(12):49.

[14]翟 妞,徐国云,张 慧,等. 烟草根细胞原生质体的制备[J]. 烟草科技,2022,55(10):39.
Zhai N,Xu G Y,Zhang H,*et al*. Protoplast preparation of tobacco root cells [J]. *Tobacco Science & Technology*,2022,55(10):39.

[15]杨成兰,武雄雄,祁存英,等. 青稞叶片原生质体制备体系优化[J]. 青海大学学报,2021,39(4):26.
Yang C L,Wu X X,Qi C Y,*et al*. Optimization of protoplast preparation system of *Hordeum vulgare* L. var. nudum. leaves [J]. *Journal of Qinghai University*,2021,39(4):26.

[16]Kumar A,Rawat N,Thakur S,*et al*. A highly efficient protocol for isolation of protoplast from China,Assam and Cambod types of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [J]. *Plant Methods*,2023,19(1):147.

[17]黄瑞华,刘潇晗,曹天丽,等. 穿心莲叶片原生质体制备方法的建立与优化[J]. 分子植物育种,2021,19(17):5878.
Huang R H,Liu X H,Cao T L,*et al*. Optimization of protoplasts preparation of leaves from *Andrographis paniculata* (burm. f.) nees [J]. *Molecular Plant Breeding*,2021,19(17):5878.

[18]徐 丹,黄瑞华,刘 希,等. 铁冬青叶片原生质体制备方法的建立与优化[J/OL]. 分子植物育种,2023. https://kns.cnki.net/kcms/detail//46.1068.s.20230207.1101.001.html.
Xu D,Huang R H,Liu X,*et al*. The establishment and optimization for the extraction method of protoplasts from *Ilex rotunda* Thunb leaves [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*,2023. https://kns.cnki.net/kcms/detail//46.1068.s.20230207.1101.001.html.

[19]牛晓茹,景欢欢,田 宁,等. 萱草原生质体制备体系的优化[J]. 湖南生态科学学报,2022,9(4):60.
Niu X R,Jing H H,Tian N,*et al*. Optimization of protoplast preparation system of *Hemerocallis fulva* [J]. *Journal of Hunan Ecological Science*,2022,9(4):60.

[20]顾元钦,郑健云,钟婉欣,等. 金花茶叶片原生质体制备条件的优化[J/OL]. 分子植物育种,2023. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230309.1500.006.html.
Gu Y Q,Zheng J Y,Zhong W X,*et al*. Optimization on preparation condition of protoplast from *Camellia nitidissima* Chi leaves [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*,2023. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230309.1500.006.html.

[21]骈永茹,李婧怡,李勤奋,等. 巨大侧耳原生质体制备条件的优化[J]. 广西植物,2023,43(7):1308.
Pian Y R,Li J Y,Li Q F,*et al*. Optimization of protoplast preparation conditions of *Pleurotus giganteus* [J]. *Guihaia*,2023,43(7):1308.