

组织透明法观察葡萄叶片生长过程中气孔与叶脉形态结构特征变化

谢兆森^{1*}, 杜鸿儒¹, 李建宝¹, Bhaskar Bondada²

¹河北科技师范学院园艺科技学院, 河北秦皇岛066600

²华盛顿州立大学葡萄栽培与酿造科研中心, 美国华盛顿州里奇兰市 99354

摘要: 本文以‘摩尔多瓦’葡萄叶片为试验材料, 采用组织透明法观察了葡萄叶片生长过程中叶片表皮细胞、气孔和叶脉形态结构的变化, 测定与气孔和叶脉功能相关的生理指标变化, 比较了组织透明法、指甲油法和撕取法在观察葡萄叶片气孔上的实验效果。结果表明: 组织透明法能够清晰观察到葡萄叶片生长过程中叶片表皮细胞、气孔和叶脉形态结构的变化。相对于指甲油法、撕取法, 组织透明法操作简单, 且能保持组织完整性, 提升观察叶片细胞结构的实验效果。从叶片生长过程中气孔形态结构变化规律来看, 葡萄嫩叶齿尖存在大量的大气孔, 而叶片中部只观察到中央大气孔和正在发育的气孔保卫细胞母细胞。随着叶片生长, 叶片气孔保卫细胞母细胞逐渐发育形成成熟气孔, 叶片末端叶脉也是随叶片生长而生长, 叶脉密度逐渐增加, 提高了树体往叶片供水的效率。从与气孔和叶脉功能相关的各项生理指标变化来看, 气孔导度随着气孔逐渐形成和成熟而逐渐升高, 但叶片含水量和水势下降, 有利于拉升水分和养分从根系往地上树体各器官运输, 满足整个植株生长发育的需要。

关键词: 葡萄; 组织透明; 叶片; 气孔; 叶脉

葡萄是全世界广泛栽培的一种果树, 除南极洲以外, 其他六大洲均有葡萄种植。葡萄叶片是气体交换与水分散失的主要部位, 也是制造光合产物的场所, 叶片制造的光合产物为植株的生长发育提供能量, 是决定葡萄果实产量与品质的重要器官(刘洪波等2011)。葡萄从幼叶到成熟叶片的生长过程, 也是从库器官到源器官逐步转化的过程, 叶片结构是决定叶片功能的基础, 观察叶片生长过程中形态结构变化是研究叶片光合生理及其他生理活动的基础。李建华和罗国光(1996)研究发现随着葡萄叶片生长, 叶片形态结构也随之变化, 进而影响到叶片各项生理活动。宋丽清等(2015)研究也发现叶片形态结构特征与其生理生化活动密切相关, 尤其是叶片气孔和叶脉特征, 关系到叶片光合速率、水分蒸腾和运输速率的大小。叶片中叶脉是水分与营养物质的运输器官, 水分从叶脉进入到叶肉细胞和气孔下部附近的蒸发部位, 然后通过气孔蒸腾散失(龚容和高琼2015)。张亚等(2014)研究表明高叶脉密度缩短了水分从叶脉到气孔的距离, 叶片蒸腾加快, 进而提升叶片的光合速率。气孔是植物体内水分运输的最后一站, 它与叶脉协同响应共同调控叶片与大气间的水分、气体的交换。因此叶脉和气孔是调控叶片水分散失的重要结构, 同时影响叶片光合、呼吸、蒸腾等生理功能。

人们通过形态解剖学方法能够了解观察叶片细胞结构、形态、大小等, 尤其是利用机械切片法观察叶片表皮细胞、栅栏组织、海绵组织等细胞的结构, 为研究叶片生理反应奠定基础, 但是切片实验往往破坏了器官结构的完整性和连续性, 不能获取组织器官系统完整的组织结构信息(Liberato等2005)。植物组织透明技术最早于上世纪70年代提出, 主要应用在植物生殖学研究领域(杨弘远1986, 1988)。植物组织透明技术是利用透明剂浸泡或注射, 使得某些组织和器官在视觉和光学仪器下能够透明可见, 并结合组织染色, 能够系统完整观察组织和器官的细胞结构, 组织透明法弥补了传统的组织切片技术的不足, 目前在植物生殖学过程研究中应用较广, 包括花粉发育、受精与胚发育、种子形成与果实发育等(杨鹭生和李国平等2004; 杜中等1995; 郭海滨等2006; 李国平等2006)。在医学研究上, 组织透明法作为一种新兴的组织样品制备技术, 已经广泛应用到临床医学和基础医学研究中(Li等2010; Yang等2014)。目前尽管国内对植物组织透明法的研究未引起足够的

收稿 2017-09-06 修定 2018-01-15

资助 国家自然科学基金项目(31470104)和河北省自然科学基金(C2018407036)。

* 通讯作者(xiezhaosen@sina.com)。

重视,但随着光学显微技术的提高,组织透明法的实验效果也大大改善,越来越受到人们的关注。

人们对葡萄叶片生长和光合作用进行了大量的研究(卞凤娥等2017),但对其生长过程中气孔和叶脉等结构特征变化研究较少,尤其是通过组织透明法研究葡萄叶片生长过程中叶片形态结构特征变化还未见报道。本试验通过采用组织透明法研究了葡萄叶片生长过程中叶片表皮细胞、气孔特征、叶脉结构等形态指标的变化,并调查叶片生长动态与气孔导度变化,综合分析叶片生长过程中表皮细胞大小、气孔形态、叶脉结构与分布等结构变化,为生产中葡萄叶片管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选取河北科技师范学院园艺实验站中的5年生‘摩尔多瓦’葡萄(*Vitis vinifera* L.)植株,采用单臂篱架种植,树形为顺行改良J形。选取生长一致的健康植株,在5月中旬新梢摘心前开展试验,每植株选取长度生长一致的新梢3个,每新梢选取顶端初展叶叶片进行观察取样,共选取植株10株。

1.2 实验方法

1.2.1 叶片生长动态观察

选取生长势一致的新梢顶端未展叶叶片,并做标记,从叶片与新梢分离后开始定期测量叶片中脉长度,直至叶片中脉长度不再变化。测定中脉的同时,用叶面积仪测定叶片面积。

1.2.2 用组织透明法处理的叶片观察

分别在叶片展叶前(W_0)、展叶后1周(W_1)、展叶后2周(W_2)、展叶后3周(W_3)和展叶后4周(W_4)进行采样。采样时选取新鲜叶片,取叶片中部1 cm×1 cm大小的小块(避开主脉),并立即放入乙酸乙醇的固定液中固定24 h。固定结束后,采用不同浓度乙醇溶液进行梯度脱水,完成脱水后放入5%氢氧化钠溶液内浸泡42 h,直至叶片变白。氢氧化钠浸泡后将叶片转入去离子水中清洗2~3次,后转入饱和和三氯乙醛溶液中,直至叶片完全透明。然后用去离子水清洗,将三氯乙醛完全清洗干净。最后用3%甲苯胺蓝水溶液染色3~5 min,制片在显微镜下观察叶片表皮细胞、气孔和叶脉结构。

1.2.3 用其他方法处理的叶片观察

除透明法外,本文采用指甲油法和撕取法进

行对比观察。指甲油法:选取新鲜的成熟葡萄叶片,清洗干净并晾干,在叶片中部用无色指甲油涂抹1 cm×1 cm面积大小,晾干后撕取指甲油薄膜,制片观察。撕取法:在叶片中部(避开主脉)取1 cm×1 cm的小块,放入离解液中(铬酸1.7 g、浓硫酸10 mL、浓硝酸5 mL、水85 mL),约1 h后,撕取下表皮,制片观察。

1.2.4 叶片气孔导度测定、水势和含水量测定

分别在叶片完全展叶后1周(W_1)、完全展叶后2周(W_2)、完全展叶后3周(W_3)和完全展叶后4周(W_4)进行测定。在上午10点,选取与挂牌叶片同龄的叶片,使用SC-1型稳态气孔计(Decagon Devices, USA)测定叶片气孔导度(Schulte和Brooks 2003)。将测定完气孔导度的叶片摘下,立即用压力室法测定叶片水势(谢兆森等2016),同时测定鲜重。带回实验室后,烘箱烘干后测干重,并计算叶片含水量。

2 实验结果

2.1 葡萄叶片生长动态

从叶片中脉和叶面积变化规律来看,葡萄叶片生长呈单S型曲线(图1)。在叶片生长初期,中脉

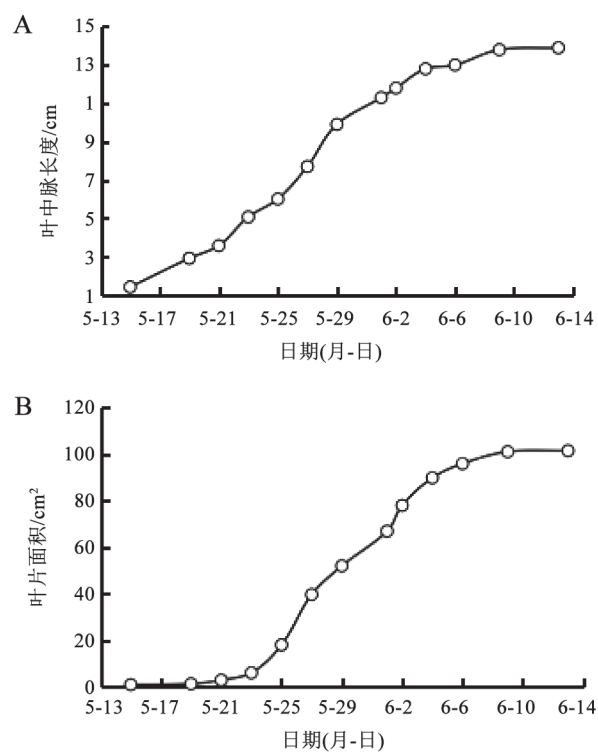


图1 ‘摩尔多瓦’葡萄叶片生长动态
Fig.1 The growth dynamic of ‘Moldova’ grape leaves

长度明显大于其他主脉,但叶面积增长受中脉和各级侧脉生长的影响,叶片中脉与叶面积的生长趋势不完全同步,但中脉生长速率仍是影响叶面积增加的主要指标。葡萄叶片幼叶到成熟叶片约30 d,在开始生长7 d后,叶面积开始迅速生长,迅速生长期持续约17 d;叶片面积增长进入缓慢生长期;中脉生长在叶片生长开始后5 d进入到迅速生长期;持续大约14 d进入缓慢生长期(图1-A和B)。

2.2 葡萄叶片生长过程中叶片上表皮细胞形态的变化

通过观察葡萄叶片完全展叶1周、2周、3周和4周后的表皮细胞特征,可以看出,随着叶片的生长,叶片表皮细胞大小逐渐增加,单位面积内细胞数量下降,细胞体积增加。从上表皮细胞形态来看,上表皮未见气孔分布,在葡萄叶片整个生长过程中,叶片呈4~7边形,垂周壁为平直式样(图2和表1)。随着叶片生长,单位叶片面积内细胞数量减少,在展叶后1周细胞面积为 $76.32 \mu\text{m}^2$ (图2-A和表1),第4周细胞大小达到最大,细胞面积为 $189.78 \mu\text{m}^2$,且随着叶片生长停止,上表皮细胞在形态大小上保持稳定(图2-D和表1)。

2.3 葡萄叶片生长过程中气孔形态变化

在叶片未完全展叶前观察了其顶端(齿尖)和中部气孔形态发现,叶片齿尖无表皮毛分布,同时可观察到大量的大气孔,气孔平均长度为 $23.06 \mu\text{m}$ (图3-B、D和F,表2);而叶片中部只可见少量大气孔和正在发育的气孔保卫细胞母细胞,气孔密度最小(图3-A、C和E,表2)。随着叶片生长,气孔保卫细胞逐渐形成小气孔,在完全展叶后1周,在叶片中部可见中央大气孔和周围分布的小气孔,气孔密度达到最大,气孔平均长度 $12.24 \mu\text{m}$,宽度为 $14.16 \mu\text{m}$,宽度大于长度(图4-A和表2)。在叶片继续生长过程中,气孔密度逐渐减少,气孔逐渐变大,但中央大气孔长度和宽度生长低于周围小气孔,这表明中央大气孔在未展叶前已发育成熟(图4-A~E和表2)。在完全展叶后4周,叶片气孔达到最大,平均长度为 $24.59 \mu\text{m}$,宽度为 $19.45 \mu\text{m}$,气孔长大于宽,这表明在葡萄叶片气孔发育过程中,气孔保卫细胞的纵向伸长生长大于其横向的膨大生长(图4-D~F和表2)。从叶片生长各时期的气孔大小分布来看,未展叶前,94%叶片中部气孔长度在 $20\sim 30 \mu\text{m}$ 范围内;完全展叶后1~2周,气孔主要在

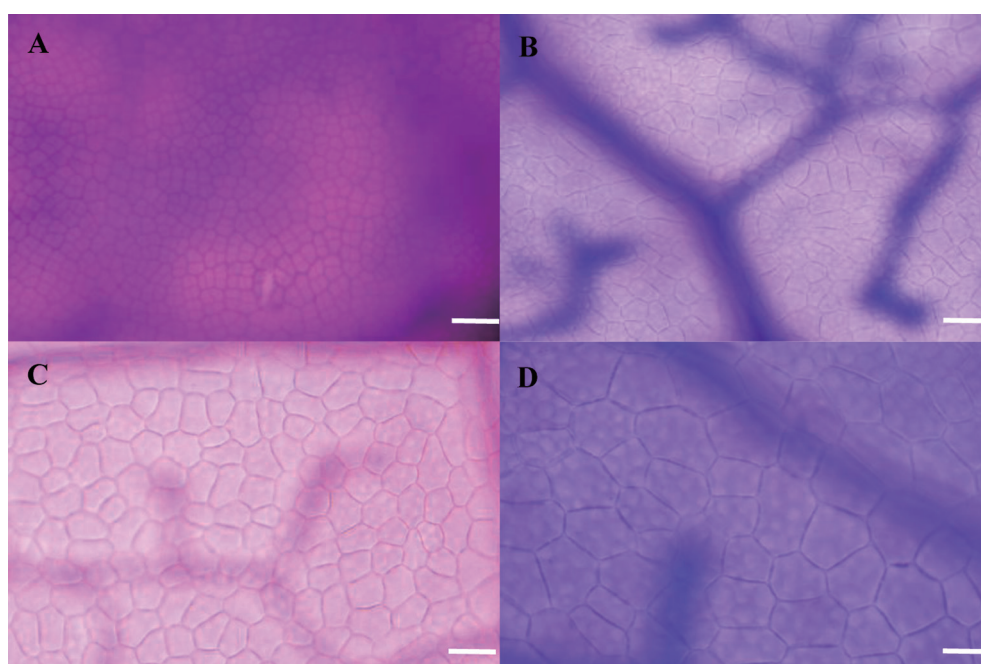


图2 用组织透明法处理的‘摩尔多瓦’葡萄叶片上表皮细胞显微观察

Fig.2 The microscopic observation of upper epidermal cells of ‘Moldova’ grape leaf after tissue clearing

A: 展叶后1周; B: 展叶后2周; C: 展叶后3周; D: 展叶后4周。图中标尺代表长度为 $25 \mu\text{m}$ 。

表1 ‘摩尔多瓦’葡萄叶片上表皮细胞特征
Table 1 The character of upper epidermal cells
of ‘Moldova’ grape leaf

生长时期	细胞形状	垂周壁式样	细胞面积/ μm^2
W ₁	4~7边形	平直	76.32
W ₂	4~7边形	平直	132.41
W ₃	4~7边形	平直	157.67
W ₄	4~7边形	平直	189.78

20 μm 以下; 在完全展叶后3~4周, 气孔长度在10~30 μm 之间, 长度在20~30 μm 的气孔所占比例显著高于前2周。在完全展叶后3~4周可以观察到长度大于30 μm 的气孔, 但所占比例较低, 仅为4%和3% (表3), 分布在成熟叶片上。

2.4 葡萄叶片生长过程中末端叶脉特征变化

葡萄叶脉是水分与养分运输的通道, 尤其是末端叶脉是与叶肉细胞直接相连的水分与物质运输通道。通过采用组织透明法能够清晰观察到葡萄叶片末端叶脉形态结构。在葡萄叶片生长过程中, 末端叶脉不断分化发育, 在完全展叶后1周, 可以看到正在分化形成的末端叶脉, 且末端叶脉较短, 还未在单位闭合叶脉环中形成分支系统(图5-A); 在完全展叶后2周可看见末端叶脉继续在单位闭合叶脉环内伸长生长, 但未见出现分支(图5-B), 在完全展叶后3周可以看到末端叶脉出现较短小的分支(图5-C), 在完全展叶后4周末端叶脉已经形成较完整的分支系统(图5-D), 这表明叶脉与

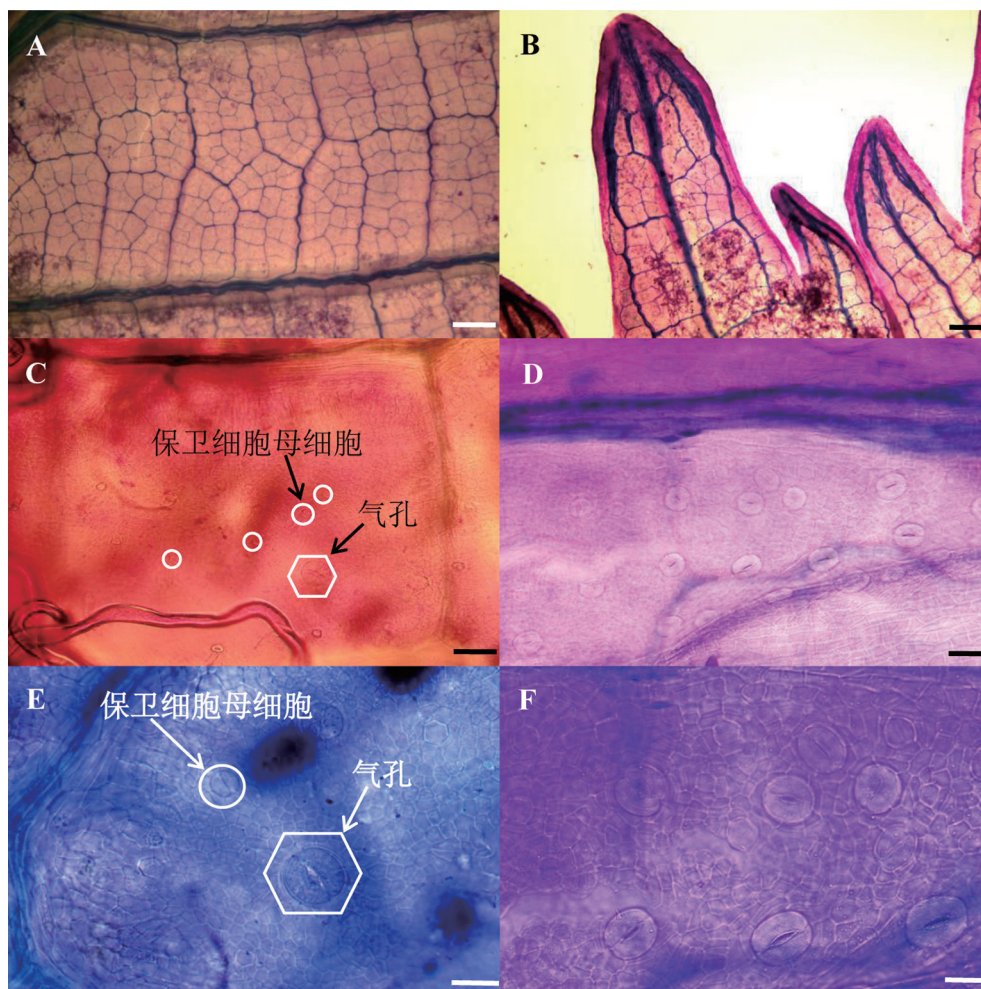


图3 ‘摩尔多瓦’葡萄展叶前叶片齿尖与中部的气孔形态与分布

Fig.3 The morphology and distribution of stomata on the tooth-tips and center of ‘Moldova’ grape leaf before leaf open

A: 叶片中部形态特征; B: 叶片齿尖形态特征; C和D: 20倍物镜下叶片中部和齿尖气孔形态与分布; E和F: 40倍物镜下叶片中部和齿尖气孔形态与分布。A和B中标尺代表长度为0.25 mm, C和D中标尺代表长度为50 μm , D和E中标尺代表长度为25 μm 。

表2 ‘摩尔多瓦’葡萄叶片生长过程中气孔形态指标变化

Table 2 Changes in morphological indexes of stomata on ‘Moldova’ grape leaf during leaf growth

生长时期	叶面积/cm ²	气孔长度/μm	气孔宽度/μm	长宽比	气孔面积/μm ²	气孔密度/个·mm ⁻²
W ₀	8.92	23.06	17.95	1.28	385.69	16
W ₁	16.84	12.24	14.16	0.86	64.13	264
W ₂	24.34	16.47	15.87	1.03	154.76	233
W ₃	56.28	21.32	18.17	1.17	329.78	178
W ₄	103.46	24.59	19.45	1.26	428.65	143

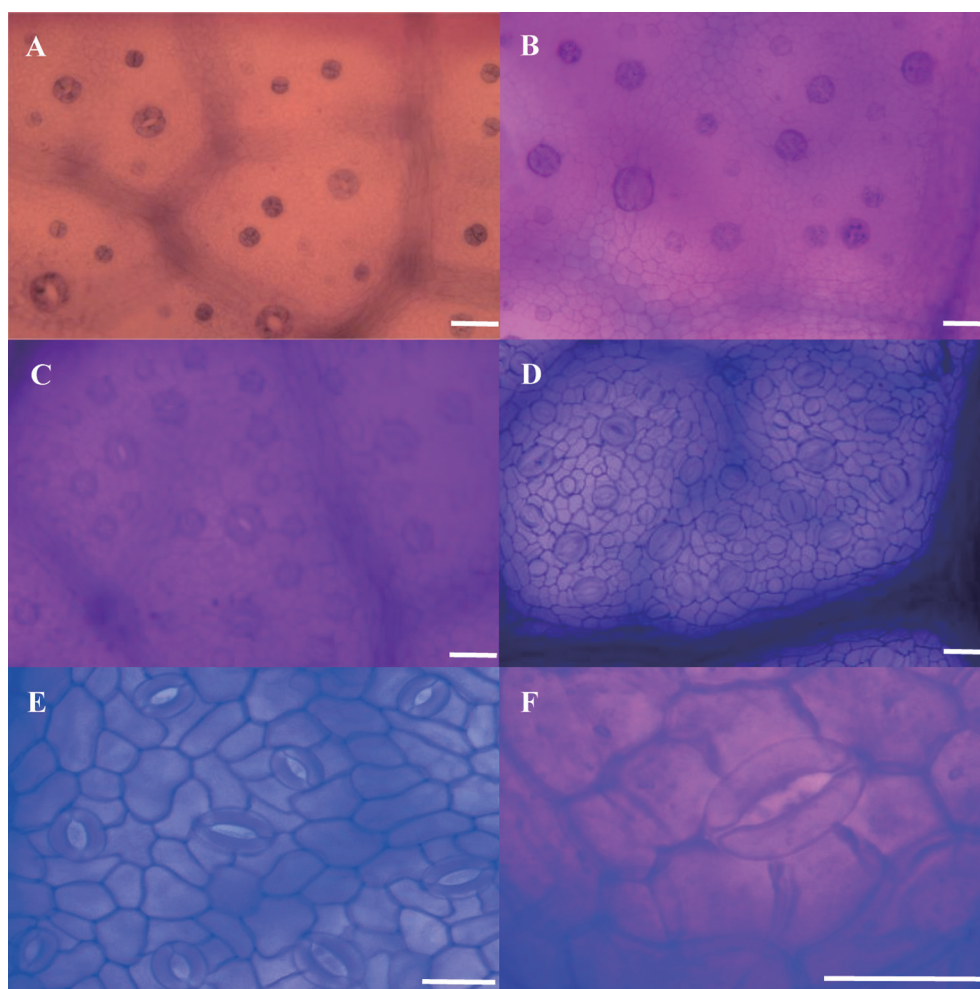


图4 ‘摩尔多瓦’葡萄完全展叶后叶片中部气孔的形态与分布

Fig.4 The morphology and distribution of stomata on the center of ‘Moldova’ grape leaf after leaf open

A: 展叶后1周; B: 展叶后2周; C: 展叶后3周; D和E: 展叶后4周; F: 展叶后4周叶片中央大气孔。图中标尺代表长度为25 μm。

叶肉细胞间建立起较完善的水分与物质联系。在叶片生长过程中, 末端叶脉密度随着叶脉的生长而不断增加, 其中在完全展叶后1周, 末端叶脉密度只有 $3.23 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-2}$, 而在完全展叶后4周末端叶脉密度达到了 $40.34 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-2}$ 。

2.5 葡萄叶片生长过程中叶片气孔导度、水势和含水量变化

从叶片生长过程中的气孔导度变化来看, 叶片完全展叶后1周, 叶片气孔导度最低, 为 $35.23 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 随着叶片生长, 叶片气孔导度逐渐增

表3 ‘摩尔多瓦’葡萄叶片生长过程中不同长度的气孔分布比例

Table 3 The proportion of different length of stomata distribution ‘Moldova’ grape leaf

生长时期	气孔分布比例/%			
	0~10 μm	11~20 μm	21~30 μm	>30 μm
W ₀	0	4	94	0
W ₁	41	55	4	0
W ₂	37	60	3	0
W ₃	13	51	32	4
W ₄	7	29	61	3

加, 在叶片完全展叶后4周达到最大, 为 $187.85 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (表4), 这表明叶片生长过程中气孔逐渐发育成熟, 发育成熟后的气孔才能稳定进行水分蒸腾和气体交换。随着叶片生长和气孔发育, 叶片水势逐渐降低, 其中完全展叶后1周叶片水势为 -0.85 MPa , 完全展叶后4周叶片水势降低至 -1.52 MPa (表4)。与之相对应的是叶片含水量也随着叶片生长逐渐下降, 在完全展叶后1周叶片含水量为71.43%, 完全展叶后4周降至68.35% (表4), 这表明在叶片生长过程, 叶片较低水势和含水量

能够增加水分往叶片中运输, 同时保持根系与叶片间的水势差, 促进根系水分吸收和物质在树体内的运输与分配。

2.6 不同方法处理的气孔形态观察

通过采用指甲油法、撕取法、透明法和透明染色法观察葡萄叶片气孔形态, 结果(图6)表明, 4种方法观察效果存在差异。指甲油法受涂抹的厚度和周围环境的影响, 实验观察效果稳定性较差, 在取得较好实验结果的情况下可以准确测定气孔长度、宽度和开张度, 但2个保卫细胞不能完全分辨(图6-A)。相对于指甲油法和透明法, 撕取法程序相对复杂, 撕取的下表皮能够在显微镜下能够观察到气孔保卫细胞, 也能够测定气孔长度、宽度, 但在撕取前需要用强酸离析, 对葡萄嫩叶表皮细胞较薄, 离析后要获得较完整的表皮, 难度较大(图6-B)。透明法在不破坏叶片细胞结构的情况下, 实验方法简单易行, 从观察效果来看, 透明后叶片表皮细胞能够清晰可见, 气孔长度、宽度、开张度都可精确测定, 透明后叶片经甲苯胺蓝染色后气孔和表皮细胞被染成蓝色, 提升观察效果(图6-C和D)。

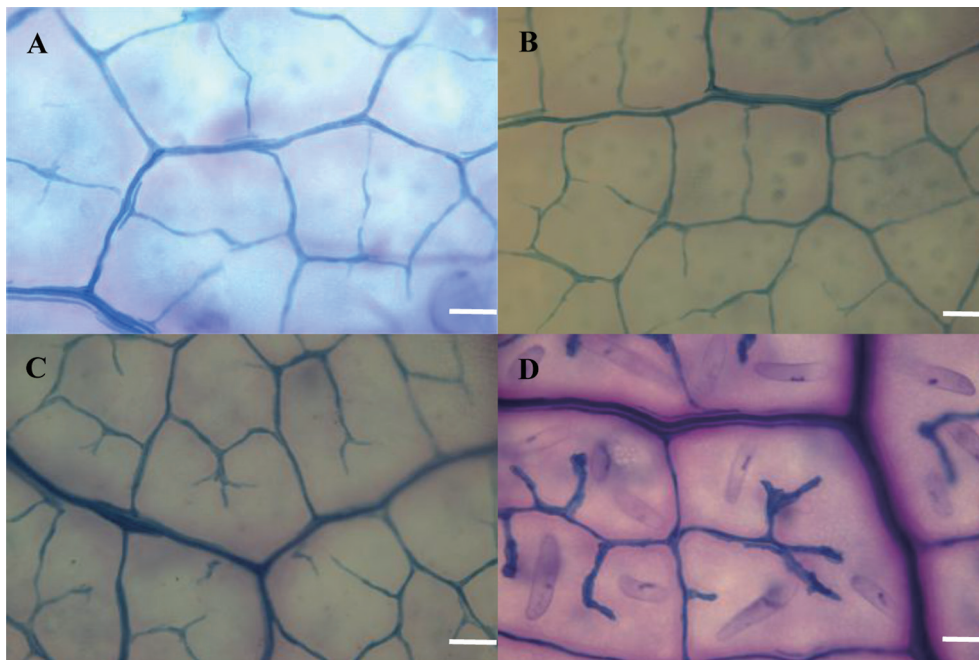


图5 ‘摩尔多瓦’葡萄完全展叶后叶片中部叶脉的形态与分布

Fig. 5 The morphology and distribution of vein on the center of ‘Moldova’ grape leaf after leaf open

A: 展叶后1周; B: 展叶后2周; C: 展叶后3周; D: 展叶后4周。图中标尺代表长度为 $50 \mu\text{m}$ 。

表4 ‘摩尔多瓦’葡萄叶片展叶后气孔导度、含水量和水势变化

Table 4 Changes in stomatal conductance, water content and water potential of ‘Moldova’ grape leaf after leaf open

生长时期	气孔导度/ $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	叶片含水量/%	叶片水势/MPa
W ₁	35.23	77.37	-0.81
W ₂	68.15	74.50	-0.95
W ₃	135.78	71.43	-1.28
W ₄	187.85	68.35	-1.52

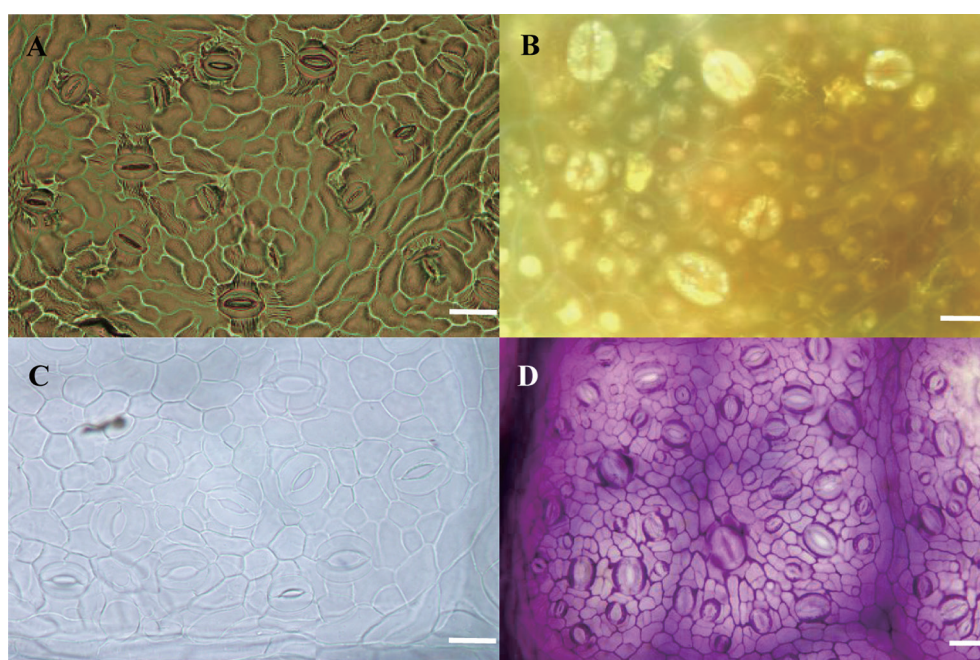


图6 不同实验方法处理‘摩尔多瓦’葡萄气孔形态显微观察

Fig.6 The microscopic observation of stomata of ‘Moldova’ grape leaf with different experimental methods

A: 指甲油法; B: 撕取法; C: 组织透明法; D: 组织透明和染色法。图中标尺代表长度为25 μm 。

3 讨论

葡萄叶片生长是一个动态变化的过程, 叶片外部形态和内部生理结构都随之发生变化。从本文的实验结果来看, 采用组织透明技术观察叶片表皮细胞和叶脉形态结构特征变化简单易行, 既能观察叶片表皮细胞、气孔结构特征, 又能观察叶脉结构特征, 且取得较理想的实验效果。在以往的研究中, 人们多采取指甲油法观察葡萄叶片气孔和表皮细胞结构, 在实验操作时, 要获得理想的观察效果, 操作者要熟练掌握准确的指甲油涂抹的厚度和撕取的时间, 实验成功率远不如植物组织透明法高(崔宏安等2007; 黄丛林和张大鹏1996)。采用撕取法, 往往因葡萄幼叶太薄无法获取相对完整的叶片表皮, 同时撕取法往往携带叶

肉, 使得取样厚薄不均, 给下一步显微观察造成了一定的不便, 影响了实验效果。本文所采用组织透明法所使用的试剂为实验室常规试剂, 相对离析用的高浓度的强酸溶液毒性小, 安全性高, 且操作简便易行。组织透明法在不破坏植物组织结构的情况下, 采取固定、脱水、透明和染色等步骤进行观察, 尤其是对幼嫩组织观察效果更佳。郝建华和强胜(2007)在对菊科植物整个花器官进行透明后可以清晰地观察到花雌雄蕊的生殖过程和花发育状态, 同时能看到花外部形态变化与内部发育的相关变化。Young等(1979)比较了组织透明法和常规石蜡切片法的优缺点发现, 组织透明法可以大大提高工作效率, 花费的时间只有切片法的十分之一。

组织透明法观察植物组织结构过程中最关键的步骤就是透明,必须达到理想的透明效果才能观察到相应的组织结构和形态特征。目前人们在建立和优化植物组织透明方法上进行了大量的研究,尤其是综合使用多种透明剂进行组织透明,以期找出较理想的透明方法(李彦坤等2011; Villani等2013; 赵林姝等2014)。本文采用氢氧化钠和三氯乙醛相结合进行透明,能够使得葡萄叶片达到完全透明,并在制片过程中使用甘油透明装片,达到了预期的实验效果。赵林姝等(2014)在使用不同透明剂观察小麦叶片气孔时,发现不同透明剂处理的叶片保卫细胞的清晰度差异显著,对小麦叶片来说,较理想的透明剂有3种,分别为甘油溶液、饱和三氯乙醛以及水合三氯乙醛与甘油混合液。在医学研究中,组织透明法曾被评为2013年十大科学突破之一,受到人们的关注(Chung等2013)。在植物学研究中可以借鉴医学上的组织透明方法,并加以改进来提升植物组织透明方法的研究水平和实验效果。

本文通过组织透明法观察了叶片从幼叶到成熟叶片过程中上表皮细胞结构、气孔形态特征、叶脉密度和分布,结果表明叶片由嫩叶到成熟叶的生长过程,也是气孔和叶脉逐渐生长发育的过程。本文在对未展叶气孔分布发现叶片齿尖存在高密度的大气孔,而同时期叶片中部只看到中央大气孔和正在发育的保卫细胞母细胞,这说明葡萄叶片不同气孔类型存在发育的不同步性,中央大气孔在未展叶前已经形成并发育成熟,而周围气孔则在叶片生长过程中逐渐发育而成。马会勤和罗国光(1999)在研究‘巨峰’和‘无核’红葡萄叶片不同部位下表皮气孔形态结构和发育情况时发现,在叶片齿尖存在大量的大气孔群,这与本文研究结果相同。叶片气孔是由叶片发育早期未分化的表皮细胞发育而来,其发育过程由多次不对称分裂和一次性分裂形成,气孔的发育除受自身遗传影响外,外界环境也影响到气孔的大小、分布和密度,比如水分、光照、二氧化碳等因素(Casson和Hetherington 2010; Kondo等2010)。本实验研究表明随着叶片由嫩叶生长为成熟叶,叶片气孔密度下降,但气孔长度、宽度和叶面积增加,叶片末端叶脉密度也逐渐增加,同时与气孔功能和叶脉

密度密切相关的生理指标如叶片水势、气孔导度、叶片含水量等也相应变化。以往的研究也表明气孔作为水分散失的主要部位,叶片气孔导度和蒸腾量与叶片气孔密度和分布密切相关,叶脉作为水分运输的主要通道,影响着叶片水分的供给,因此叶脉和气孔共同影响着叶片水分状态,而且存在一定的协同关系(Carins等2012, 2014)。本文中结果表明,随着叶片末端叶脉密度增加,叶片气孔导度增加,水势和含水量下降,而气孔大小和密度共同影响叶片水分生理的各项指标。宋丽清等(2015)研究发现叶片叶脉密度大,导水能力越强,蒸腾速率也高,这与本文的研究结果相同。

综上所述,本文采用组织透明法观察了葡萄叶片生长过程中叶片气孔和叶脉发育的形态结构变化,并结合测定叶片生长动态和叶片水分生理指标,结果表明了组织透明法可以简单有效的研究叶片气孔和叶脉形态结构,同时叶片生长过程中,气孔和叶脉形态结构的变化影响着叶片气孔导度、含水量、水势等生理指标,这也反映了植物组织结构是决定其功能的基础。

参考文献

- Bian FE, Sun YJ, Niu YJ, et al (2017). Effect of root-applied melatonin on photosystem II in grape leaves under heat stress. *Plant Physiol J*, 53 (2): 257–263 (in Chinese with English abstract) [卞凤娥, 孙永江, 牛彦杰等(2017). 高温胁迫下根施褪黑素对葡萄叶片叶绿素荧光特性的影响. *植物生理学报*, 53 (2): 257–263]
- Carins MR, Jordan GJ, Brodribb TJ (2012). Differential leaf expansion can enable hydraulic acclimation to sun and shade. *Plant Cell Environ*, 35 (8): 1407–1418
- Carins MR, Jordan GJ, Brodribb TJ (2014). Acclimation to humidity modifies the link between leaf size and the density of veins and stomata. *Plant Cell Environ*, 37 (1): 124–131
- Casson SA, Hetherington AM (2010). Environmental regulation of stomatal development. *Curr Opin Plant Biol*, 13 (1): 90–95
- Chung K, Wallace J, Kin SY, et al (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497 (7449): 332
- Cui HA, Liu YQ, Bai HX (2007). A new method to observe stomas. *Acta Agri Boreali-Occident Sin*, 16 (6): 305–306 (in Chinese with English abstract) [崔宏安, 柳延琴, 白红霞(2007). 观察气孔的一种新方法. *西北农业学报*, 16 (6): 305–306]

- Du Z, Zhao SX, Zhou HY, et al (1995). The use of differential interference contrast microscope and whole-clearing of ovaries for observation on embryo sacs structure of rice and wheat. *J Agri Biotechnol*, 3 (4): 94–97 (in Chinese with English abstract) [杜中, 赵世绪, 周海鹰等(1995). 用微分干涉差显微镜和子房整体透明法观察水稻和小麦的胚囊结构. *农业生物技术学报*, 3 (4): 94–97]
- Gong R, Gao Q (2015). Research progress in the effects of leaf hydraulic characteristics on plant physiological functions. *Chin J Plant Ecol*, 39 (3): 300–308 (in English with Chinese abstract) [龚容, 高琼(2015). 叶片结构的水力学特性对植物生理功能影响的研究进展. *植物生态学报*, 39 (3): 300–308]
- Guo HB, Lu YG, Feng JH, et al (2006). Further observation on the formation and development of autotetraploid rice embryo sac using laser scanning confocal microscopy. *Acta Laser Biol Sin*, 15 (2): 111–117 (in Chinese with English abstract) [郭海滨, 卢永根, 冯九焕等(2006). 利用激光扫描共聚焦显微术对同源四倍体水稻胚囊形成与发育的进一步观察. *激光生物学报*, 15 (2): 111–117]
- Hao JH, Qiang S (2007). The examples and analysis of whole-mount clearing techniques in plant biology. *Chin Bull Bot*, 24 (4): 490–497 (in Chinese with English abstract) [郝建华, 强胜(2007). 整体透明技术在植物生物学中的应用实例及其剖析. *植物学通报*, 24 (4): 490–497]
- Huang CL, Zhang DP (1996). Studies on physiological and environmental factors inducing diurnal photosynthetic depression in grapevine leaves. *Acta Hort Sin*, 23 (2): 128–132 (in Chinese with English abstract) [黄丛林, 张大鹏(1996). 葡萄叶片光合速率日间降低内外因调控的研究. *园艺学报*, 23 (2): 128–132]
- Kondo T, Kajita R, Miyazaki A, et al (2010). Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant Cell Physiol*, 51 (1): 1–8
- Li A, Gong H, Zhang B, et al (2010). Micro-optical sectioning tomography to obtain a high-resolution atlas of the mouse brain. *Science*, 330 (6009): 1404–1408
- Li GP, Huang QC, Qin GY (2006). The observation of pollen and pollen tube of *Cedrus deodara* with laser scanning confocal microscope. *Acta Laser Biol Sin*, 15 (1): 1–8 (in Chinese with English abstract) [李国平, 黄群策, 秦广雍(2006). 用激光扫描共聚焦显微镜观察雪松花粉和花粉管. *激光生物学报*, 15 (1): 1–8]
- Li JH, Luo GG (1996). Dynamics of the leaf growth and photosynthetic characteristics for kyoho grapevines. *Acta Hort Sin*, 23 (3): 213–217 (in Chinese with English abstract) [李建华, 罗国光(1996). 巨峰葡萄叶片生长动态与光合特性的研究. *园艺学报*, 23 (3): 213–217]
- Li YK, Zhang GG, Zhao LN, et al (2011). The study on the embryos development of *Boehmeria tricuspis* by whole clearing techniques. *Plant Fiber Sci China*, 33 (3): 142–146 (in Chinese with English abstract) [李彦坤, 臧巩固, 赵立宁等(2011). 整体透明技术观察悬铃木芭麻胚胎发育的方法研究. *中国麻业科学*, 33 (3): 142–146]
- Liberato JR, Barreto RW, Shivas RG (2005). Leaf-clearing and staining techniques for the observation of conidiophores in the Phyllactinioideae (*Erysiphaceae*). *Australas Plant Path*, 34 (3): 401–404
- Liu HB, Bai YG, Zhang JH, et al (2011). Study on the rule of hydraulic of grape in SPAC system in extreme arid region. *Res Soil Water Conserv*, 18 (6): 185–189 (in Chinese with English abstract) [刘洪波, 白云岗, 张江辉等(2011). 极端干旱区葡萄spac系统水流阻力规律研究. *水土保持研究*, 18 (6): 185–189]
- Ma HQ, Luo GG (1999). Morphology and development of adaxial stomata on tooth-tips of grape leaves. *J China Agri Uni*, 4 (5): 118–124 (in Chinese with English abstract) [马会勤, 罗国光(1999). 葡萄叶片齿尖上表皮气孔形态及发育特征. *中国农业大学学报*, 4 (5): 118–124]
- Schulte PJ, Brooks JR (2003). Branch junctions and the flow of water through xylem in Douglas-fir and ponderosa pine stems. *J Exp Bot*, 54 (387): 1597–1605
- Song LQ, Hu CM, Hou XL, et al (2015). Relationship between photosynthetic characteristics and leaf vein density in *Sorghum bicolor* and *Perilla frutescens*. *Chin Bull Bot*, 50 (1): 100–106 (in Chinese with English abstract) [宋丽清, 胡春梅, 侯喜林等(2015). 高粱、紫苏叶脉密度与光合特性的关系. *植物学报*, 50 (1): 100–106]
- Villani TS, Koroch AR, Simon JE (2013). An improved clearing and mounting solution to replace chloral hydrate in microscopic applications. *Appl Plant Sci*, 1 (5): 429–438
- Xie ZS, Bondada B, Li B, et al (2016). Visualization of axial water transport pathways in grapevines using dye-tracing technique. *Plant Physiol J*, 52 (8): 1159–1168 (in Chinese with English abstract) [谢兆森, Bhaskar Bondada, 李勃等(2016). 采用染料示踪法可视化研究葡萄新梢水分运输途径. *植物生理学报*, 52 (8): 1159–1168]
- Yang B, Treweek, JB, Kulkarni RP, et al (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, 158 (4): 945–958
- Yang HY (1986). Observations of embryo sacs, embryos, endosperms and embryoids by whole staining with transparent technique. *J Integrative Plant Biol*, 28 (6): 575–581 (in English with Chinese abstract) [杨弘远(1986). 用整体染色与透明技术观察胚囊、胚、胚乳和胚状体. *植物生态学报*, 28 (6): 575–581]
- Yang HY(1988). Application of whole clearing technique in plant embryology. *Chin Bull Bot*, 5 (2): 114–116 (in Chinese with English abstract) [杨弘远(1988). 植物胚胎学中的整体透明技术. *植物学通报*, 5 (2): 114–116]
- Yang LS, Li GP (2004). Procedures for observation of embryo sac structure of angiosperms. *Res Exp Lab*, 23 (2): 9–11 (in Chinese with English abstract) [杨鹭生, 李国平(2004). 被子植物胚囊结构的观察方法. *实验室研究与*

- 探索, 23 (2): 9–11]
- Young BA, Sherwood RT, Bashaw EC (1979). Cleared pistil and thick-sectioning techniques for detecting *aposporous apomixis* in grasses. *Can J Bot*, 57: 1668–1672
- Zhang Y, Yang SJ, Sun M, et al (2014). Stomatal traits are evolutionarily associated with vein density in basal angiosperms. *Plant Sci J*, 32 (4): 320–328 (in English with Chinese abstract) [张亚, 杨石建, 孙梅等(2014). 基部被子植物气孔性状与叶脉密度的关联进化. *植物科学学报*, 32 (4): 320–328]
- Zhao LS, Liu LX, Gu JY, et al (2014). A method to improve sample preparation for observing stomata guard cells in *Triticum aestivum*. *Chin Bull Bot*, 49 (1): 120–126 (in Chinese with English abstract) [赵林妹, 刘录祥, 古佳玉等(2014). 一种小麦叶片气孔保卫细胞观察样品的制备方法. *植物学报*, 49 (1): 120–126]

Morphological and structural changes of stomata and leaf veins during growth of grape leaves using tissue clearing technique

XIE Zhao-Sen^{1,*}, DU Hong-Ru¹, LI Jian-Bao¹, Bhaskar BONDADA²

¹College of Horticulture Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066600, China

²Washington State University, Viticulture and Wine Science Center, Richland, WA 99354, USA

Abstract: In this study, ‘Moldova’ grapevine (*Vitis vinifera*) leaves were cleared to examine leaf epidermal cells, stomata, and minor vein system. These features were compared with other techniques such as leaf imprints using nail polish and tearing/peeling of leaf epidermis. Among these techniques, the tissue clearing technique emerged as the best way of studying leaf morphological features as it is easy and provides clear images of the highest resolution. For instance, it revealed numerous large stomates scattered throughout the abaxial surfaces of dentate margins of young leaves as opposed to few large stomates centrally localized along with guard mother cells in the lamina. As the leaves developed, the guard mother cells transformed into mature stomata and the minor vein system increased its vein density. These collectively increased stomatal conductance but the water content and water potential declined explaining the paradigm that plants use most water to transpire and only a small quantity to sustain growth.

Key words: grape (*Vitis vinifera*); tissue clearing; leaf; stomata; vein

Received 2017-09-06 Accepted 2018-01-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31470104) and the Natural Science Foundation of Hebei (C2018407036).

*Corresponding author (xiezhaozen@sina.com).