



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa**

Características morfo-anatómicas de cultivares tintas de videira (*Vitis vinifera* L.)

Natacha Raquel da Silva Beato de Nunes

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica – Protecção das Plantas

Orientadora: Professora Auxiliar Ana Maria da Silva Monteiro

Co-orientadora: Professora Auxiliar Generosa Maria Manso Teixeira Xavier

Júri

Presidente: Doutor José Carlos Augusta da Costa, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: - Doutor Carlos Manuel Antunes Lopes, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

- Doutora Generosa Maria Manso Teixeira Xavier, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

- Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa, 2009

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao fim desta etapa, gostaria de começar por agradecer a todos quantos me acompanharam: professores, colegas, amigos e tantas outras pessoas que se cruzaram comigo, e que de forma mais ou menos directa, me proporcionaram experiências enriquecedoras e me apoiaram.

À Professora Doutora Ana Monteiro, que ao aceitar a orientação deste trabalho, me acompanhou com enorme cuidado, pelos conselhos de grande valor, pelo incentivo decisivo, amizade com que me tratou e especialmente pela revisão da tese escrita, prontamente efectuada.

À Professora Doutora Generosa Teixeira, por ter se prestado a ser minha co-orientadora, ao acompanhamento constante, o apoio, os ensinamentos, os conselhos, as críticas construtivas, corrigindo a tese prontamente e de forma encorajadora, fazendo-me acreditar que conseguiria chegar a bom termo.

Agradeço ao Professor Doutor Carlos Lopes, por todos os ensinamentos, disponibilidade, o apoio na recolha e tratamento de dados e revisão do manuscrito.

Agradeço ao Telmo Nunes, técnico da Unidade de Microscopia do CBA, pela simpatia e sempre presente boa disposição e pelo apoio prestado na metalização e nas observações em microscopia electrónica de varrimento.

Ao Doutor Tiago Santos pelo apoio prestado na realização da parte experimental na vinha.

À Paula Paes pelo apoio que sempre me dispensou e, em particular, na parte da secagem e conservação do material vegetal.

À minha mais que amiga, quase irmã, Sílvia Costa, pela presença constante em momentos que foram tão cruciais, amizade que se iniciou na faculdade e perdurará por toda a nossa vida.

À minha família, por tudo, principalmente por nunca terem deixado de acreditar.

Finalmente, desejo agradecer a todos os que, embora não expressamente mencionados, de algum modo contribuíram para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

Os objectivos deste trabalho consistiram em estudar características foliares anatômico-biométricas de cultivares tintas de videira, 'Aragonez', 'Cabernet Sauvignon', 'Syrah' e 'Touriga Nacional', ao longo do ciclo vegetativo, em condições de campo. Os estudos foram efectuados por recurso à microscopia óptica e electrónica de varrimento. Os caracteres epidérmicos, tais como a forma e as dimensões das células epidérmicas na superfície foliar, o índice estomático, a distribuição de tricomas e a espessura da cutícula, são similares. Os estomas são de dois tipos, o tipo actinocítico, já referenciado para o género *Vitis*, e o tipo staurocítico. A dimensão dos estomas é muito heterogénea, coexistindo em simultâneo estomas grandes e pequenos. As cvs. 'Cabernet Sauvignon' e 'Touriga Nacional' apresentam um mesófilo mais compacto, tendo o parênquima lacunoso menos espaços intercelulares do que os taxa 'Aragonez' e 'Syrah'. Verificou-se ainda que, em secção transversal, o lúmen das células da 'Touriga Nacional' e 'Cabernet Sauvignon' é maior do que nas outras cultivares. A folha principal da cv. 'Aragonez' destaca-se pela sua maior área foliar e a da cv. 'Cabernet Sauvignon' pela menor área. Em síntese, nas folhas das quatro castas observaram-se características morfoanatômicas gerais semelhantes mas com uma organização diferente do mesófilo e com espessuras diferentes das células epidérmicas.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*, anatomia foliar, morfologia foliar, cutícula, estomas.

ABSTRACT

The objectives of this work consisted in studying the anatomical leaf-biometric characteristics of red grapevine cultivars, 'Aragonez', 'Cabernet Sauvignon', 'Syrah' and 'Touriga Nacional', throughout the season, on field conditions. The studies were conducted using light and scanning electron microscopy. Epidermal features, such as the thickness of the cuticle, the stomatal index, the shape and dimensions of epidermal cells in the leaf surface and distribution of trichomes are similar. The stomata are of two types, the actinocytic type, already referred to the genus *Vitis*, and the staurocytic type. The stomata size is very diverse: large and small stomata coexist side by side. The cvs. 'Cabernet Sauvignon' and 'Touriga Nacional' present spongy parenchyma with less air intercellular spaces, in opposition to the cvs. 'Aragonez' and 'Syrah'. It was also found that, in cross sections, the lumen of the cells of 'Touriga Nacional' and 'Cabernet Sauvignon' is higher than in the other cultivars. The main leaf of cv. 'Aragonez' stands out for its higher leaf area and the cv. 'Cabernet Sauvignon' by the lowest. In summary, in the four cultivars leaves were observed similar anatomical features but with a different organization of the mesophyll and with different thicknesses of epidermal cells, that might be responsible for the differences found in the resistance to stress environmental conditions.

Key Words: *Vitis vinifera*, leaf anatomy, leaf morphology, cuticle, stomata.

EXTENDED ABSTRACT

The objectives of this work consisted in studying the anatomical leaf-biometric characteristics of red grapevine cultivars, 'Aragonez', 'Cabernet Sauvignon', 'Syrah' and 'Touriga Nacional', throughout the season, on field conditions. The leaves of these cultivars were collected monthly, from flowering to harvest, between May and September 2007, and were always selected the ones from the seventh node. For this study, we used small pieces of plant material that were sectioned midway between base and apex of leaves, which depending on the intended observations were fresh, dried or fixed. The studies were conducted using the light microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM).

Through our comparative study, we verified that the cells form of the epidermal tissue was similar. As to its dimensions, the cv. 'Aragonez' is the one that presents longer and wider adaxial epidermal cells, therefore has greater exposure area, although the length-width ratio of the adaxial epidermal cells is very similar in all *taxa*. The stomata are of two types, the actinocytic type, already referred to the genus *Vitis*, and the the staurocytic type. Both types of stomata have a random distribution and irregular orientation, in all *taxa*, the stomata belonging to the actinocytic type are usually shorter than those belonging to the staurocytic type. The stomata size is very diverse: large and small stomata coexist side by side.

The leaves of the studied cultivars are pubescent on the lower surface, they have uni- and pluricellular uniseriate non-glandular hairs as well as very long hairs, probably unicellular, usually with a helicoidally rolling, producing a fluffy effect. Some of these long hairs do not retain their protoplast. All types of hair present an irregular distribution and no orientation; their density is variable in the different leaves, even within each cultivar. The mesophyll is dorsiventral in all the studied cultivars. Palisade parenchyma has 1-2 layers in all the cultivars, and may reach 3 layers in 'Cabernet Sauvignon'. The cvs. 'Cabernet Sauvignon' and 'Touriga Nacional' present spongy parenchyma with less intercellular air spaces, in opposition to the cvs. 'Aragonez' and 'Syrah'. It was also found that, in cross sections, the lumen of the epidermal cells in 'Touriga Nacional' and 'Cabernet Sauvignon' is higher than in the other cultivars. The main leaf of cv. 'Aragonez' stands out for its higher leaf area and the cv. 'Cabernet Sauvignon' by the lowest. Regarding the leaf thickness at the end of August the leaves of cvs. 'Cabernet Sauvignon' and 'Touriga Nacional' are the finest, probably because the parenchyma has less intercellular air spaces.

In summary, the four cultivars of grapevine share the same habitat and show some common and similar epidermal characters, such as the cuticle thickness, the stomata index and the trichomes distribution, and point to some adaptive anatomic characters such as the

mesophyll structure which might be responsible for the differences found in the resistance to stress environmental conditions.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE QUADROS	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1. Caracterização da parcela experimental	5
2.2. Material Vegetal	6
2.3. Registos efectuados	6
2.3.1. Estados fenológicos	6
2.4. Microscopia	6
2.4.1. Microscopia óptica.....	6
2.4.2. Microscopia electrónica de varrimento.....	7
2.5. Área foliar e peso específico da folha	8
2.6. Dimensões do Coberto.....	8
2.7. Produção vegetativa e reprodutiva.....	9
2.8. Análise dos dados	9
3. RESULTADOS	10
3.1. Superfície foliar	10
3.2. Estomas	20
3.3. Indumento	22
3.4. Mesófilo.....	27
3.5. Dimensões do coberto.....	30
3.6. Produtividade	32
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	i

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto da vinha e localização das castas onde foi realizado o estudo.....	5
Figura 2.A. Epiderme superior da casta ‘Aragonez’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	11
Figura 2.B. Epiderme inferior da casta ‘Aragonez’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	12
Figura 3.A. Epiderme superior da casta ‘Cabernet Sauvignon’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	13
Figura 3.B. Epiderme inferior da casta ‘Cabernet Sauvignon’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	14
Figura 4.A. Epiderme superior da casta ‘Syrah’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	15
Figura 4.B. Epiderme inferior da casta ‘Syrah’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	16
Figura 5.A. Epiderme superior da casta ‘Touriga Nacional’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	17
Figura 5.B. Epiderme inferior e corte transversal da folha da casta ‘Touriga Nacional’, nos meses em estudo, observação em MEV.....	18
Figura 2.C. Epiderme inferior da casta ‘Aragonez’, nos meses em estudo, distribuição de tricomas, observação em MEV.....	23
Figura 3.C. Epiderme inferior da casta ‘Cabernet Sauvignon’, nos meses em estudo, distribuição e inserção de tricomas, observação em MEV.....	24
Figura 4.C. Epiderme inferior da superfície foliar da casta ‘Syrah’, nos meses em estudo, distribuição e inserção de tricomas, observação em MEV.....	25
Figura 5.C. - Epiderme inferior da casta ‘Touriga Nacional’, nos meses em estudo, distribuição de tricomas, observação em MEV.....	26
Figura 6. Secções transversais das folhas das quatro castas, nos meses em estudo, observação em MO.....	29

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Comprimento e largura (μm) das células da epiderme superior à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	19
Quadro 2. Comprimento e largura (μm) das células da epiderme inferior à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	19
Quadro 3. Espessura da epiderme superior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	20
Quadro 4. Espessura da epiderme inferior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	20
Quadro 5. Comprimento e largura (μm) dos estomas à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	21
Quadro 6. Espessura da cutícula na epiderme superior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).....	27
Quadro 7. Espessura total da folha e dos parênquimas clorofilinos (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto)	28
Quadro 8. Dimensões do coberto determinadas à meia maturação. Valores médios de 20 videiras por cultivar. Quinta da Amieira, Torres Vedras, 2007.....	31
Quadro 9. Rendimento e crescimento vegetativo nas quatro cultivares de videira, ano de 2007, Quinta da Amieira, Torres Vedras. Valores médios de 20 videiras por cultivar..	32

1. INTRODUÇÃO

A capacidade adaptativa de expressões alternativas morfológicas continua a ser uma das principais questões da moderna botânica. A diversidade da estrutura é tão elevada como a biodiversidade de *taxa*, e as folhas são disso um bom exemplo: a sua diversidade morfológica, as diferenças encontradas na estrutura da cutícula ou na pubescência e na presença de estomas, em uma ou ambas as faces. As estruturas das plantas são influenciadas pelos processos fisiológicos e bioquímicos, sendo reconhecido que a relação entre estrutura e a sua função é muito íntima. É geralmente aceite que o material vegetal e as condições de cultura afectem a produtividade, o rendimento e a qualidade do produto final, que tem um alto significado na videira.

Stress hídrico e térmico influenciam respostas fisiológicas, como por exemplo, fecho dos estomas, diminuição do potencial hídrico folhear, redução da transpiração e da fotossíntese, alterações na repartição de assimilados, e alterações no equilíbrio hormonal (Maroco *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003), mas também provocam mudanças morfo-anatómicas (Nautiyal *et al.*, 1994; Pallioti *et al.*, 2001). Parâmetros ambientais tais como a intensidade luminosa, concentração de dióxido de carbono e disponibilidade hídrica também podem afectar o desenvolvimento estomático, alterando a sua dimensão e frequência (Knapp *et al.*, 1994; Nautiyal *et al.*, 1994; Pallioti *et al.*, 2001). No mundo vegetal a diversidade estrutural é tão importante como a diversidade de *taxa*, e as folhas são um óptimo exemplo disso, devido à sua variedade morfológica, às diferenças na estrutura da cutícula ou em relação à presença de estomas e indumento, numa ou em ambas as páginas da folha.

A constituição estrutural de uma planta é influenciada por processos bioquímicos e fisiológicos, e sabemos que a relação entre a estrutura e a sua função é muito estreita. Detalhes histológicos e anatómicos, quando cuidadosamente seleccionados, são aceites como bons caracteres taxonómicos. No entanto, neste trabalho, não é esta a perspectiva que nos interessa. Procuramos antes a perspectiva ecológica que estes caracteres podem significar, apesar de não ser fácil fazer distinção entre eles. Como o valor taxonómico de um carácter é inversamente proporcional à sua plasticidade, e os microcaracteres são menos plásticos do que os macrocaracteres, (Metcalf & Chalk, 1950), os primeiros ganharam uma maior importância.

As características da epiderme foliar pertencem a uma categoria de microcaracteres, e apesar de não serem utilizados como base para classificação, são uma ajuda importante na identificação de uma espécie. Por serem muitos e variados e por se manterem de certo modo constantes, adquirem com frequência, particular importância, nos estudos e análises morfoanatômicas (Martin & Juniper, 1970).

Neste trabalho, realizado em castas tintas do género *Vitis*, actualmente colocado na família *Vitaceae* (Judd *et al.*, 2008), anteriormente *Ampelidaceae* segundo Metcalfe & Chalk (1950), salientamos os caracteres epidérmicos, uma vez que através deles podemos tentar estabelecer eventuais diferenças entre as quatro castas em estudo e, deste modo, compreender o seu comportamento face às mesmas condições ambientais. As folhas são os órgãos da videira preferenciais para diferenciar variedades pois possuem grande variabilidade de macrocaracteres, como por exemplo, os lóbulos, os dentes da margem, a forma do lobo peciolar, o tipo de indumento da página inferior a organização das nervuras e a própria pigmentação. São as folhas da posição 7^a à 11^a, a contar da base do sarmento, que apresentam os caracteres mais representativos do *taxon*. As folhas mais adequadas para caracterizar uma casta são as que se formam mais acima da base do sarmento. Isto porque as da base foram diferenciadas no gomo latente no ciclo vegetativo anterior e por isso apresentam características morfológicas ligeiramente diferentes.

Alguns autores defendem que quanto à dimensão dos órgãos, nomeadamente de folhas, é preferível considerar a razão comprimento/largura, uma vez que esta será mais fiável, fornecendo também informação quanto à forma dos órgãos ou outras estruturas consideradas (Metcalfe & Chalk, 1950). Características foliares, como a densidade estomática, a espessura da cutícula e a espessura do mesófilo, ajudam a compreender o perfil funcional das plantas. Maiores densidades estomáticas estão associadas a plantas que apresentam maior taxa de transpiração e cutículas mais espessas, que imprimem uma maior impermeabilidade às folhas, sendo mais frequentes em ambientes secos.

Relativamente às folhas, caracteres como a forma das células epidérmicas, o tipo, forma e posição dos estomas não sendo plásticos, podem por isso ser considerados bons caracteres taxonómicos e podem ainda indicar determinado tipo de resposta e de defesa face a um habitat (Metcalf & Chalk, 1950; Stace, 1989). Este último autor considera, ainda, que quando a dimensão dos estomas é constante dentro de um *taxon*, ele pode ser considerado como um carácter fiável. O mesmo não se aplica acerca da densidade estomática (número de estomas/área), pois esta pode variar da base para o ápice, podendo variar também com as condições ambientais e com o local de inserção da folha no caule (Metcalf & Chalk, 1950). Segundo Rowson (*in* Metcalf & Chalk, 1979), verifica-se que é preferível o índice estomático, pois este é independente do habitat, da idade da planta e da região da folha estudada; este índice é mais uniforme na página inferior (Cutter, 1986).

Segundo Metcalf & Chalk (1950), por vezes, as características da cutícula e das células da epiderme podem oferecer uma grande variabilidade dentro de um mesmo *taxon*. Na superfície da cutícula é muito comum o depósito de ceras epicuticulares ou cuticulares, cuja estrutura pode apresentar uma grande variação de planta para planta (Martin & Juniper, 1970; Esau, 1972; Fahn, 1998). A morfologia e constituição bioquímica destas ceras mostram-se cada vez mais importantes em estudos taxonómicos como caracteres diagnosticantes adicionais e constituem também uma resposta selectiva face a condições ambientais (Metcalf & Chalk, 1979).

Quanto ao indumento, características como o comprimento dos tricomas, o índice de tricomas e a sua distribuição, são, também, afectados por factores edafo-climáticos, enquanto em estudos taxonómicos é mais relevante o tipo e a forma dos tricomas presentes nas diferentes espécies (Metcalf & Chalk, 1950). A dimensão e a forma dos grãos de amido, assim como a presença de cristais de oxalato de cálcio são também importantes características taxonómicas (Metcalf & Chalk, 1950; Stace, 1989) e, no caso dos cristais, ainda sem um significado fisiológico completamente conhecido (Nakata, 2003). Os microcaracteres considerados para este trabalho foram: a forma e dimensões das células epidérmicas, a espessura da cutícula, o tipo de estomas, o índice estomático, as características do indumento e do mesófilo, bem como a presença de cristais de oxalato de cálcio.

O melhoramento genético das culturas para tolerar o stress, é um esforço relativamente novo e tem sido considerado durante as últimas duas a três décadas (Wahid *et al.*, 2007). Tradicionalmente, a maioria dos programas de reprodução e propagação vegetal têm-se centrado na obtenção de plantas com elevado potencial de rendimento em ambientes favoráveis (ou seja, sem stress). Contudo, o melhoramento genético de plantas para tolerar

stress pode ser uma solução economicamente viável para a produção de culturas em ambientes que criam condições de stress (Wahid *et al.*, 2007). No que concerne à videira, o conhecimento a longo prazo, sobre respostas das cultivares aos factores ambientais através de mecanismos de tolerância, pode contribuir para melhor compreender as adaptações da espécie a condições extremas, e poderá ser relevante para a gestão da cultura e para o melhoramento.

O objectivo deste estudo consistiu em estudar a diferente resposta ao stress hídrico e térmico das cultivares tintas de videira, 'Aragonez', 'Cabernet Sauvignon', 'Touriga Nacional' e 'Syrah', ao longo do ciclo vegetativo, em condições de campo, tendo sido avaliadas as características foliares anatómico-biométricas e a produtividade. Isto porque foi perceptível a olho nu, que em condições de stress térmico, existem castas que o suportam melhor, e gostaríamos de saber como o conseguem. A razão de ser do estudo prende-se com o facto de ser perceptível que as castas em estudo se comportam de modo diferente quando em situação de stress.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da parcela experimental

Este estudo teve lugar numa vinha experimental “Quinta de Amieira”, localizada na Cabeça Gorda, freguesia de Campelos, concelho de Torres Vedras e integrada na Região Vitivinícola da Estremadura. O solo da vinha é franco-arenoso com pH 5,5 a vinha é jovem (4 anos), com enrelvamento natural na entrelinha e aplicação de herbicida folhear na linha desde a plantação, com todas as castas enxertadas sobre o porta-enxerto SO4. As cepas são conduzidas em monopiano vertical ascendente, com a vegetação amparada por 2 pares de arames móveis, podadas em cordão Royat bilateral e orientadas Norte/Sul. O compasso é de 2,5m x 1,0 m, o que perfaz 4000 videiras por ha. As práticas culturais aplicadas, foram as mesmas para todas as castas.

O delineamento experimental consistiu em seleccionar quatro castas tintas – ‘Aragonez’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Syrah’ e ‘Touriga Nacional’, plantadas num sistema em linhas paralelas (Figura 1). A amostragem incidiu em 40 videiras de cada cultivar, distribuídas por duas linhas. Dentro de cada casta, cada linha foi separada em dois blocos, formando assim quatro blocos por casta.



Figura 1. Aspecto da vinha e localização das castas onde foi realizado o estudo.

2.2. Material Vegetal

O estudo morfo-anatómico foliar incidiu sobre as quatro castas de *Vitis vinifera* L. anteriormente referidas. As folhas destas castas foram colhidas mensalmente, desde a floração à vindima, entre Maio e Setembro de 2007, tendo sido sempre escolhidas as do sétimo nó (Rodrigues, 1952). O estudo incidiu sobre as folhas colhidas nos meses de Maio (floração), Julho (meia maturação) e Agosto (pintor), e incidiu sobre pequenos pedaços retirados da zona média-central das folhas, sendo utilizado material fresco, material herborizado e material fixado (este material foi utilizado consoante a disponibilidade de tempo para realizar determinados procedimentos, por isso algum teve de ser herborizado).

2.3. Registos efectuados

Ao longo de todo o ciclo biológico da videira foram realizados vários registos de campo, adiante descritos.

2.3.1. Estados fenológicos

Baseando-se na observação geral das videiras do ensaio, foram registadas as datas médias dos principais estados fenológicos da videira (floração, meia maturação e pintor), segundo Carbonneau (1981). Para tal recorreu-se à escala de Baggiolini.

2.4. Microscopia

Para o estudo morfo-anatómico recorreu-se a microscopia óptica (MO) e a microscopia electrónica de varrimento (MEV).

2.4.1. Microscopia óptica

O material fresco foi sujeito a clarificação numa solução de hipoclorito de sódio a 1% e lavado em água destilada (Evans, 1996). Foi feito o destaque do tecido epidérmico na zona média das folhas, em ambas as páginas foliares e observou-se a forma, a dimensão e a orientação das células epidérmicas. Na epiderme da página inferior procedeu-se ainda à medição de estomas, à identificação do tipo de estomas e ao cálculo do índice estomático. Os cálculos obtidos resultaram de uma média de 10 observações.

Os estomas foram classificados de acordo com Stace (1989) e o índice estomático foi calculado de acordo com Salisbury (1927), aplicando a seguinte fórmula:

$$[\text{número de estomas} / (\text{número de estomas} + \text{número de células epidérmicas})] \times 100$$

Sempre que necessário, o estudo do tecido epidérmico foi também realizado em material herborizado. Este foi previamente hidratado e depois clarificado, segundo a metodologia anteriormente descrita.

Esse estudo foi igualmente feito com o recurso a material fixado. A fixação foi alcançada numa solução de glutaraldeído segundo o Protocolo I (Hayat, 1981), Anexo I.

Para observação da anatomia foliar realizaram-se cortes transversais na zona média das folhas. Os cortes foram feitos manualmente e num micrótomo de Minot. Para este tipo de corte foi necessário conferir uma resistência adequada ao material, para posteriormente sofrer cortes finos. O Protocolo II (Anexo II) refere toda a preparação do material para corte em micrótomo.

As observações em microscopia óptica foram realizadas através de um microscópio Nikon Eclipse E400 equipado com lentes Nikon Coolpix MDC. As imagens foram obtidas com uma câmara digital Nikon Coolpix 995.

2.4.2. Microscopia electrónica de varrimento

Para efectuar o estudo do material vegetal das quatro castas em MEV, foi seguido o procedimento indicado no Protocolo I.

Neste estudo observámos ambas as páginas foliares, atendendo à forma, e a orientação das células epidérmicas e às características da cutícula. Na epiderme da página inferior procedeu-se ainda à observação de estomas e de tricomas.

Estas observações foram realizadas num aparelho da marca Jeol, JSM-5220 LV a 15 Kv, utilizando um sistema de aquisição directa de imagem.

2.5. Área foliar e peso específico da folha

A área foliar foi estimada à meia maturação. Esta determinação teve por base a metodologia descrita por Lopes & Pinto (2005). Para este efeito foram seleccionados 20 sarmentos de vigor médio por casta, onde se mediram os seguintes parâmetros:

- comprimento total do lançamento;
- número de folhas principais e secundárias;
- comprimento das duas nervuras secundárias superiores das folhas maior e menor.

A estimativa da área foliar total por videira foi obtida através da multiplicação da área foliar por sarmento, calculada pelos modelos referidos Lopes & Pinto (2005), pelo número médio de sarmentos da respectiva casta.

O peso específico foi determinado através da razão entre a área unitária da folha e respectivo peso seco.

2.6. Dimensões do Coberto

A dimensão do coberto foi determinada apenas à meia maturação em 20 videiras por bloco perfazendo um total de 80 videiras por modalidade. Os parâmetros caracterizadores das dimensões do coberto foram a altura e a largura do coberto ao nível dos cachos. Foi utilizada uma régua graduada de madeira com 2,15 m de comprimento. A altura da sebe foi considerada em 1,5 m pois a despona foi efectuada à mesma altura em todas as castas as quais apresentavam todas um crescimento acima da zona de corte. A régua foi introduzida perpendicularmente ao plano vertical da sebe nas zonas anteriormente referidas.

Mediante o proposto por Smart & Robinson (1991), e recorrendo aos dados da dimensão da sebe, calculou-se a superfície foliar exposta (SFE). A sebe foi considerada como sendo uma superfície paralelepípedica iluminada em ambas faces laterais e também na face superior.

2.7. Produção vegetativa e reprodutiva

A poda de Inverno foi realizada no dia 9 de Dezembro de 2007, tendo-se recolhido dados de 20 videiras por cada casta. O registo do número de sarmentos foi realizado imediatamente antes de se podarem as videiras. Após a poda, efectuou-se o registo do peso de lenha de poda. A lenha do ano de cada videira foi atada em molhos e colocada junto da videira respectiva e procedeu-se à sua pesagem, numa balança dinamómetro. Com os dados obtidos calculou-se o peso médio por sarmento, o número médio de sarmentos por videira, o número médio de sarmentos por metro linear e o Índice de Ravaz, $IR = (\text{Produção de uva}/\text{Peso de lenha de poda})$.

O rendimento foi estimado com base no número médio de cachos por videira e peso médio do cacho por planta. Os dados foram recolhidos em 20 videiras por casta.

2.8. Análise dos dados

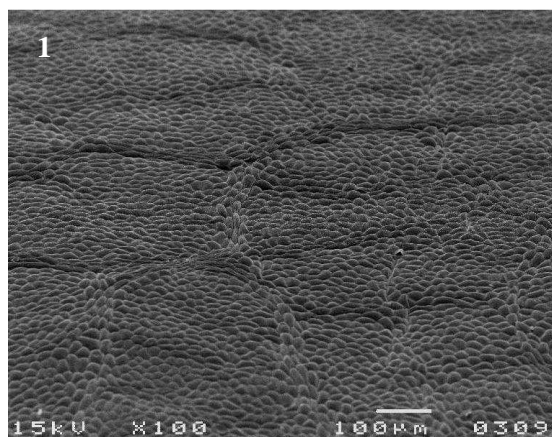
Todos os dados foram tratados estatisticamente através da análise de variância a um factor, ANOVA, com um nível de significância de 5%. Efectuou-se a análise dos dados de acordo com os procedimentos da GML, recorrendo ao programa estatístico SAS[®] (SAS Institute, Cary, NC, E.U.A.).

3. RESULTADOS

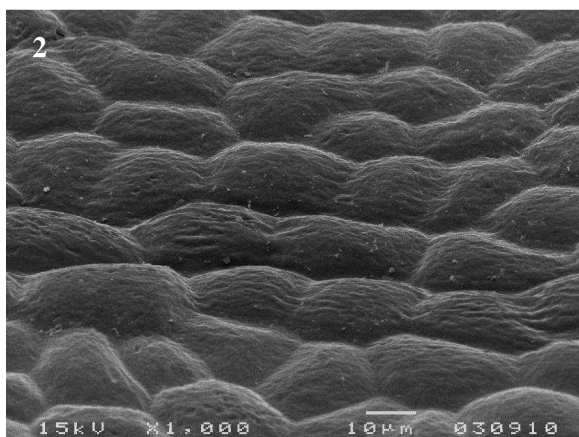
As características anatômico-biométricas das folhas das cultivares estudadas de *V. vinifera*, nomeadamente a espessura da sua cutícula, a razão comprimento-largura das células da epiderme, o índice estomático e a espessura do mesófilo são resumidos em tabelas diferentes. As características mais marcantes são salientadas abaixo.

3.1. Superfície foliar

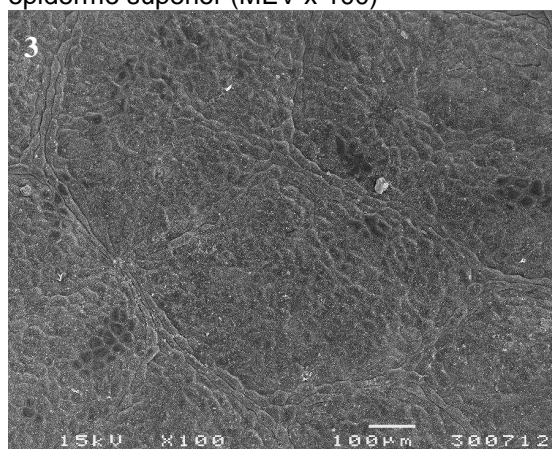
A epiderme superior ou adaxial é constituída por células poligonais com paredes celulares estriadas, desprovidas de qualquer tipo de depósito ou ornamentação (Figuras 2.A, 3.A, 4.A, 5.A). Nas duas epidermes, adaxial e abaxial, as células não apresentam uma orientação definida. As células epidérmicas abaxiais são menores do que as células adaxiais (Quadro 1 e 2), e têm paredes anticlinais mais sinuosas e com mais estrias (Figura 2.B, 3.B, 4.B, 5.B). A razão comprimento-largura nas células epidérmicas adaxiais acaba por ser muito próxima em todos os taxa (Quadro 1). Os valores encontrados para a epiderme abaxial são mais irregulares em quase todas as castas e os valores da razão comprimento-largura nestas células acabam por ser mais heterogéneos (Quadro 2). De referir que as células epidérmicas são morfologicamente distintas das restantes, quando rodeiam a base de inserção dos pêlos ou tricomas (Figuras 3.C.13 e 4.C.14).



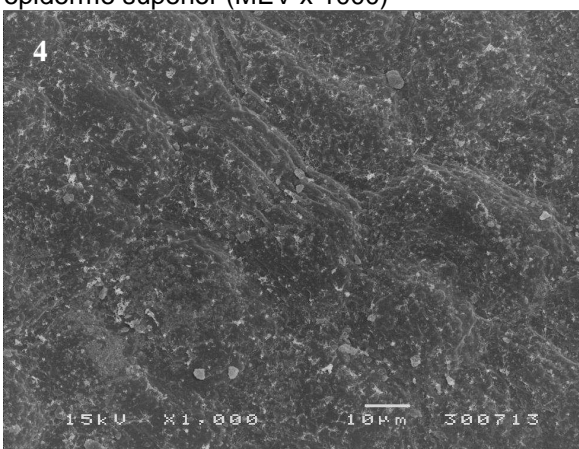
Folha de 'Aragonez' à floração (Maio), epiderme superior (MEV x 100)



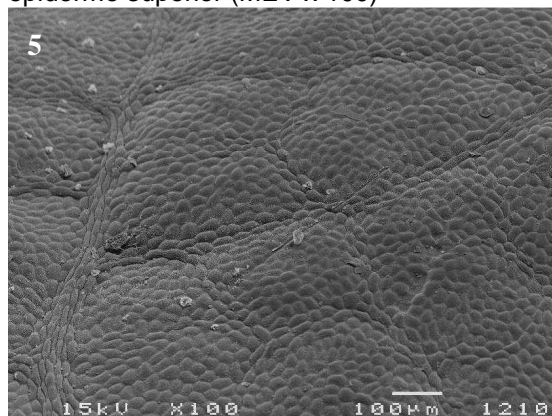
Folha de 'Aragonez' à floração (Maio), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)



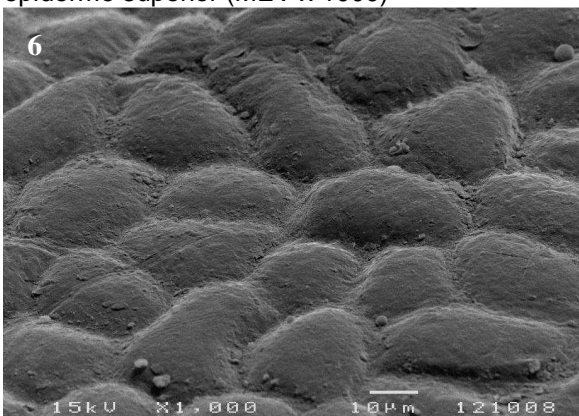
Folha de 'Aragonez' ao pintor (Julho), epiderme superior (MEV x 100)



Folha de 'Aragonez' ao pintor (Julho), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)



Folha de 'Aragonez' à meia maturação (Agosto) epiderme superior (MEV x 100)

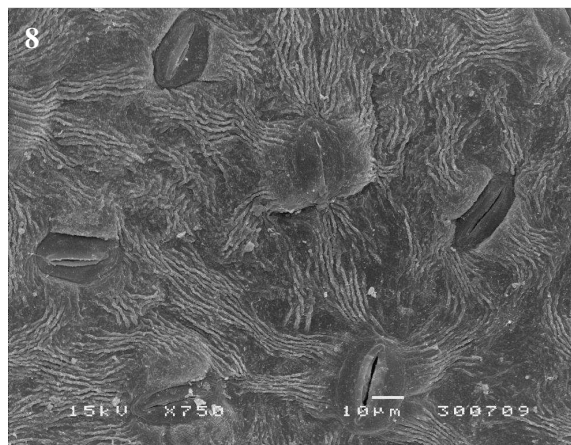


Folha de 'Aragonez' à meia maturação (Agosto), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)

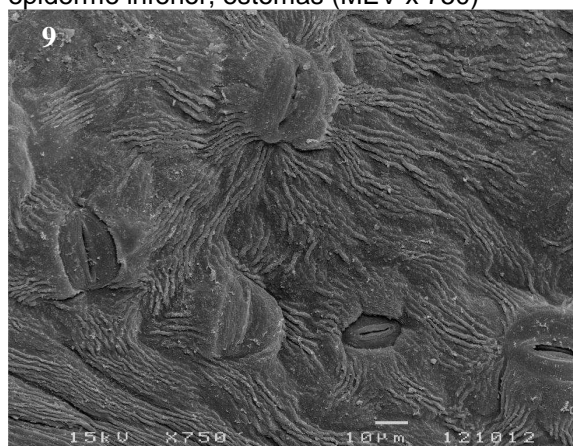
Figura 2.A. Epiderme superior da casta 'Aragonez', nos meses em estudo, observação em MEV.



Folha de 'Aragonez' à floração (Maio), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

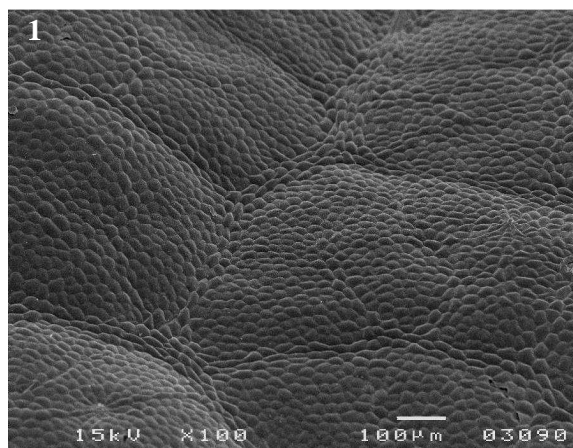


Folha de 'Aragonez' ao pintor (Julho), epiderme inferior estomas (MEV x 750)

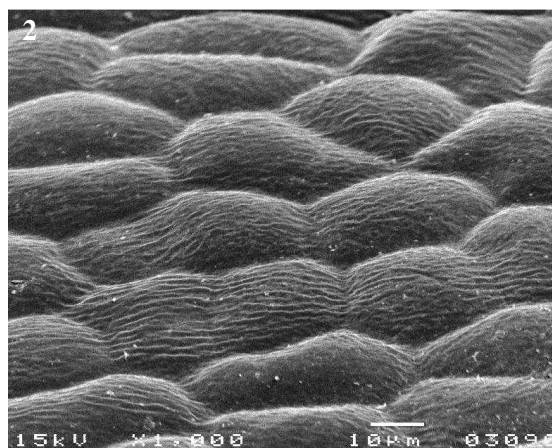


Folha de 'Aragonez' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

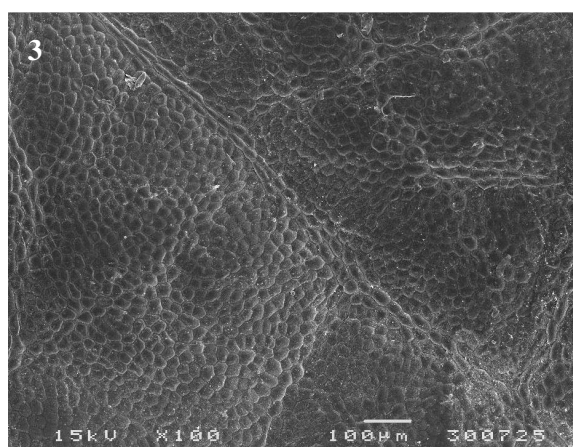
Figura 2.B. Epiderme inferior da casta 'Aragonez', nos meses em estudo, observação em MEV.



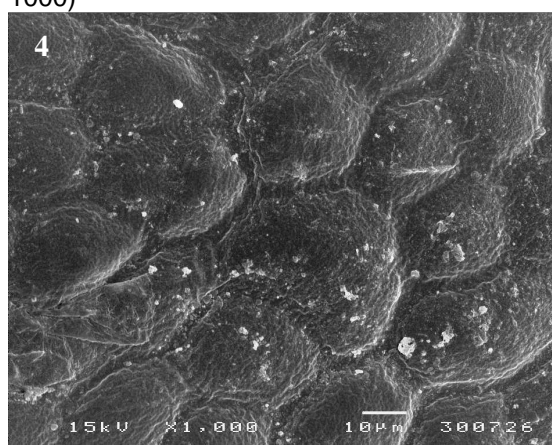
Folha de 'Cabernet Sauvignon' à floração (Maio), epiderme superior (MEV x 100)



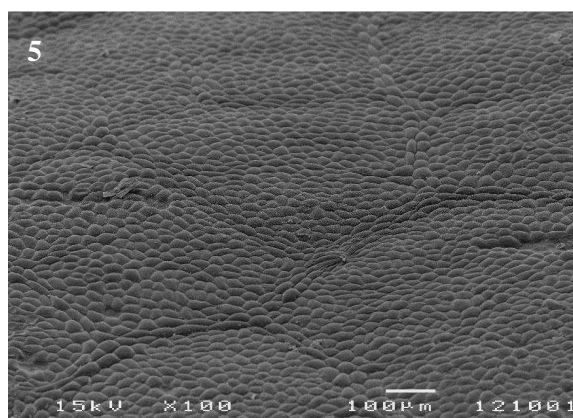
Folha de 'Cabernet Sauvignon' à floração (Maio), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)



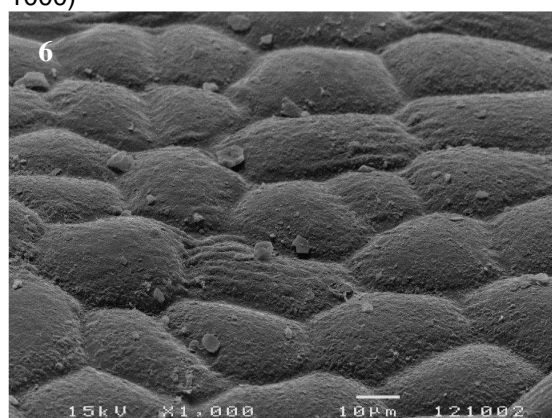
Folha de 'Cabernet Sauvignon' ao pintor (Julho), epiderme superior (MEV x 100)



Folha de 'Cabernet Sauvignon' ao pintor (Julho), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)

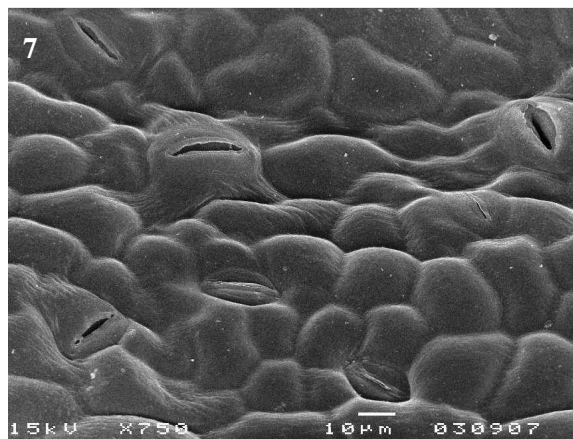


Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), epiderme superior (MEV x 100)

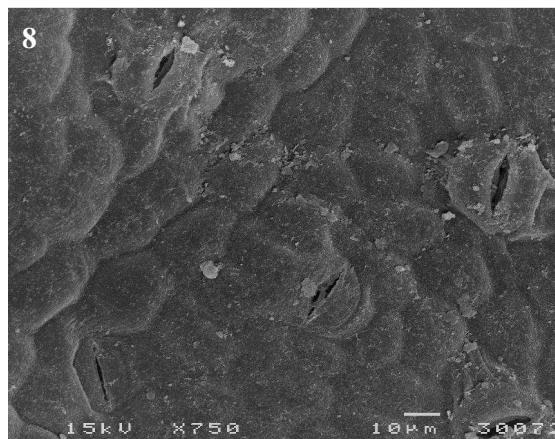


Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)

Figura 3.A. Epiderme superior da casta 'Cabernet Sauvignon', nos meses em estudo, observação em MEV.



Folha de 'Cabernet Sauvignon' à floração (Maio), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

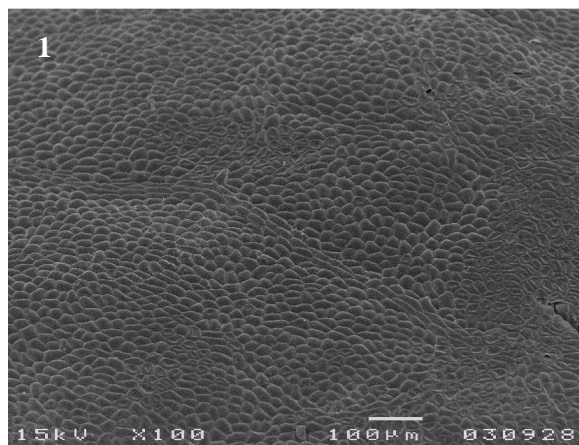


Folha de 'Cabernet Sauvignon' ao pintor (Julho), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

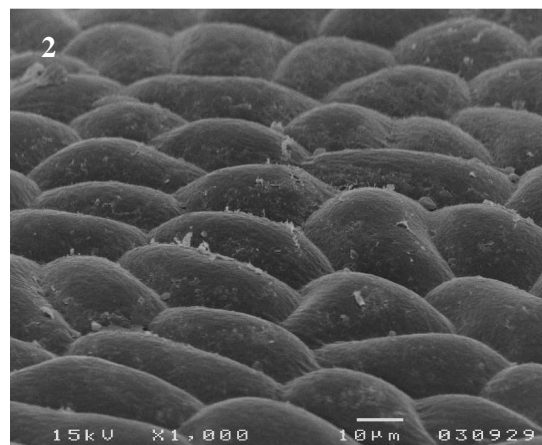


Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

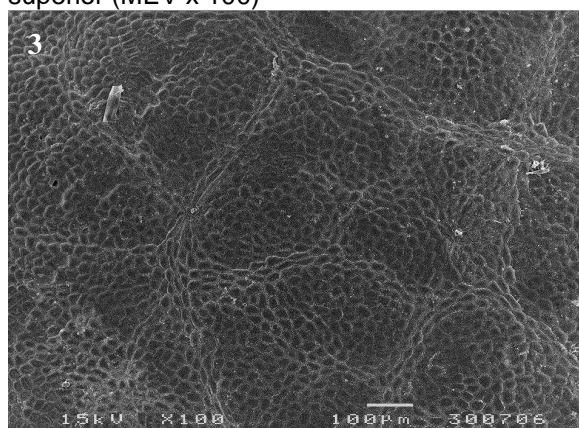
Figura 3.B. Epiderme inferior da casta 'Cabernet Sauvignon', nos meses em estudo, observação em MEV.



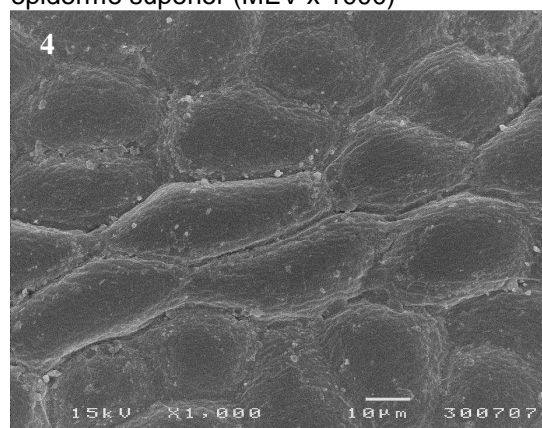
Folha de 'Syrah' à floração (Maio), epiderme superior (MEV x 100)



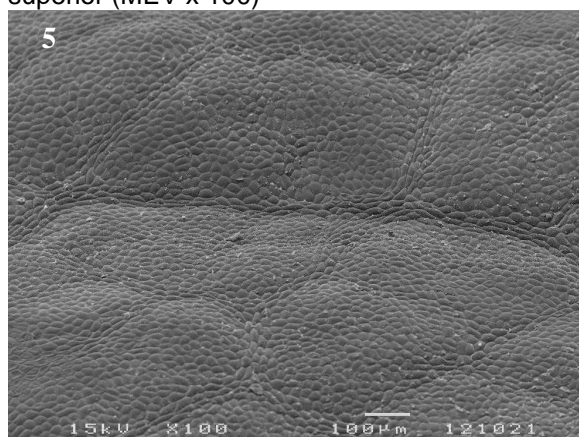
Folha de 'Syrah' à floração (Maio), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)



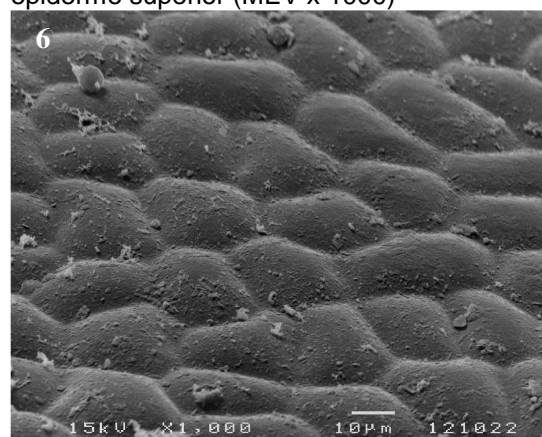
Folha de 'Syrah' ao pintor (Julho), epiderme superior (MEV x 100)



Folha de 'Syrah' ao pintor (Julho), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)

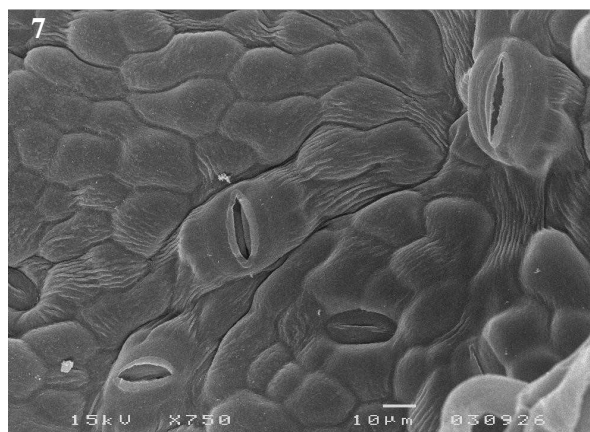


Folha de 'Syrah' à meia maturação (Agosto), epiderme superior (MEV x 100)

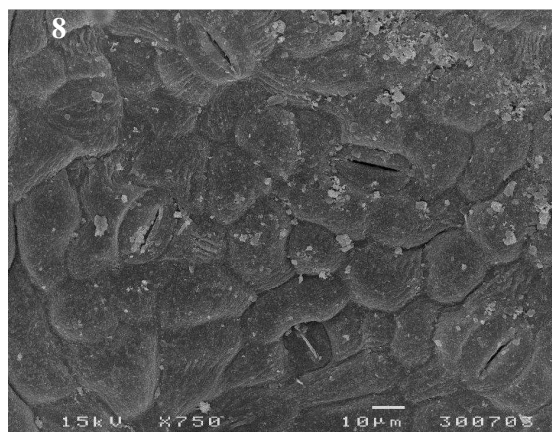


Folha de 'Syrah' à meia maturação (Agosto), pormenor epiderme superior (MEV x 1000)

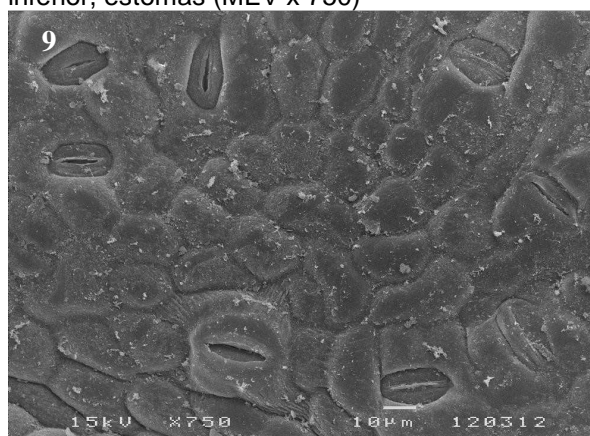
Figura 4.A. Epiderme superior da casta 'Syrah', nos meses em estudo, observação em MEV.



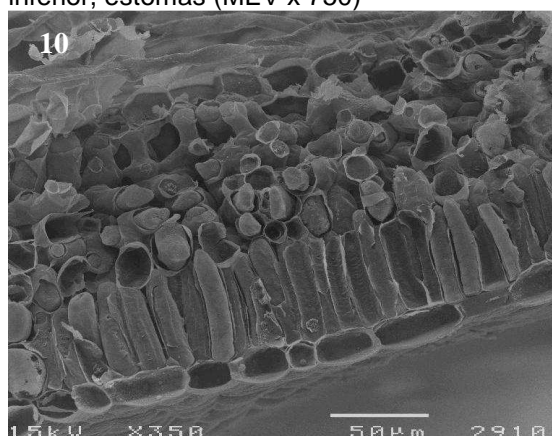
Folha de 'Syrah' à floração (Maio), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)



Folha de 'Syrah' ao pintor (Julho), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

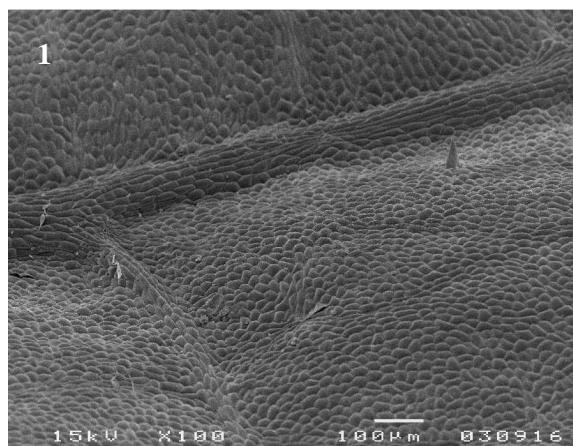


Folha de 'Syrah' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)

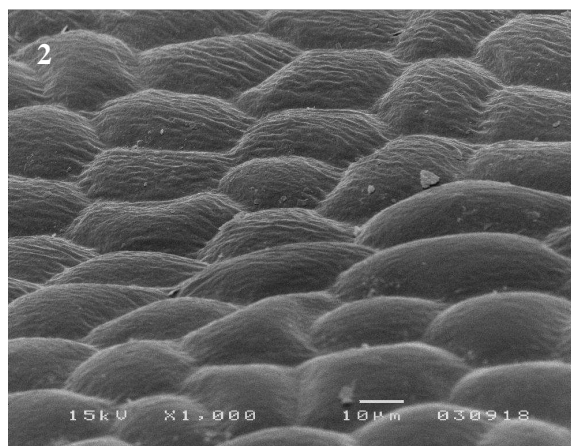


Folha de 'Syrah' à floração (Maio), corte transversal, células da epiderme superior com secção circular (MEV x 350)

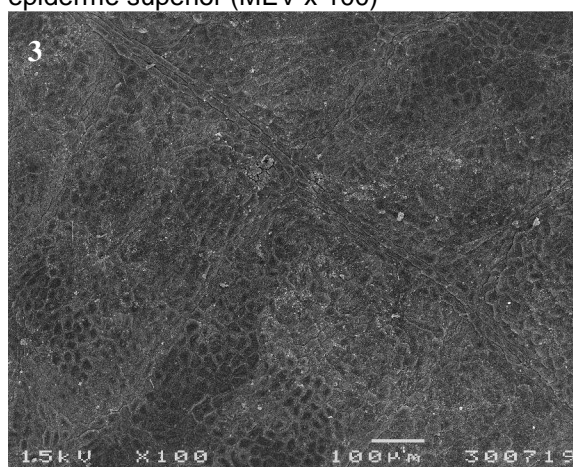
Figura 4.B. Epiderme inferior da casta 'Syrah', nos meses em estudo, observação em MEV.



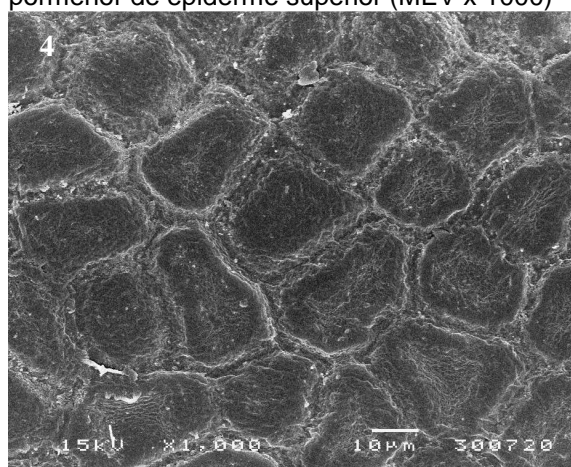
Folha de 'Touriga Nacional' à floração (Maio), epiderme superior (MEV x 100)



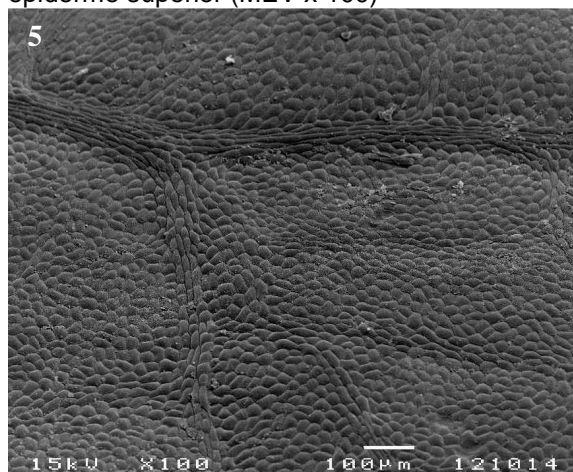
Folha de 'Touriga Nacional' à floração (Maio), pormenor de epiderme superior (MEV x 1000)



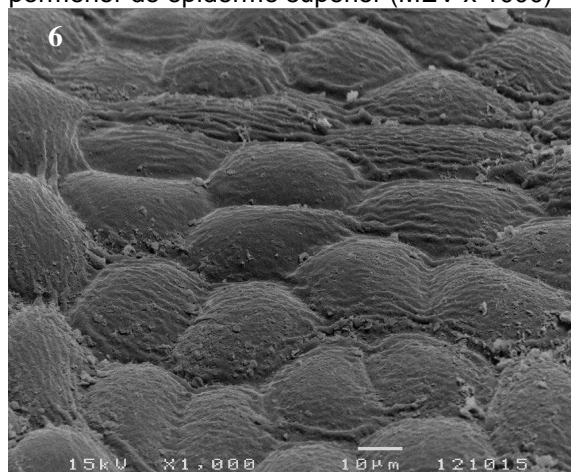
Folha de 'Touriga Nacional' ao pintor (Julho), epiderme superior (MEV x 100)



Folha de 'Touriga Nacional' ao pintor (Julho), pormenor de epiderme superior (MEV x 1000)

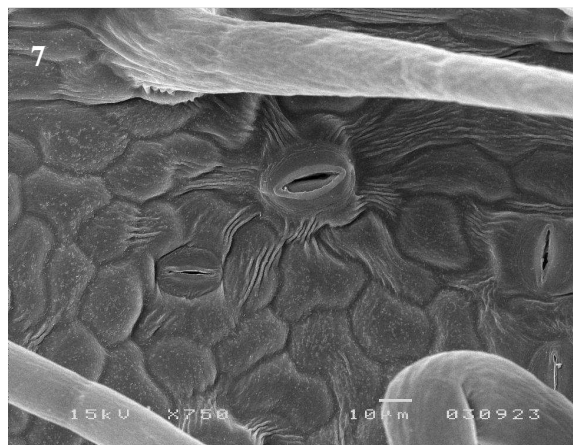


Folha de 'Touriga Nacional' à meia maturação (Agosto), epiderme superior (MEV x 100)

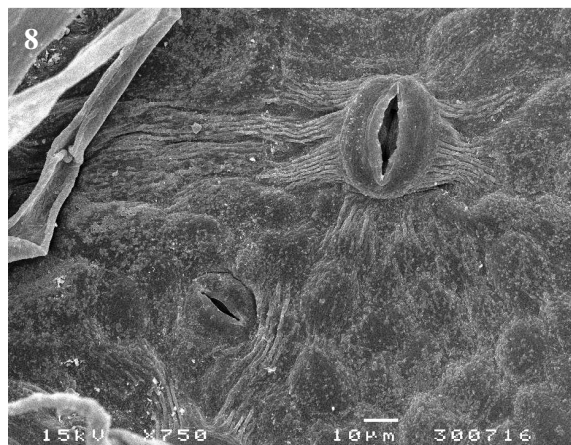


Folha de 'Touriga Nacional' à meia maturação (Agosto), pormenor de epiderme superior (MEV x 1000)

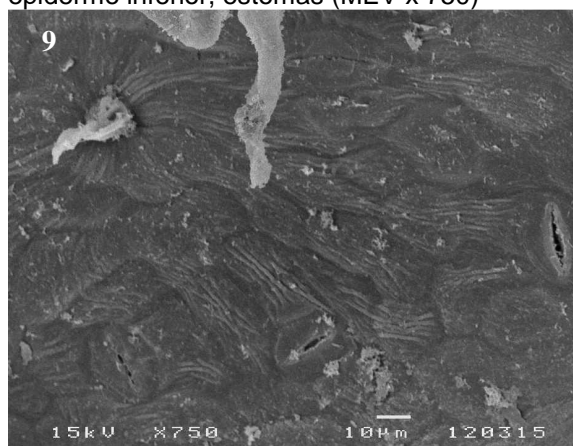
Figura 5.A. Epiderme superior da casta 'Touriga Nacional', nos meses em estudo, observação em MEV.



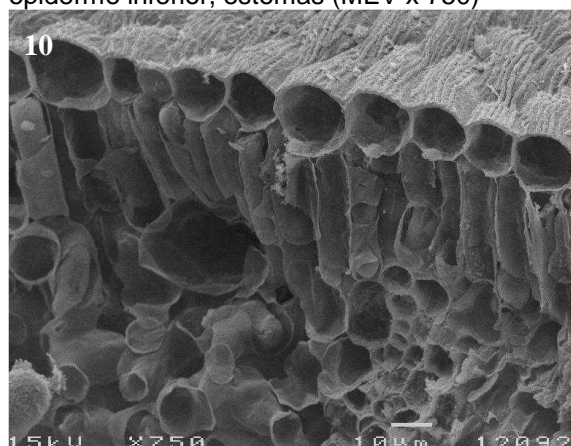
Folha de 'Touriga Nacional' à floração (Maio), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)



Folha de 'Touriga Nacional' ao pintor (Julho), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)



Folha de 'Touriga Nacional' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, estomas (MEV x 750)



Folha de 'Touriga Nacional' à floração (Maio), corte transversal, células da epiderme superior com secção circular (MEV x 750)

Figura 5.B. Epiderme inferior e corte transversal da folha da casta 'Touriga Nacional', nos meses em estudo, observação em MEV.

Quadro 1. Comprimento e largura (μm) das células da epiderme superior à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Comprimento células epiderme superior (μm)	Largura células epiderme superior (μm)	Razão Comprimento / Largura células epiderme
Floração			
'Aragonez'	37,12 (0,518)	27,30 (0,678)	1,38 (0,031)
'Cabernet Sauvignon'	34,19 (0,580)	24,77 (0,538)	1,41 (0,036)
'Syrah'	31,85 (0,563)	22,56 (0,596)	1,43 (0,035)
'Touriga Nacional'	31,92 (0,610)	23,92 (0,605)	1,35 (0,030)
Significância	***	***	ns
Pintor			
'Aragonez'	38,42 (0,742)	27,24 (0,589)	1,43 (0,033)
'Cabernet Sauvignon'	36,53 (0,585)	26,00 (0,483)	1,43 (0,031)
'Syrah'	33,87 (0,696)	24,90 (0,684)	1,38 (0,036)
'Touriga Nacional'	32,70 (0,595)	23,86 (0,517)	1,39 (0,032)
Significância	***	**	ns
Meia maturação			
'Aragonez'	39,39 (0,748)	25,68 (0,552)	1,55 (0,028)
'Cabernet Sauvignon'	35,49 (0,634)	25,29 (0,564)	1,43 (0,048)
'Syrah'	35,56 (0,635)	24,05 (0,652)	1,51 (0,031)
'Touriga Nacional'	34,97 (0,566)	23,73 (0,626)	1,51 (0,043)
Significância	***	ns	ns

ns, **, *** - não significante, significante para níveis de probabilidade de 0,01 e 0,001 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

Quadro 2. Comprimento e largura (μm) das células da epiderme inferior à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Comprimento células epiderme inferior (μm)	Largura células epiderme inferior (μm)	Razão Comprimento / Largura células epiderme
Floração			
'Aragonez'	30,42 (0,666)	20,15 (0,345)	1,52 (0,039)b
'Cabernet Sauvignon'	29,84 (0,848)	21,58 (0,646)	1,41 (0,043) bc
'Syrah'	32,11 (0,876)	19,63 (0,501)	1,68 (0,062)a
'Touriga Nacional'	25,29 (0,775)	18,85 (0,550)	1,37 (0,047)c
Significância	***	**	**
Pintor			
'Aragonez'	30,49 (0,756)	21,13 (0,598)	1,47 (0,039)b
'Cabernet Sauvignon'	28,05 (0,863)	19,96 (0,546)	1,43 (0,047)ab
'Syrah'	29,06 (0,738)	18,92 (0,581)	1,58 (0,052)a
'Touriga Nacional'	29,84 (0,806)	19,31 (0,455)	1,57 (0,052)a
Significância	ns	**	ns
Meia maturação			
'Aragonez'	27,82 (0,716)	18,85 (0,494) c	1,40 (0,048)
'Cabernet Sauvignon'	29,71 (0,631)	22,30 (0,556) a	1,29 (0,031)
'Syrah'	30,16 (0,761)	20,09 (0,475) bc	1,70 (0,045)
'Touriga Nacional'	28,47 (0,638)	20,48 (0,494) b	1,33 (0,039)
Significância	ns	***	ns

ns, **, *** - não significante, significante para níveis de probabilidade de 0,01 e 0,001 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

Considerando cortes transversais, relativamente à espessura das células epidérmicas, em Maio as adaxiais são mais espessas para as castas 'Cabernet Sauvignon' e 'Touriga Nacional' do que as células abaxiais, para o mesmo mês (Quadros 3 e 4). No geral acabam por ter espessuras semelhantes entre si com a evolução dos meses, destacando-se em Agosto para as células adaxiais um valor bastante elevado para a casta 'Aragonez'.

Quadro 3. Espessura da epiderme superior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Epiderme superior (μm)	Epiderme superior (μm)	Epiderme superior (μm)
	Floração	Pintor	Meia maturação
'Aragonez'	12,13 (0,433)	13,00 (0,613)	19,50 (0,709)
'Cabernet Sauvignon'	17,04 (0,764)	17,04 (1,378)	18,63 (0,684)
'Syrah'	13,87 (0,751)	13,87 (0,751)	16,47 (0,751)
'Touriga Nacional'	16,47 (0,751)	13,00 (0,613)	18,20 (0,723)
Significância	***	**	**

, * - significativa para níveis de probabilidade de 0,01 e 0,001 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

Quadro 4. Espessura da epiderme inferior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Epiderme inferior (μm)	Epiderme inferior (μm)	Epiderme inferior (μm)
	Floração	Pintor	Meia maturação
'Aragonez'	14,73 (0,867)	12,13 (0,433)	17,04 (0,613)
'Cabernet Sauvignon'	16,76 (1,156)	15,31 (1,182)	18,20 (0,492)
'Syrah'	14,44 (0,457)	13,00 (0,867)	16,18 (0,578)
'Touriga Nacional'	13,88 (0,867)	11,27 (0,433)	17,04 (0,802)
Significância	ns	**	*

ns, *, ** - não significativa, significativa para níveis de probabilidade de 0,1 e 0,01 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

3.2. Estomas

As cultivares de videira estudadas têm folhas hipostomáticas. Estomas superficiais, pertencentes ao tipo actinocítico e estomas acima da superfície foliar, do tipo staurocítico, coexistem em todas as cultivares na face abaxial. Ambos os tipos de estomas têm uma distribuição aleatória e orientação irregular, em todos os taxa, e os estomas pertencentes ao tipo actinocítico são geralmente menores do que aqueles que pertencem ao tipo staurocítico (Figuras 2.B, 3.B, 4.B e 5.B).

O comprimento e a largura dos estomas variam entre as quatro cultivares. Para o mês de Maio não se verificaram diferenças significativas tanto para o comprimento como para a

largura. No entanto, no mês de Julho, houve valores que se destacaram, como os encontrados em folhas de ‘Touriga Nacional’ com comprimento de 31,2 µm enquanto que em folhas de ‘Syrah’ o seu valor é de 27,9 µm (Quadro 5). Em relação à largura, destaca-se no mês de Agosto a cultivar ‘Cabernet Sauvignon’ com 24,4 µm por oposição à cultivar ‘Aragonez’ com uma largura de estomas de 20,4 µm.

As diferenças encontradas na razão comprimento/largura dos estomas variam ao longo dos meses em estudo, mas apenas com significância à floração (Quadro 5). Quando analisamos o índice estomático, valores resumidos no Quadro 5, podemos ver que eles são semelhantes, embora não constantes, e em Julho e Agosto são superiores na cv. ‘Aragonez’ e inferiores na cv. ‘Touriga Nacional’. Todavia não se registaram diferenças significativas entre cultivares.

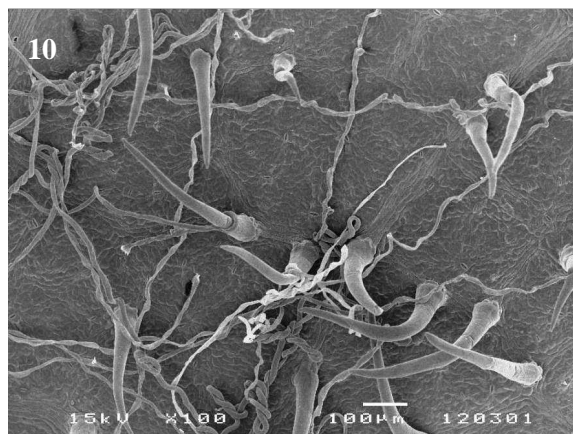
Quadro 5. Comprimento e largura (µm) dos estomas à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Comprimento estomas (µm)	Largura estomas (µm)	Razão Comprimento /Largura estomas	Índice estomático
Floração				
‘Aragonez’	31,46 (0,657)	21,97 (0,465)	1,45 (0,03)	6,68 (0,053)
‘Cabernet Sauvignon’	31,33 (0,645)	23,92 (0,568)	1,33 (0,03)	7,13 (0,562)
‘Syrah’	31,31 (0,655)	22,82 (0,506)	1,38 (0,04)	6,18 (0,502)
‘Touriga Nacional’	30,62 (0,867)	23,73 (0,707)	1,31 (0,03)	5,64 (0,537)
Significância	ns	ns	**	ns
Pintor				
‘Aragonez’	28,67 (0,635)	22,30 (0,683)	1,31 (0,027)	7,36 (0,127)
‘Cabernet Sauvignon’	29,12 (0,673)	22,36 (0,609)	1,32 (0,026)	7,21 (0,285)
‘Syrah’	27,89 (0,437)	20,28 (0,448)	1,39 (0,027)	7,03 (0,197)
‘Touriga Nacional’	31,20 (0,611)	22,75 (0,508)	1,38 (0,024)	6,74 (0,115)
Significância	***	**	ns	ns
Meia maturação				
‘Aragonez’	28,21 (0,546)	20,35 (0,483)	1,38 (0,02)	8,19 (0,352)
‘Cabernet Sauvignon’	31,27 (0,562)	24,38 (0,556)	1,27 (0,02)	7,32 (0,384)
‘Syrah’	30,75 (0,651)	21,45 (0,581)	1,40 (0,03)	7,37 (0,292)
‘Touriga Nacional’	30,62 (0,578)	23,14 (0,572)	1,32 (0,02)	7,01 (0,367)
Significância	**	***	*	ns

ns, *, **, *** - não significante, significante para níveis de probabilidade de 0,1, 0,01, 0,001 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

3.3. Indumento

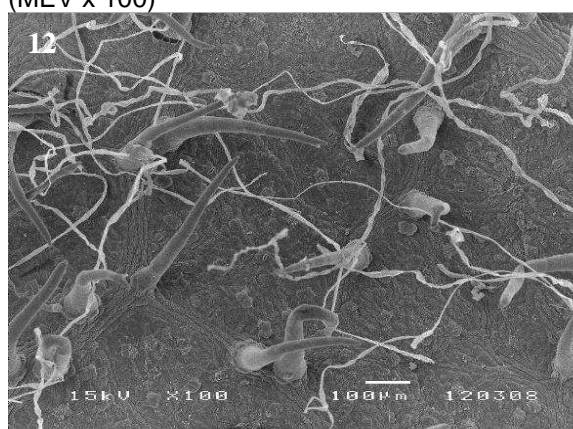
As folhas das cultivares estudadas de *V. vinifera* são pubescentes na página inferior. Têm pêlos uni- e pluricelulares não glandulares e unisseriados, assim como pêlos muito longos, provavelmente unicelulares, que enrolam helicoidalmente, conferindo um efeito fofo à página inferior (Figuras 2.C, 3.C, 4.C, 5.C). Alguns destes pêlos longos não mantêm o seu protoplasto, tendo perdido o conteúdo celular. Todos os tipos de pêlos apresentam uma distribuição irregular e sem orientação. A sua densidade é variável em cada folha e até mesmo dentro de cada cultivar. Em alguns casos, eles apresentam-se dispersos e em outros casos, eles formam um denso manto, ocultando completamente a superfície epidérmica (Figuras 2.C, 3.C, 4.C, 5.C). Este aspecto e o facto de os pêlos serem longos e darem o tal aspecto fofo, tornam impossível a determinação do índice de tricomas para cada cultivar, pois não se percebe onde se iniciam e terminam estes tricomas longos, o que inviabiliza a sua contagem.



Folha de 'Aragonez' à floração (Maio), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

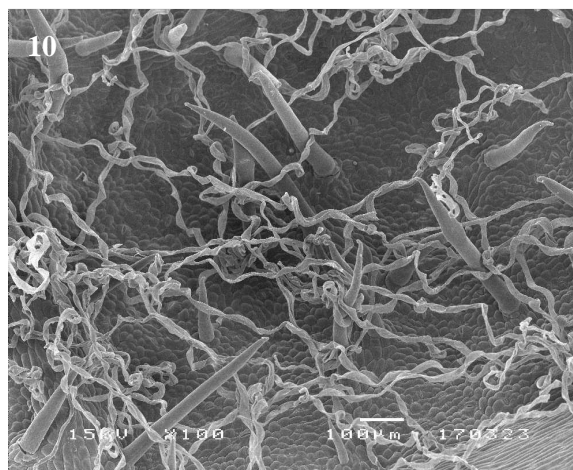


Folha de 'Aragonez' ao pintor (Julho), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

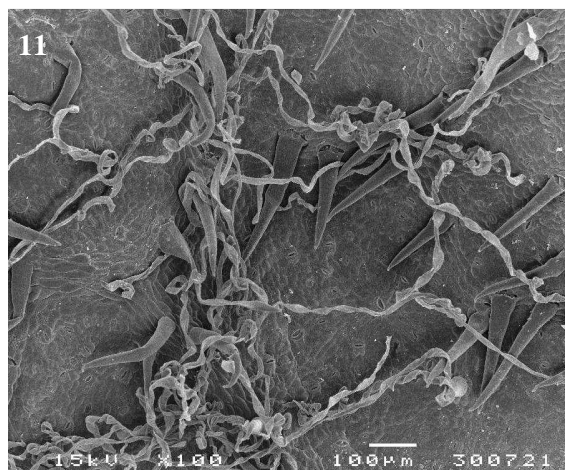


Folha de 'Aragonez' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

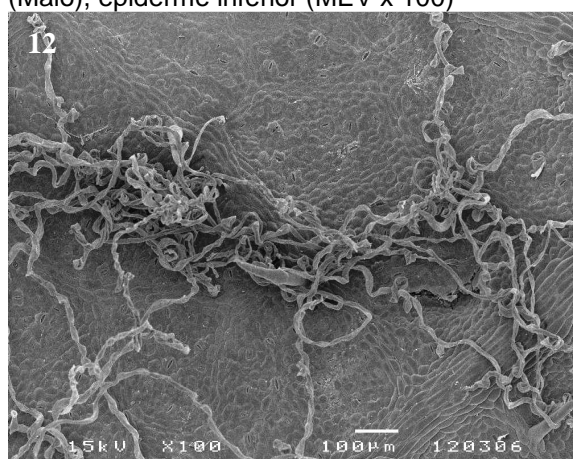
Figura 2.C. Epiderme inferior da casta 'Aragonez', nos meses em estudo, distribuição de tricomas, observação em MEV.



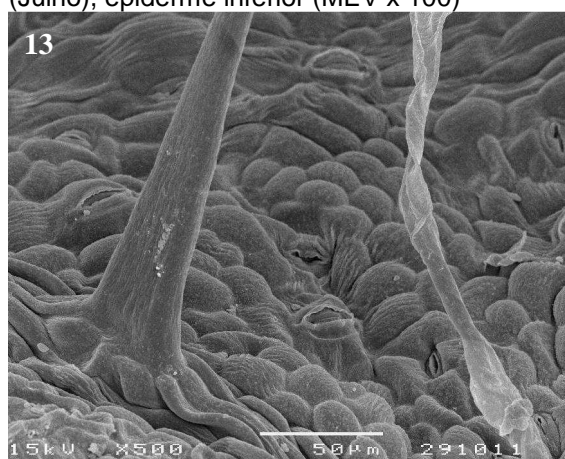
Folha de 'Cabernet Sauvignon' à floração (Maio), epiderme inferior (MEV x 100)



Folha de 'Cabernet Sauvignon' ao pintar (Julho), epiderme inferior (MEV x 100)

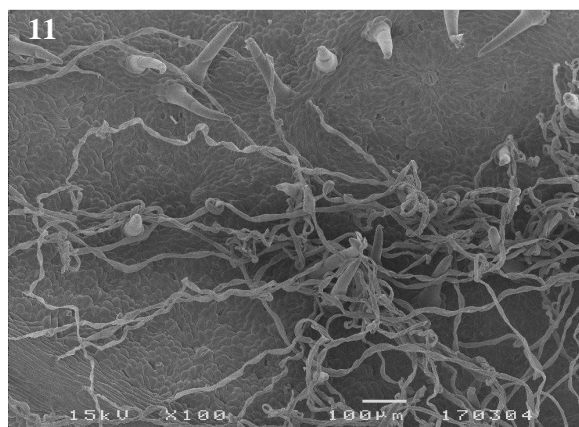


Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior (MEV x 100)

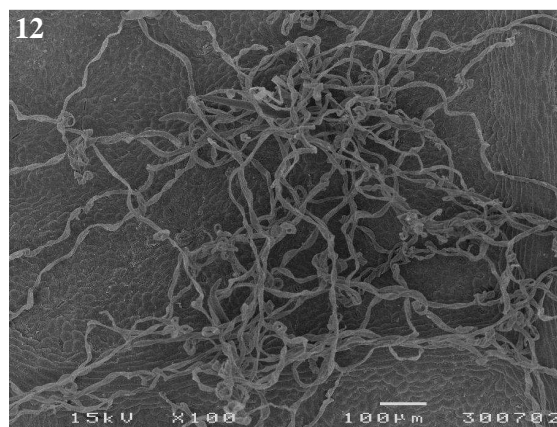


Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, inserção de tricomas (MEV x 500)

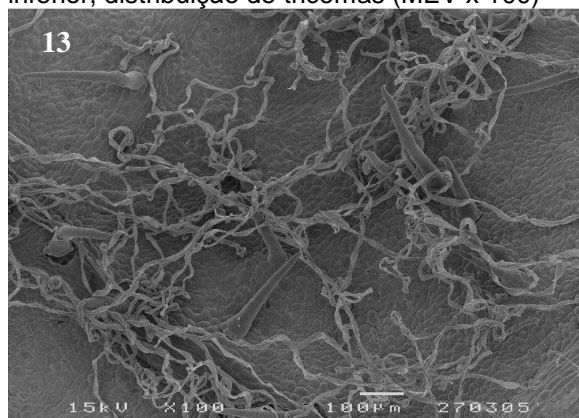
Figura 3.C. Epiderme inferior da casta 'Cabernet Sauvignon', nos meses em estudo, distribuição e inserção de tricomas, observação em MEV.



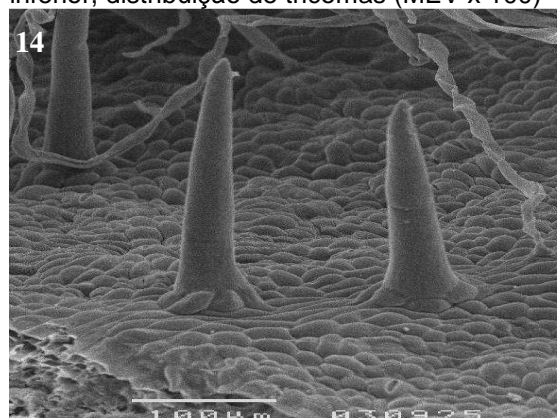
Folha de 'Syrah' à floração (Maio), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)



Folha de 'Syrah' ao pintar (Julho), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

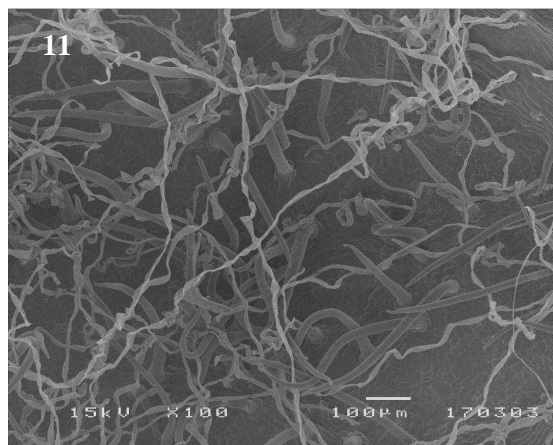


Folha de 'Syrah' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

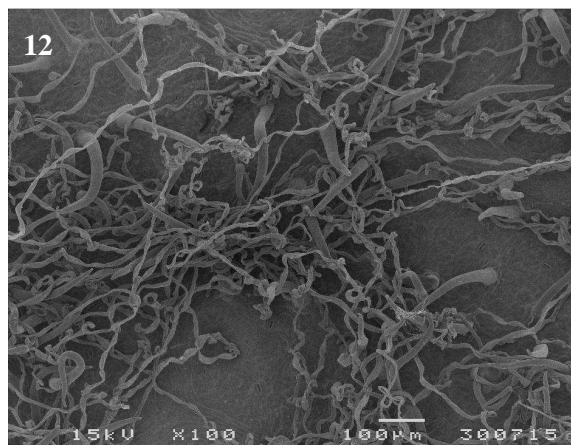


Folha de 'Syrah' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, inserção de tricomas (MEV x 500)

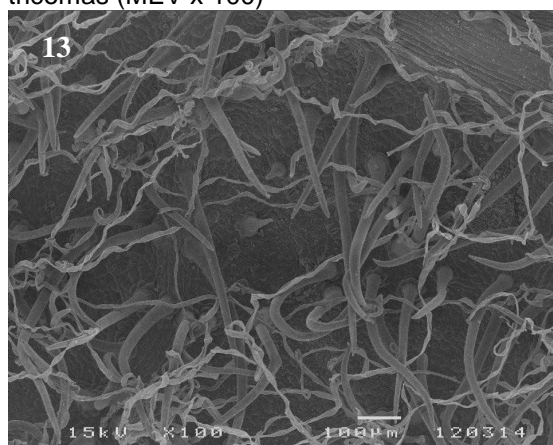
Figura 4.C. Epiderme inferior da superfície foliar da casta 'Syrah', nos meses em estudo, distribuição e inserção de tricomas, observação em MEV.



Folha de 'Touriga Nacional' à floração (Maio), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)



Folha de 'Touriga Nacional' ao pintor (Julho), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)



Folha de 'Touriga Nacional' à meia maturação (Agosto), epiderme inferior, distribuição de tricomas (MEV x 100)

Figura 5.C. Epiderme inferior da casta 'Touriga Nacional', nos meses em estudo, distribuição de tricomas, observação em MEV.

3.4. Mesófilo

Nas secções transversais da folha, as células epidérmicas são geralmente achatadas (Figura 4B.10), mas células epidérmicas de secção quase circular, são vistas com mais frequência nas cv. 'Cabernet Sauvignon' e 'Touriga Nacional' (Figura 5.B.10 e Figura 6.1 e 6.2). Em Maio a espessura da cutícula foi maior nas cvs. 'Cabernet Sauvignon' e 'Touriga Nacional' mas isso já não se verificou em Julho e fins de Agosto, mês em que esta situação se alterou, sendo que a espessura da cutícula foi superior para as cultivares 'Aragonez' e 'Cabernet Sauvignon' (Quadro 6). Secções transversais de folhas de videira mostram uma cutícula a variar entre 1,98 – 3,07 μm em folhas de 'Cabernet Sauvignon', entre 2,04 – 2,97 μm para a 'Touriga Nacional', a variar 1,74 – 3,03 μm para 'Aragonez' e entre 1,40 – 2,82 μm para a 'Syrah'.

Quadro 6. Espessura da cutícula na epiderme superior (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

Casta	Cutícula (μm)	Cutícula (μm)	Cutícula (μm)
	Floração	Pintor	Meia maturação
'Aragonez'	1,91 (0,173)	2,66 (0,038)	2,95 (0,084)
'Cabernet Sauvignon'	2,02 (0,038)	2,63 (0,029)	2,98 (0,094)
'Syrah'	1,44 (0,046)	2,60 (0,000)	2,74 (0,076)
'Touriga Nacional'	2,10 (0,061)	2,60 (0,000)	2,86 (0,108)
Significância	***	ns	*

ns, *, *** - não significante, significante para níveis de probabilidade de 0,1 e 0,001 respectivamente. Erro padrão da média entre parêntesis.

O mesófilo é dorsiventral em todos os *taxa* estudados. O parênquima paliçada tem entre 1-2 camadas em todas as cultivares, e pode chegar a 3 camadas em 'Cabernet Sauvignon' (Figura 6). Normalmente o parênquima paliçada é interrompido acima e abaixo dos grandes feixes vasculares, onde é encontrado colênquima. Em Maio a largura do parênquima em paliçada é semelhante em todos os *taxa*, excepto para a 'Touriga Nacional', que tem o valor mais baixo de 39,00 (2,37) μm por oposição a 'Cabernet Sauvignon', com uma largura de 58,93 (2,03) μm (Quadro 7). Nos meses seguintes em estudo, passa a ser a cultivar 'Aragonez' a destacar-se com os valores mais elevados, mas mantêm-se a 'Touriga Nacional' com um valor mais baixo de largura do parênquima em paliçada.

As células do parênquima lacunoso são muito mais irregulares relativamente à sua forma e estão parcialmente separadas umas das outras, por espaços intercelulares irregulares, mais notórios nas folhas de 'Aragonez' e 'Syrah' (Figura 6.3 e 6.4). Em Maio a largura deste tipo de parênquima deste é semelhante em todos os *taxa*, sendo que a cv. 'Aragonez' tem o

valor mais baixo, 69,04 (3,78) μm . Em Agosto a largura é maior em 'Aragonez' com 104,29 (1,63) μm e menor na 'Cabernet Sauvignon' com 69,62 (2,10) μm (Quadro 7).

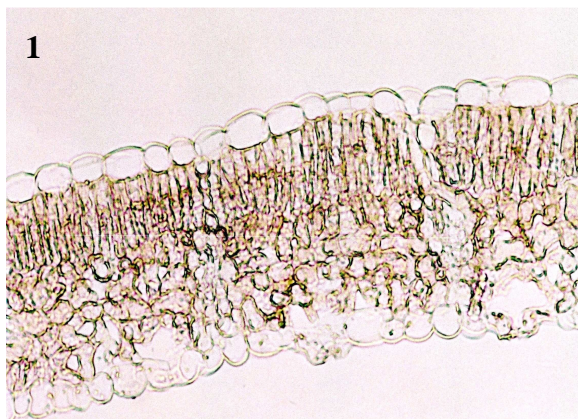
É importante notar que, em 'Cabernet Sauvignon' as células do parênquima lacunoso são muito mais estreitas e quase não têm espaços de ar intercelulares. Uma situação semelhante é observada em 'Touriga Nacional' e assim, em ambas as cultivares, podemos dizer que a quantidade de parênquima lacunoso é menor (Figura 6.1 e 6.2). Idioblastos grandes com ráfides, cristais de oxalato de cálcio em forma de agulha, de comprimento variável, estão amplamente distribuídos nos tecidos do parênquima (Figura 6.5). Em todas as cultivares as drusas, outro tipo de cristal de oxalato de cálcio, são menos comuns nas amostras de Maio mas o seu número aumenta gradualmente nos meses seguintes.

Quadro 7. Espessura total da folha e dos parênquimas clorofilinos (μm) à floração (Maio), pintor (Julho) e meia maturação (Agosto).

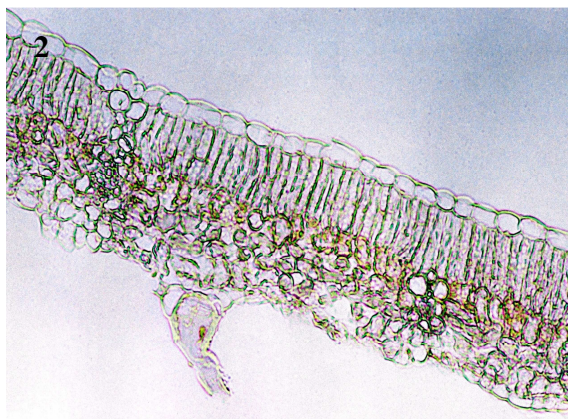
Casta	Parênquima paliçada (μm)	Parênquima lacunoso (μm)	Espessura total da folha (μm)
Floração			
'Aragonez'	50,56 (3,246)	69,04 (3,780)	150,51 (4,407)
'Cabernet Sauvignon'	58,93 (2,033)	80,02 (1,775)	173,33 (2,252)
'Syrah'	53,44 (2,214)	82,91 (3,341)	165,24 (5,291)
'Touriga Nacional'	39,00 (2,373)	73,09 (2,985)	140,98 (1,878)
Significância	***	***	**
Pintor			
'Aragonez'	69,91 (1,861)	98,22 (2,242)	197,89 (2,687)
'Cabernet Sauvignon'	62,40 (1,838)	87,24 (2,256)	195,00 (3,125)
'Syrah'	52,29 (1,466)	82,33 (2,373)	164,38 (2,443)
'Touriga Nacional'	47,09 (1,400)	74,53 (1,621)	154,56 (1,793)
Significância	***	***	***
Meia maturação			
'Aragonez'	78,87 (3,218)	104,29 (1,634)	215,51 (4,061)
'Cabernet Sauvignon'	57,49 (2,091)	69,62 (2,101)	164,38 (4,226)
'Syrah'	65,29 (3,313)	84,07 (2,210)	182,87 (5,109)
'Touriga Nacional'	47,26 (1,226)	85,51 (2,966)	164,38 (3,201)
Significância	***	***	***

** , *** - significante para níveis de probabilidade de 0,01 e 0,001 respectivamente.

Erro padrão da média entre parêntesis.



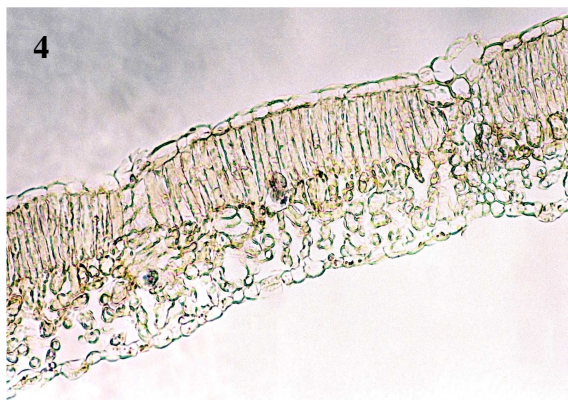
Folha de 'Cabernet Sauvignon' à meia maturação (Agosto), corte transversal, células da epiderme com secção circular, 2-3 camadas de parênquima em paliçada e parênquima lacunoso quase sem espaços intercelulares (MO x 200)



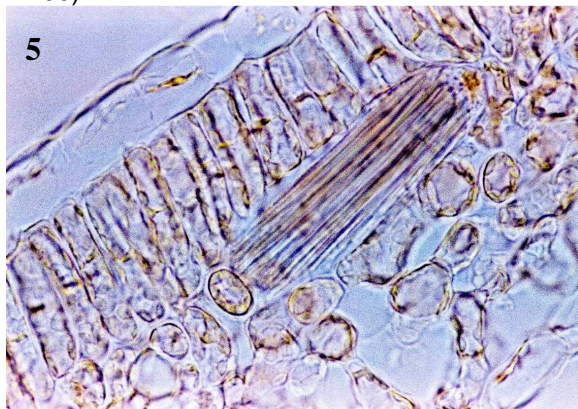
Folha de 'Touriga Nacional' ao pintor (Julho), corte transversal, células da epiderme com secção circular, 1-2 camadas de parênquima em paliçada e parênquima lacunoso quase sem espaços intercelulares (MO x 80)



Folha de 'Syrah' ao pintor (Julho), corte transversal, poucas células da epiderme com secção circular, 1-2 camadas de parênquima em paliçada e parênquima lacunoso com muitos e grandes espaços intercelulares (MO x 200)



Folha de 'Aragonez' ao pintor (Julho), corte transversal, poucas células da epiderme com secção circular, 1-2 camadas de parênquima em paliçada e parênquima lacunoso com muitos e grandes espaços intercelulares (MO x 80)



Folha de 'Aragonez' à floração (Maio), secção transversal, mesófilo com um idioblasto com ráfides no seu interior (MO x 420)

Figura 6. Secções transversais das folhas das quatro castas, nos meses em estudo, observação em MO.

3.5. Dimensões do coberto

A folha da videira é caracterizada por ter nervação palminérvea, com 5 nervuras principais que partem do ponto peciolar, sendo o recorte profundo e lobado, resultando 5 lobos. Os ângulos entre as nervuras e as suas dimensões relativas dão origem a folhas com várias formas elementares: cuneiforme, cordiforme, pentagonal, circular e reniforme. Os lóbulos do ápice mostram maiores ângulos de divergência na cv. 'Touriga Nacional' e na cv. 'Aragonez'.

No Quadro 8 verifica-se que há diferenças significativas entre cultivares para a maioria dos parâmetros que caracterizam o coberto da videira. As castas 'Aragonez' e 'Syrah' são as que apresentam sarmentos com maior comprimento do entrenó. A casta 'Aragonez' também tem mais área foliar por sarmento e partilha com a 'Touriga Nacional' a maior área foliar total por videira, sarmento e hectare.

Uma comparação quantitativa mostra que as castas podem ser separadas pela área das suas folhas, com a cultivar 'Aragonez' a apresentar um tamanho de folhas significativamente maior, enquanto a cv. 'Cabernet Sauvignon' tem o menor tamanho (Quadro 8). A 'Touriga Nacional' é a casta que apresenta o maior número de netas bem com a maior área foliar de netas por sarmento e maior largura média da sebe (média ao nível dos cachos e da largura ao último arame).

Quadro 8. Dimensões do coberto determinadas à meia maturação. Valores médios de 20 videiras por cultivar. Quinta da Amieira, Torres Vedras, 2007.

	'Aragonez'	'Cabernet Sauvignon'	'Syrah'	'Touriga Nacional'	F
Comprimento do entrenó (cm)	8.9 a	7.9 b	9.4 a	7.4 b	**
Área foliar das folhas principais/sarmento (m ²)	0.44 a	0.29 c	0.31 c	0.38 b	**
Folhas principais/sarmento (n ^o)	16.9 b	20.1 a	15.5 b	20.4 a	***
Área foliar da folha principal (cm ²)	262.9 a	146.8 c	200.8 b	186.5 b	***
Netas/sarmento (n ^o)	13.9 b	33.3 ab	28.5 b	55.9 a	*
Área foliar das netas/sarmento (m ²)	0.141	0.177	0.222	0.304	ns
Área foliar da neta (cm ²)	99.2 a	50.2 c	73.6 b	52.5 bc	**
Área foliar total/sarmento (m ²)	0.58 ab	0.47 b	0.68 a	0.53 b	*
Área foliar total/videira (m ²)	10.49 ab	7.56 b	9.19 b	12.52 a	*
Área foliar total das netas (% área foliar total)	23.2	35.3	42	38.4	ns
Largura média da sebe (média ao nível dos cachos e da largura ao último arame) (cm)	50.2 b	47.7 b	50.1 b	53.5 a	*
Superfície foliar exposta (SFE) (m ² ha ⁻¹)	14006 b	13908 b	14002 b	14138 a	*
Área foliar total ha ⁻¹ (m ²)	41949.1 ab	30253.1 b	36762.4 b	50062.9 a	*

*, **, ***, ns = diferenças significativas a $P = 0,05, 0,01, 0,001$ ou sem diferenças, respectivamente.

3.6. Produtividade

Os resultados referentes à influência das várias cultivares no rendimento e crescimento vegetativo são apresentados no Quadro 9. Registaram-se diferenças significativas entre cultivares no número de cachos por videira e rendimento. As cultivares 'Touriga Nacional' e 'Cabernet Sauvignon' produziram um número de cachos significativamente superior por planta mas dado que o peso médio dos cachos da cultivar 'Aragonez' é mais elevado, faz com que esta casta tenha obtido as maiores produções.

Em relação ao crescimento vegetativo não se verificaram diferenças significativas entre cultivares, no que concerne ao número de sarmentos por videira e peso do sarmento. Mas houve diferenças significativas entre a cultivar 'Touriga Nacional' e as outras três cultivares, no que concerne ao peso de lenha de poda (Quadro 9).

Quadro 9. Rendimento e crescimento vegetativo nas quatro cultivares de videira, ano de 2007, Quinta da Amieira, Torres Vedras. Valores médios de 20 videiras por cultivar.

	'Aragonez'	'Cabernet Sauvignon'	'Syrah'	'Touriga Nacional'	F
Nº de cachos/videira	20,6 c	25,5 ab	23,8 a	27,0 b	**
Rendimento (kg/videira)	5,3 a	3,9 b	3,2 d	2,7 c	***
Nº de sarmentos/videira	17,6	16,6	17,8	18,4	ns
Peso do sarmento (g/sarmento)	100,9	98,0	94,8	106,7	ns
Lenha de poda (g/videira)	1756,3 ab	1625,0 b	1665,6 a	1918,8 b	*
Índice de Ravaz	3,1 a	2,5 b	1,4 d	2,0 c	*

*, **, ***, ns = diferenças significativas a $P = 0,05, 0,01, 0,001$ ou sem diferenças, respectivamente.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em geral as folhas para além de serem dorsiventrals e achatadas, com crescimento terminal restrito e de terem uma função fotossintética, podem ter uma morfologia muito diversa e podem apresentar diferenças na sua estrutura, estomas e presença de pêlos. As preparações para a visualização da superfície são valiosas para observar as características das células epidérmicas assim como a distribuição dos estomas e pêlos.

No nosso estudo as quatro cultivares de videira partilham o mesmo habitat e quanto à área foliar da folha principal verifica-se que a cv. 'Aragonez' se destaca pela sua maior dimensão, enquanto que a da folha da cv. 'Cabernet Sauvignon' é a menor. Através do estudo comparativo que efectuámos, confirmou-se que o tecido epidérmico é idêntico, quanto à forma das células, pois a razão comprimento-largura nas células epidérmicas adaxiais é muito próxima em todos os *taxa* (Quadro 1 e 2). Quanto às suas dimensões apesar de semelhantes nos *taxa* estudados, verifica-se que a casta 'Aragonez' é a que apresenta células epidérmicas adaxiais mais compridas e mais largas, portanto com maior área de exposição (Quadro 1 e 2). Contudo, quando visualizadas em secção transversal, o lúmen das células na 'Touriga Nacional' e 'Cabernet Sauvignon' parece maior do que o das restantes cultivares, pois apresenta uma secção circular. Alguns autores (Esau, 1976; Dickison, 2000) acreditam que este lúmen poderia servir para armazenar água ou outros conteúdos especiais e isso pode ter algum significado e importância fisiológica.

A superfície foliar encontra-se revestida pela cutícula, uma camada complexa e cerosa. O seu estudo pode dar-nos muita informação sobre o habitat da planta e a sua resposta a diferentes stresses ambientais (Martin & Juniper, 1970). Considerando os valores encontrados para a espessura da cutícula nas quatro cultivares, podemos dizer que todas as amostras têm uma cutícula fina, e que foram encontradas poucas ou nenhuma diferenças no que respeita à superfície cuticular durante o tempo do nosso estudo. Para além da importância da espessura, a estrutura e a quantidade de ceras epicuticulares também afectam a permeabilidade da cutícula e o grau com que uma superfície pode ser molhada, o que interfere, por exemplo, no efeito selectivo de herbicidas nas plantas (Hess & Falk, 1990). As ceras epicuticulares desempenham um papel importante na redução dos danos provocados na fotossíntese, e pelo calor térmico nas folhas, provocando a reflexão da luz (Martin & Juniper, 1970). Sendo que as quatro cultivares apresentam uma cutícula semelhante podemos dizer que esta não é responsável pelo seu comportamento divergente.

De acordo com Metcalfe & Chalk (1979) o tipo de estoma actinocítico é característico da epiderme foliar do género *Vitis*. Este é, na verdade, o tipo de estoma observado na superfície, mas quando consideramos os estomas mais elevados, eles pertencem a outro tipo, o tipo staurocítico, segundo a classificação de Wilkinson (1979). A dimensão dos estomas encontrados é muito heterogéneo em todas as cultivares estudadas: estomas pequenos e grandes coexistem lado a lado em cada *taxa* (Figuras 2.B, 3.B, 4.B, 5.B). Esta característica torna-se muito difícil de analisar, pois os valores encontrados são muito díspares mas, apesar disso, nota-se que a razão comprimento-largura acaba por ser semelhante entre os *taxa* e as variações encontradas não são significativas.

Embora não seja aplicável no nosso caso, o tamanho dos estomas pode realmente ser muito variável: condições de sombreamento, clima e solos húmidos são condições coincidentes com estomas pequenos, pois sol directo e condições de secura parecem conduzir a estomas maiores (Wilkinson, 1979). Os estomas são menos influenciados pelas condições ambientais do que as células epidérmicas e geralmente são suficientemente estáveis, mas alguns autores acham que é melhor considerar os tamanhos mais frequentes ou a razão comprimento-largura dos estomas (Wilkinson, 1979; Stace, 1989).

Para avaliar a frequência estomática, independentemente da dimensão e intervalo das células epidérmicas, considera-se o índice estomático. Este pode mostrar que o número de estomas existentes na epiderme não é maior nas folhas ao sol do que nas folhas à sombra. É independente do tamanho da folha e do habitat da planta e é igual para diferentes variedades dentro de uma espécie. Investigadores estão de acordo que a região média da lâmina da face abaxial no centro da folha é a menos variável e, portanto, mais adequada (Rowson, 1946 *in* Teixeira & Diniz, 2003); Dilcher, 1974; Stace, 1989). O nosso estudo revela que o índice estomático das quatro castas e para a área da folha estudada é similar. Aqui também podemos dizer que este não será responsável pela resposta divergente das castas em estudo.

É conhecida a importância dos tricomas individuais e do indumento como um todo no ciclo da vida da planta, a sua influência no desenvolvimento dos órgãos vegetais, assim como o seu papel em vários aspectos de adaptação ecológica e fisiológica (Theobald *et al.*, 1979). O indumento não é directamente influenciado pela morfologia dos pêlos individuais, mas sim pela sua distribuição e densidade. Embora não tenhamos quantificado o índice de tricomas notamos que o padrão de distribuição dos pêlos, ou a falta desse padrão, é absolutamente o mesmo em todas as cultivares, portanto, neste caso, mais uma vez, não poderá ser considerado como um elemento que condiciona a adaptação das plantas.

A heterogeneidade em termos de resistência ao stress hídrico e térmico observada no comportamento das plantas estudadas pode ser atribuída às diferenças na condutância estomática, teor de clorofila e / ou a diferenças na resistência interna do mesófilo para a difusão do CO₂ da cavidade estomática para os locais de carboxilação (Evans *et al.*, 1994; Patakas *et al.*, 2003). Efectivamente, no nosso estudo comparativo da anatomia foliar das quatro diferentes cultivares de videira, confirmaram-se características anatómicas gerais idênticas embora apresentem uma organização diferente do mesófilo. Na verdade a cv. 'Cabernet Sauvignon' e a cv. 'Touriga Nacional', as cultivares consideradas como mais resistentes, apresentam o parênquima lacunoso com menos espaços intercelulares. A situação inversa é encontrada na 'Aragonez' e 'Syrah', os taxa menos resistentes ao stress hídrico e térmico, onde o parênquima lacunoso apresenta muitos e grandes espaços intercelulares. Considerando a espessura da folha é interessante notar que, no fim de Agosto as castas 'Cabernet Sauvignon' e 'Touriga Nacional' têm as folhas mais finas, provavelmente porque o parênquima tem muito menos espaços intercelulares.

A taxa fotossintética nas plantas pode certamente ser influenciada por características anatómicas foliares e assim a análise do mesófilo deve ser considerada. Sabe-se que plantas cultivadas *in vitro*, comparadas com plantas que crescem no campo, têm folhas mais finas, cutícula mais fina, menor desenvolvimento do tecido vascular e maior densidade estomática sendo que na organização do mesófilo verificou-se uma ausência de parênquima paliçada (Cruz-Pizarro *et al.*, 2002). Noutro ensaio (Dami & Hughes, 1997) as folhas de plântulas da casta 'Valiant' tratadas com polietilenoglicol tinham células de mesófilo menores, uma camada mais definida de parênquima paliçada, redução do espaço intercelular e maior número de cloroplastos. No entanto, folhas de plântulas testemunha, continham células de mesófilos maiores, interrupção da formação da camada de parênquima paliçada, maiores espaços intercelulares e menos cloroplastos. Estes resultados sugerem que a pressão osmótica tal como o polietilenoglicol, podem ser usados para induzir uma anatomia da folha mais normal e assim reduzir a perda de água nas plantas. Na nossa opinião, o arranjo do mesófilo pode estar envolvido em diferentes respostas fisiológicas nas castas de videira, sob as mesmas condições ambientais.

Nas plantas superiores, os cristais de oxalato de cálcio são um dos principais produtos biomineralizados, normalmente desenvolvidos dentro de células especializadas, denominadas idioblastos. Durante o nosso estudo, notámos uma mudança no conteúdo de cristais verificada em todas as amostras: em Maio só foram observadas ráfides e no fim de Agosto um considerável número de drusas coexistiam com elas. A sua função biológica e

uso ainda não são bem compreendidos (Prychid & Rudall, 1999; Jáuregui -Zúñiga *et al.*, 2003; Nakata, 2003), mas do ponto de vista de alguns autores a fertilização pode afectar a espessura das folhas e o seu conteúdo em cristais de oxalato de cálcio (Tompa *et al.*, 1977). Esta é uma possível explicação para as diferenças observadas no conteúdo de cristais encontrado em todas as amostras estudadas, mas não conhecemos as possíveis implicações fisiológicas deste fenómeno nas plantas.

Em conclusão, as quatro cultivares de videiras estudadas partilham o mesmo habitat e apresentam caracteres epidérmicos comuns e similares, tais como espessura da cutícula, o índice estomático, a distribuição de tricomas e alguns caracteres anatómicos adaptativos, como o arranjo celular a nível do mesófilo e que poderá ser responsável pelas diferentes respostas face às condições ambientais. Estes dados micromorfológicos quando complementados com dados fisiológicos podem ajudar a compreender as respostas ambientais das plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARBONNEAU, A. 1981. *Observation sur vigne: Codification des données agronomiques. Vititechniques*, Seyembre. 8-11.
- CHAVES, M.M., MAROCO J.P. & PEREIRA J.S., 2003. Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* **30**: 239-264.
- CRUZ-PIZARRO F., GONZÁLEZ-ROSAS, H., ESPINOSA-OSORNIO, G., VELÁZQUEZ-MENDOZA, J. & COLINAS-LEÓN, M.T. 2002. *Anatomical changes in Vitis vinifera leaves produced in vitro. Revista Chapingo. Serie Horticultura*, Vol. **8**: 63-70.
- CUTTER, E.G. 1986. *Anatomia vegetal. Parte I – Células e tecidos*. 2.ed. São Paulo.
- DAMI, I. & HUGHES H., 1997. *Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of 'Valiant' grape*. *Pl. Cell Tissue and Organ Culture*, **47**: 97-101.
- DICKISON, W.C. 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Harcourt Academic Press, San Diego.
- DILCHER, D. 1974. Approaches to the identifications of angiosperm leaf remains. *Bot. Rev.* **40**: 1-157.
- ESAU, K. 1976. *Anatomia das Plantas com Sementes*. Edgard Blucher, Lda, S. Paulo.
- EVANS, J.R., VON CAEMMERER, S., SETCHELL, B.A. & HUDSON, G.S., 1994. The relationship between CO₂ transfer and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of rubisco. *Aust. J. Plant Physiol.* **21**: 475–495.
- EVANS, C. 1996. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 14th Ed. Saunders Company Ltd, London.
- FAHN, A. 1998. *Anatomia Vegetal*. Ed Blume, Madrid.
- FAHN, A. 1990 *Plant Anatomy*. Perman Press. London.
- HAYAT, M. 1981. *Principles and techniques of electron microscopy*. Biological applications. 2nd Edition. Edward Arnold Publishers, Ltd. London.
- HESS, F.D. & FALK, K.H. 1990. *Herbicide deposition on leaf surfaces. Weed Science*, **38** :280-288.
- JÁUREGUI-ZÚÑIGA, D., REYES-GRAJEDA, J.P., SEPÚLVEDA-SÁNCHEZ, J.D., WHITAKER, J.R. & MORENOL, A. 2003. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifera*. *J. Plant Physiol.* **160**. 239–245.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C., KELLOGG, E., STEVENS, P. & DONOGHUE, M. 2008. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland, Massachusetts USA: Sinauer associates, Inc.

- KNAPP, A.K., COCKE, M., HAMERLYNCK, E.P. & CLENTON, E. 1994. Effect of elevated CO₂ on stomatal density and distribution in a C₄ grass and a C₃ forb under field conditions. *Annals of Botany* **74**: 595-599.
- LOPES, C.M., PINTO, P.A., 2005. Easy and accurate estimation of grapevine leaf area with simple mathematical models. *Vitis*, **44**(2): 55-61.
- MAROCCO, J.P.; RODRIGUES, M.L.; LOPES, C. & CHAVES, M.M. (2002) Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought – metabolic and modelling approaches. *Funct. Plant Biol.* **29**: 451-459.
- MARTIN, J.T. & JUNIPER, B.E. 1970. *The cuticles of plants*. Edward Arnold Publ. Ltd. London.
- METCALFE, C. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of Dicotyledons*. Volume 1. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication, Oxford.
- METCALFE, C. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of Dicotyledons*. Volume I. 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication, Oxford.
- NAKATA, P. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, **164**: 901-909
- NAUTIYAL, S., BADOLA H.K. & NEGI D.S. 1994. Plant responses to water stress: changes in growth, dry matter production, stomatal frequency and leaf anatomy. *Biol. Plant.* **36**: 91-97.
- PALLIOTI, A., CARTECHINI A. & NASINI L. 2001. Grapevine adaptation to continuous water limitation during the season. *Adv. Hort. Sci.* **15**: 39-45.
- PATAKAS, A., KOFIDIS, G. & BOSABALIDIS, A. M. 2003. The relationships between CO₂ transfer mesophyll resistance and photosynthetic efficiency in grapevine cultivars. *Sc. Horticulturae.* **97**: 255–263.
- PRYCHID, C. & RUDALL, P. 1999. Calcium oxalate crystals in Monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Ann. Bot.* **84**: 725-739.
- RODRIGUES, A., 1952. *Um método filométrico de caracterização ampelográfica*. 42 p. Serviço editorial de Repartição de estudos, informação e propaganda. Direcção Geral dos Serviços Agrícolas; Ministério da Economia, Lisboa.
- ROWSON, J. 1946. *The significance of the stomatal index as a differential character. III. Studies on the genera Atropa, Datura, Digitalis, Phytolacca and in polyploid leaves*. *Quart. J. Pharmacy and Pharmacol.* **19**: 136 –143 (in Teixeira and Diniz, 2003).
- SALISBURY, E. 1927. On the causes and ecological of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **216**: 1-65.
- SMART, R.E. & ROBINSON, M. 1991. *Sunlight into wine. A Handbook for winegrape canopy management*. Winetitles, Adelaide, 88pp.
- STACE, C. 1989. *Plant taxonomy and biosystematics*, 2nd ed. Ed. Arnold Publ., Ltd. London.

- THEOBALD, W., KRAUHULIK, J. & ROLLINS R. 1979. *Trichome description and classification*. In Metcalfe, C., Chalk, L. *Anatomy of Dicotyledons*, Vol I. 2nd ed. Oxford Univ. Press.
- TOMPA B., KOZMA P., POLYAK, D. 1977. *Effect of nutrient treatments on the anatomical patterns of vine leaves*. In *Viticulture and enology abstracts*, Ed. Kertesz. Egyet. Kiadvanyai: A "Lippay Janos" Tudomanyos Uelesszak Eloeadasai, Budapest.
- WAHID, A., GELANI S., ASHRAF M. & FOOLAD M.R. 2007. *Heat tolerance in plants: An overview Environmental and Experimental Botany*. **61**: 199-223.
- WILKINSON, H. 1979. *The plant surface*. In Metcalfe, C., Chalk, L. *Anatomy of Dicotyledons*, Vol I. 2nd ed. Oxford Univ. Press.

ANEXOS

Anexo I

Protocolo I: Fixação e preparação do material vegetal para Microscópio Electrónico de Varrimento

Fixação

- Solução de glutaraldeído a 3%, 3 horas a 4 °C;
- Lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1 M, a pH 7,0 - 24 horas a 4 °C;
- Lavagem em água destilada, 3x, 10 minutos cada.

Desidratação

- Em soluções aquosas de concentrações ascendentes de etanol, 30%, 50%, 70% e 100%, 10 a 20 minutos cada.

Secagem

- Pelo método de ponto crítico do CO₂, efectuada num aparelho Critical Point Polaron BioRad E3500.

Metalização

- Montagem em suportes metálicos cobertos com fita adesiva dupla;
- Metalização por irradiação com ouro, num metalizador Jeol JFC-1200.

Anexo II

Protocolo II: Inclusão do material vegetal em parafina

(O material vegetal a ser sujeito a este protocolo deve ser previamente fixado e desidratado, como indicado no Protocolo I)

Diafanização

- Passagem em TBA (álcool butílico terciário), 2x, 1 hora
- Nova passagem em TBA, uma noite sobre a estufa, a 45-60 °C

Impregnação

- 1º banho em mistura parafina líquida - TBA (em estufa, a 45-60 °C, 4 horas)
- 2º banho em parafina líquida (em estufa, a 60 °C, 4 horas)

Inclusão

- Banho em parafina de inclusão líquida (em estufa a 60° C, 16 horas)
- Colocação de parafina de inclusão líquida em moldes metálicos
- Colocar e orientar o material no molde, ainda com a parafina de inclusão líquida.
- Deixar solidificar (polimerização).