



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**A BIOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA A VITIVINICULTURA DE
PRECISÃO**

LUCIANO ESPINDOLA FERNANDES

Foz do Iguaçu
2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

A BIOTECNOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA A VITIVINICULTURA DE PRECISÃO

LUCIANO ESPINDOLA FERNANDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

Coorientador: Dr. Giuliano Elias Pereira

Foz do Iguaçu
2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA



ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao(s) dia(s) 11 o mês de Julho do ano de 2022, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “A Biotecnologia como ferramenta para a vitivinicultura de precisão”, apresentado pelo discente Luciano Espíndola Fernandes, do curso de Biotecnologia. Os trabalhos foram iniciados às 15:30 horas, pelo(a) docente orientador(a) Dr. Cristian Antonio Rojas, presidente da banca examinadora, juntamente com o docente Dr. Berghem Morais Ribeiro e o Pesquisador Dr. Giuliano Elias Pereira.

Observações da Banca Examinadora:

Sem observações

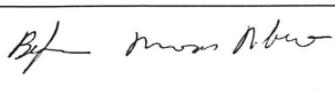
A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às xx:xx horas. Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 9,5	Média final: 9,5
docente	nota final: 9,5	
docente	nota final: 9,5	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar, eu Cristian Antonio Rojas lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 11 de Julho de 2022.

Assinaturas:

 Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas	 Prof. Dr. Berghem Morais Ribeiro	 Pesq. Dr. Giuliano Elias Pereira
---	--	---

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente a todos os professores que tornaram possível este momento, iniciando pelo professor Dr. Cristian Antonio Rojas, que teve paciência na minha orientação com seus direcionamentos dotados de experiência e domínio do assunto para a minha formação, ao Dr. Giuliano Elias Pereira por me ensinar a valorizar o viticultor e amar todos os dias fazer o meu trabalho, pois a simplicidade e a dedicação faz do homem um ser honrado, a professora Dra. Marciana Pierina Uliana Machado que me ensinou a dar os primeiros passos na pesquisa acadêmica, professora, sem o seu ensinamento eu não teria chegado onde cheguei e ao Dr. Berghem Morais Ribeiro pelas aulas e aconselhamentos do que eu deveria fazer para ser um profissional apto no mercado de trabalho. Vocês foram imprescindíveis na minha caminhada acadêmica, me ajudando nos momentos de dificuldade e aconselhando com sua experiência e profissionalismo.

Aos vários amigos e companheiros de estudo, não seria possível citar nomes, pois diversos foram os momentos de estudos e diversões.

Agradeço a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV) pela oportunidade de estágio e desenvolvimento desta pesquisa, assim como o aprendizado juntamente da equipe liderada pela Dra. Juliane Barreto de Oliveira, no ano de 2021. Ao Dr. Thor Vinícius Martins Fajardo pela oportunidade de executar esta pesquisa no laboratório de Virologia Vegetal. Esta oportunidade me ajudou a perceber como o campo da enologia é incrível e admirável.

Sou grato a Deus pela vida, por minha família, pelos amigos e por tudo o que tenho.

RESUMO

A biotecnologia pode ser uma ferramenta com grande relevância para a vitivinicultura. O presente estudo traz com precisão a porcentagem de plantas infectadas pelos agentes virais Grapevine leafroll-associated virus (GLRAV-3), Grapevine virus A (GVA) e Grapevine virus B (GVB) em três vinícolas comerciais, através da confirmação de infecção viral por RT-PCR em tempo real. O viticultor terá a possibilidade de entender melhor a sua área através de um georreferenciamento do vinhedo, observando os mapas gerados pelo software Quantum GIS que apresenta uma interface gráfica simples. É possível otimizar o manejo de parcelas com diferentes taxas de infecção viral através da união de duas ferramentas, onde o RT-PCR em tempo real confirma a presença da existência de um vírus ou um complexo viral e o QGIS transforma estes dados em um mapa do qual o viticultor pode utilizar como um banco de dados acessível para observar qual área está mais afetada, tendo a possibilidade de a cada safra coletar informações e fazer um novo georreferenciamento, e com isso realizar um manejo diferenciado para a extensão de terra delimitada, de acordo com a observação da progressão viral e a qualidade dos frutos gerados. No cultivo de uvas, existe a possibilidade de trabalhar com plasticidade, pois dependendo da qualidade, a matéria prima é propícia para um determinado produto. Foi observado uma distinta taxa viral para cada vírus em cada vinícola, isto pode estar relacionado ao "terroir", pois cada vinícola apresenta diferentes práticas enológicas, sofre com a atuação de distintas condições edafoclimáticas, assim como, há diferentes taxas da incidência de patógenos que atuam sobre a videira e conseqüentemente sobre a formação da complexidade química da uva.

Palavras-chave: RT-PCR em tempo real. Vírus. Vinhedos. GLRAV-3. GVA. GVB. Uvas. Vitivinicultura. QGIS. Mapas. Georreferenciamento.

ABSTRACT

Biotechnology can be a tool with great relevance for viticulture. The present study will accurately report the percentage of plants infected by the viral agents Grapevine leafroll-associated virus (GLRAV-3), Grapevine virus A (GVA) and Grapevine virus B (GVB) in three commercial wineries, through confirmation of viral infection by Real-time RT-PCR. The winegrower will have the possibility to better understand his area through a georeferencing of the vineyard, observing the maps generated by the Quantum GIS software that presents a simple graphical interface.. It is possible to optimize the management of plots with different rates of viral infection by combining two tools, where real-time RT-PCR confirms the presence of a virus or a viral complex and QGIS transforms this data into a map of the which the winegrower can use as an accessible database to see which area is most affected, having the possibility of collecting information at each harvest and making a new georeferencing, and with that carrying out a differentiated management for the delimited land extension, according to the observation of the viral progression and the quality of the fruits generated.

In the cultivation of grapes, there is the possibility of working with plasticity, because depending on the quality, the raw material is suitable for a particular product. A different viral rate was observed for each virus in each winery, this may be related to the "*terroir*" because each winery has different oenological practices, suffers from the action of different soil and climate conditions, as well as, there are different rates of incidence of pathogens that act on the vine and consequently on the formation of the chemical complexity of the grape.

Key words: Real-time RT-PCR. Virus. Vineyard. GLRAV-3. GVA. GVB. Grapes. Viticulture. QGIS. Maps. Georeferencing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VÍRUS (GLRAV-3).....	14
2.2 GRAPEVINE VIRUS A (GVA) E GRAPEVINE VIRUS B (GVB).....	15
2.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	17
2.4 QUANTUM GIS(QGIS).....	20
2.5 TERROIR.....	23
2.6 SISTEMAS DE CONDUÇÃO DA VIDEIRA: LATADA E ESPALDEIRA.....	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 SELEÇÃO DE PLANTAS SINTOMÁTICAS E ASSINTOMÁTICAS.....	27
4.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE PLANTAS COM SÍLICA.....	29
4.3 RT-PCR EM TEMPO REAL.....	29
4.4 CRIAÇÃO DE MAPAS (QGIS).....	32
5 RESULTADOS	35
5.1 MAPAS DESENVOLVIDOS UTILIZANDO O SOFTWARE (QGIS) DEMONSTRANDO A PORCENTAGEM VIRAL CONFIRMADA ATRAVÉS DO RT-PCR EM TEMPO REAL	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura possui uma grande relevância socioeconômica para o Brasil. No ano de 2019, possuía uma área de 75.731 hectares, destes, 62,72% estão no estado do Rio Grande do Sul, onde o mesmo é responsável por cerca de 90% da produção nacional de uvas para processamento (MELLO; MACHADO, 2020). O consumo de vinhos no Brasil em 2019 foi de 332,6 milhões de litros, deste total uma parcela significativa de 114,17 milhões de litros foram direcionados para importação (MELLO; MACHADO, 2020).

Segundo dados recentes apresentados pela União Brasileira de Vitivinicultura (UVIBRA), os resultados da produção brasileira de vinhos no ano de 2021 foram um acréscimo de 83.25% nas exportações de vinho produzido no Brasil, comparado com a produção de 2020. Foram 10,8 milhões de garrafas geradas, cujo destino foi um total de 53 países. Os resultados não são considerados um recorde, porém demonstram que a qualidade do vinho brasileiro é reconhecida tanto no mercado interno, quanto no externo.

Outra perspectiva de grande relevância é que os consumidores de diferentes países são atraídos pelos vinhos brasileiros, devido a diversidade existente nas variedades de uvas, estilos de vinhos e espumantes. Esta diversidade é resultado dos diferentes *terroirs* presentes no Brasil, cuja qualidade tem sido refletida nas conquistas em premiações internacionais, que acabam agregando ainda mais valor aos vinhos brasileiros (UVIBRA, 2022).

A videira faz parte da família *Vitaceae*. As plantas pertencentes a esta família são lianas, tipo cipó ou trepadeiras, de consistência lenhosa ou herbácea, cuja morfologia é reconhecida e caracterizada pela presença de gavinhas opostas às folhas (MULLINS et al., 1992). O gênero *Vitis* é dividido em dois subgêneros: *Muscadínea*, composto por três espécies, e *Euvitis*, compreendendo entre 50 e 60 espécies (GIOVANNINI, 2008).

Destacando o gênero *Vitis*, neste encontram-se todas as videiras de origem europeia, americana e asiática, as quais são utilizadas para o consumo in natura ou destinadas à produção de sucos e vinhos. Dentre estas, as espécies *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.* destacam-se em razão da importância econômica (SOUZA, 2013).

A espécie *Vitis vinifera* é a mais importante dentre as espécies de uvas cultivadas no mundo, para a produção de vinhos e espumantes. No entanto, estas culturas de videiras apresentam redução significativa na produção devido a estresses abióticos e

bióticos. Entre eles, há infecções virais que possuem certa dificuldade de controle, causando um grande impacto na fisiologia da videira, resultando em perdas econômicas significativas nos vinhedos a cada safra (MARTELLI; WALTER, 1998).

Em cada região produtora de vinhos no Brasil o cultivo de videiras possui suas próprias características regionais. Existem variações de climas, solos, altitudes e topografias. Todas estas particularidades irão afetar os ciclos de produção e o viticultor terá que escolher quais os tipos de cultivares serão utilizadas, qual será o porta-enxerto, o clone da variedade, o sistema de condução, a irrigação ideal, a nutrição mineral, o controle de pragas e doenças, a produtividade, e por último a data correta para a colheita das uvas com características sensoriais apropriadas para o consumo in natura, sucos ou vinhos (PEREIRA et al., 2020).

Estes fatores acabam direcionando a matéria-prima (uva) para diferentes nichos do mercado. Pode-se dividir em dois grandes grupos, as uvas voltadas para o consumo in natura e uvas para o processamento e elaboração de suco de uva e vinhos (MELLO; MACHADO, 2020).

As regiões brasileiras que possuem vinícolas, apresentam distintas características, seja em área cultivada ou volume da produção (TONIETTO; FALCADE, 2003).

Quanto aos açúcares redutores que serão utilizados pelas leveduras para ocorrer a fermentação, ganham destaque na uva, a glicose e a frutose. As concentrações destes, sofrem influência da variedade, de qual estágio de maturação o fruto se encontra, e como ocorre o manejo do homem para manter a sanidade do fruto. Os açúcares são provenientes do processo de fotossíntese, sendo que em uvas no início da maturação há o predomínio da glicose, e com o final da maturação, a relação glicose e frutose fica proporcional, fazendo com que o teor dos dois açúcares, se encontre equivalente (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O nível de maturação das bagas é um dos fatores decisivos na determinação da qualidade do produto final esperado, o vinho. É necessário acompanhar diariamente este processo no campo e nos laboratórios especializados, analisando o pH, brix, acidez total, compostos fenólicos, entre outros componentes das uvas, visando obter uma matéria-prima de extrema qualidade, favorável ao processo de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Devido à presença das viroses sobre as videiras, existe um grande impacto

econômico negativo, pela redução no rendimento dos frutos, na qualidade e longevidade dos vinhedos (BASSO et al., 2010).

A propagação de maneira vegetativa das videiras, acaba facilitando a disseminação e resultando no acúmulo de diferentes espécies e estirpes virais em uma mesma planta (MARTELLI, 2012).

Os vírus possuem a capacidade de causar desordem a nível molecular dentro da célula vegetal, afetando de forma negativa, a expressão de genes, o processo da fotossíntese, a atividade enzimática, a respiração celular, o transporte de assimilados e o balanço hormonal das videiras (SAMPOL et al., 2003). Estas alterações metabólicas afetam o desenvolvimento das estruturas da videira, assim como a qualidade e a quantidade dos seus frutos (SAMPOL et al., 2003).

Sabe-se que diversos patógenos podem coexistir na mesma videira, e essas combinações e suas interações confluentes, acabam induzindo nas plantas infectadas uma variedade de sintomas externos e internos (KUNTZMANN et al., 2010).

A incidência de vírus nas principais regiões vitícolas brasileiras apresenta-se com grande frequência. A maioria das ocorrências desses patógenos sobre as videiras ocorre na forma de infecções mistas, sendo este mais um desafio para o controle das doenças resultantes (BASSO et al., 2010).

Existem por volta de 60 espécies virais aptas a causar infecção sobre videiras (BASSO et al., 2014). A manifestação dos sintomas induzidos por vírus pode variar de acordo com as condições edafoclimáticas, estado nutricional da planta, práticas de manejo realizadas pelo homem, o tipo de cultivar hospedeira, o tempo transcorrido desde o momento da infecção e a combinação de espécies e estirpes virais presentes na videira (BASSO et al., 2010a) (NAIDU et al., 2014).

Os métodos de controle existentes para as viroses que afetam videiras, utilizam-se de estratégias focadas na prevenção, onde o material propagativo utilizado (mudas, estacas ou gemas) seja livre destes patógenos. A videira após ser infectada, não é possível tratá-la com métodos tradicionais, como os voltados para outros patógenos, como fungos e bactérias (LIMA, 2009). A obtenção de novas plantas saudáveis, a partir de plantas infectadas, só é possível por meio de limpeza clonal, cultura de tecidos e termoterapia. Porém, o plantio de cultivares e porta-enxertos resistentes a vírus, não se empregam a todas as estirpes virais, uma vez que as cultivares comerciais não possuem

resistência genética à todas as espécies virais existentes, pois estas sofrem uma constante mutação e conseqüentemente possuem uma grande variabilidade genética em razão da falta de mecanismos de reparo do seu RNA (OLIVER et al., 2011) (NASCIMENTO et al., 2015) (HULL, 2004) (KITAJIMA; REZENDE, 2004).

Desta forma, o viticultor acaba necessitando remover a planta, causando perdas na sua parcela de plantação. Essas perdas não são somente em matéria-prima, mas em tempo para um novo cultivo, assim como mão de obra para replantar o que foi retirado (FAJARDO et al., 2004).

Devido a esta grande variabilidade genética apresentada por algumas espécies de vírus em videiras, há um grande esforço no desenvolvimento e seleção de ferramentas moleculares que possuem a capacidade de serem sensíveis, com competência de constituir resultados confiáveis para detecção e identificação de vírus, evitando resultados falsos negativos (JAMES et al., 2006) (PALLAS et al., 2009).

Atualmente com os avanços tecnológicos para confirmação de microrganismos, já existem métodos de detecção dos vírus e agentes subvirais em plantas (PALLAS et al., 2009).

A detecção desses vírus ocorre por diversas técnicas. Os resultados por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) apresentam-se confiáveis somente por um pequeno período do ano, pois esta ferramenta não possui a sensibilidade para detectar reduzidas concentrações de vírus em material lenhoso dormente, especificidade (presença de variantes cujos anticorpos disponíveis não conseguem captar) e por fim a qualidade dos anticorpos disponíveis. Outra técnica molecular utilizada, é a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) com capacidade de superar o ELISA em determinada sensibilidade de detecção sobre alguns vírus em videiras dormentes. Contudo, este método requer uma análise que utiliza a eletroforese em gel para a interpretação do material viral e esta etapa pós-deteção dificulta o seu uso rotineiro em laboratórios (MARBOT et al., 2004).

A RT-PCR em tempo real apresenta-se superior em relação a outras técnicas existentes para detecção de vírus que infectam diversas plantas hospedeiras (JAMES et al., 2006), incluindo as videiras (OSMAN et al., 2007) (PACIFICO et al., 2011).

Isto é confirmado pela sua alta sensibilidade, quando comparado ao ELISA e ao RT-PCR que utiliza a eletroforese em gel. Superando as limitações existentes em outras

técnicas de detecção de vírus, tais como, a distribuição diferencial dos vírus no hospedeiro e as variações nos títulos de vírus ao longo da estação do ano (OSMAN et al., 2007; PALLAS et al., 2009). Estes são alguns fatores que determinam a qualidade do material utilizado para a amplificação viral existente em videiras. Além disso, com o uso das sondas TaqMan pode-se utilizar fluoróforos, que quando excitados em determinado comprimento de onda, permitem a detecção simultânea de mais de uma espécie viral em uma única reação (PALLAS et al., 2009). Estas são as reações multiplex, que além de proporcionarem uma redução no uso de reagentes, diminuem o tempo da análise e reduzem os custos de detecção (PALLAS et al., 2009).

A RT-PCR em tempo real permite a quantificação do patógeno com uma pequena fração de amostra viral obtida de diferentes partes da planta, possui alta precisão, uma reprodutibilidade significativa, e também elimina a necessidade de etapas de processamento pós-PCR que poderiam atrapalhar na obtenção de resultados satisfatórios (OSMAN et al., 2012) (DUBIELA et al., 2013).

O desenvolvimento tecnológico de novas ferramentas para os segmentos científicos utilizando a informática nos permite um amplo acesso à informação cartográfica e geográfica (ALMEIDA, 2011).

Desde os tempos remotos áreas geográficas são objeto de estudo pela humanidade. Com isso fez-se necessário o desenvolvimento tecnológico dos Sistemas de Informação Geográfica-SIG (ALMEIDA, 2011). Este sistema de dados para o georreferenciamento tende a melhorar a disseminação do conhecimento sobre as técnicas de análise espacial de dados que são eficientes no estudo de uma área delimitada, sendo uma ferramenta que possui precisão para tratamento e resolução de problemas em determinada extensão de terra (ALMEIDA, 2011).

Em razão disto, esta ferramenta analítica pode auxiliar na investigação exploratória de dados, assim como, no desenvolvimento de mapas de regiões isoladas que são objetos de estudos experimentais, utilizando como base os Sistemas de Informação Geográfica (ALMEIDA, 2011) (LONGLEY et al., 2013).

A agricultura de precisão é frequentemente definida como a agricultura que explora dados com exata posição geográfica, caracterizando cada parcela de forma desigual, permitindo assim otimizar o rendimento e a qualidade da cultura (FAIRFIELD, 1938) (STOORVOGEL; BOUMA., 2005).

Uma alternativa viável em determinadas situações da presença de contaminação viral, seria a convivência com os vírus no vinhedo, devido a possibilidade da infecção viral resultar em maior ou menor dano em diferentes parcelas da área total, com diferentes reflexos sobre a qualidade e quantidade da produção (BASSO et al., 2014) (NASCIMENTO et al., 2015).

Com o uso de ferramentas de precisão que podem gerir a utilização das parcelas de forma desigual, o viticultor tem a possibilidade de selecionar estas e direcionar no momento da vinificação, para o melhor estilo de vinho que convém, com base nas propriedades organolépticas em que a matéria prima apresenta, agregando valor econômico ao seu cultivo e buscando otimizar seus gastos da melhor forma. (TAYLOR et al., 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VÍRUS (GLRAV-3)

O enrolamento da folha, uma das doenças que mais afetam as videiras (*Vitis spp.*), reduz em alguns casos significativamente a produção e a qualidade das uvas (FAJARDO et al., 2002). Existem nove espécies do Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV), cujo vírus é associado ao floema. No Brasil, já foram relatados os vírus GLRaV-1, -2, -3 e -6, destacando as espécies virais GLRaV-1 e -3, pertencente à família Closteroviridae, do gênero *Ampelovirus*, por serem as mais distribuídas e com importantes impactos econômicos (FAJARDO et al., 2002). Esta virose se manifesta como infecções mistas de diversas estirpes sobre a mesma cultivar hospedeira ou agregada com outros vírus (NAIDU et al., 2014).

A infecção por GLRaV-3 ocorre de maneira sistêmica na videira, sendo geralmente localizada no tecido vascular da planta (floema). Nas variedades de uvas tintas, os sintomas de GLRaV-3 são facilmente identificados, observando-se folhas vermelho-escuras enrolando para baixo com a presença de nervuras de coloração verde (MONTERO et al., 2017).

É uma das doenças que ocorre em todas as principais regiões vinícolas do mundo (MAREE et al., 2013). Pode ser transmissível por enxerto, bem como de uma videira para outra por cochonilhas (Hemiptera: Pseudococcidae) que são os vetores responsáveis pela dispersão (DAANE et al., 2012). As cochonilhas farinhentas são pragas de grande relevância sobre distintas cultivares, tais como, citros, mamoeiro, videira, algodoeiro, cana-de-açúcar entre outras culturas. Isto acaba dificultando o controle de videiras sadias, pois as cochonilhas podem migrar de outras culturas e afetar os vinhedos mais próximos (GALLO et al., 2002).

Destaca-se as espécies de cochonilhas farinhentas *Dysmicoccus brevipes*, *Planococcus citri* e *Pseudococcus viburni*, por serem encontradas em diferentes regiões do Brasil em vinhedos cuja matéria prima é direcionada para a produção de vinhos (BERTIN et al., 2013; MORANDI FILHO et al., 2015). As espécies *Pseudococcus viburni* e *Planococcus ficus* causam danos principalmente em vinhedos do Rio Grande do Sul,

onde a segunda espécie encontra-se restrita ao mesmo (PACHECO DA SILVA et al., 2016).

É possível perceber visualmente o enrolamento das bordas da folha para baixo nas cultivares europeias de videira (*Vitis vinifera L.*), no final do seu ciclo vegetativo. Os sintomas são apresentados desde as folhas da base dos ramos até as demais folhas, devido a progressão da infecção. Com o aumento gradual da infecção a videira começa a apresentar o definhamento das plantas (FAJARDO et al., 2003).

Dessa forma, além de um esforço para a eliminação do vetor, os proprietários de vinhedos em países produtores, em casos mais críticos, buscam remover as videiras infectadas como forma de controlar o GLRaV-3 (BELL, 2015). Ocasionalmente um grande impacto econômico, pois as novas plantas precisam de um tempo para que possam ter o seu desenvolvimento morfológico e sua adaptação fisiológica para uma produção almejada (FAJARDO et al., 2003).

Observa-se diversas mudanças fisiológicas e de desenvolvimento em frutos de videiras infectadas em comparação com frutos de videiras não infectadas. Muitos dos genes que estão ligados à biossíntese de antocianinas e ao metabolismo do açúcar foram reprimidos em bagas de videiras infectadas em comparação com frutas não infectadas (VEGA et al., 2011). Nas plantas com alta taxa de infecção, observa-se nos cachos uma maturação irregular e atrasada formação dos frutos (FAJARDO et al., 2002).

A presença do RNA do GLRaV-3 em bagas surge através das partículas virais provenientes da vasculatura durante o desenvolvimento da fruta, e dessa forma a biossíntese dos metabólitos primários e secundários são afetados durante o amadurecimento dos frutos (VEGA et al., 2011).

2.2 GRAPEVINE VIRUS A (GVA) E GRAPEVINE VIRUS B (GVB)

A produção de uvas saudáveis é afetada quando pelo menos um vírus está agindo sobre a videira, no entanto, as infecções mistas resultam em efeitos mais devastadores, sendo possível observar uma queda de produção e de qualidade, ambos em uma maior taxa (CRETAZZO et al., 2010).

Entre as viroses já descritas, há um destaque de alguns grupos por seu impacto nas grandes plantações de videiras, são doenças que apresentam sintomas morfológicos

visuais, provenientes de infecções simples ou múltiplas espécies virais sobre a mesma planta (BASSO et al., 2014).

No Brasil, Argentina e Chile, o maior impacto sobre as videiras, são causados pelos agentes virais, cujo dano estrutural é o enrolamento da folha e canelura do tronco, neste último, a casca penetra no tronco prejudicando a formação dos vasos condutores da seiva, resultando na restrição dos tecidos floemáticos (FIORE et al., 2008) (RADAELLI et al., 2009) (BASSO et al., 2010b) (FIORE et al., 2011).

No complexo do lenho rugoso, a gama de sintomas varia bastante, devido a existência de diferentes espécies virais, genótipos do enxerto e porta-enxerto envolvidos e todas estas informações somadas às características da região, resultam em uma distinta taxa de infecção. Desta forma, o complexo do lenho rugoso apresenta-se como uma virose complexa (BASSO et al., 2014).

Os dois principais responsáveis por este complexo são o Grapevine virus A (GVA), associado inicialmente com a síndrome da acanaladura do lenho de Kober (Kober stem grooving) que correspondem ao local onde a casca penetra no tronco prejudicando a formação dos vasos condutores da seiva (GARAU et al., 1994) e o Grapevine virus B (GVB), associado a síndrome do intumescimento dos ramos (Corky bark) (BONAVIA et al., 1996) (MALIOGKA et al., 2015).

O agente viral responsável pelo intumescimento dos ramos da videira, denomina-se Grapevine virus B (GVB), cuja família é Betaflexiviridae, gênero *Vitivirus*, e o vetor de transmissão são as cochonilhas (FAJARDO, 2004) (BASSO et al., 2014).

Com a ocorrência do intumescimento dos ramos, ocorre a deformação nos ramos (partes responsáveis pela formação dos cachos) da videira e engrossamento na região da enxertia. Já no sintoma na lâmina foliar, observa-se uma descoloração, inclusive das nervuras do limbo foliar, evoluindo para o enrolamento das bordas das folhas para baixo (MALIOGKA et al., 2015).

Denominada acanaladura do lenho de Kober (“Kober stem grooving”), causada por Grapevine virus A (GVA), pertencente à família Betaflexiviridae e ao gênero *Vitivirus* (FAJARDO et al., 2004).

O agente viral GVA possui a videira como única hospedeira natural, e encontra-se restrito ao floema da videira. Sua sustentação ocorre essencialmente durante a multiplicação vegetativa, por estaquia ou união de tecidos, sendo naturalmente

transmitido por espécies de cochonilhas farinhentas da família Pseudococcidae (MARTELLI et al., 1997).

O complexo do lenho rugoso associado à doença do enrolamento (Grapevine leafroll) estabelece uma grande ameaça e dano ao crescimento e estabelecimento de vinhas em todas as regiões do mundo (CREDI; GIUNCHEDI, 1996).

2.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Diversas são as técnicas moleculares existentes para a identificação de microrganismos, estas análises são baseadas em investigações genotípicas de moléculas como DNA e RNA (KRALIK; RICCHI, 2017). Os métodos moleculares revolucionaram a possibilidade de detecção e caracterização de microrganismos em uma ampla gama de campos de diagnóstico, incluindo as áreas da virologia, micologia, parasitologia, microbiologia (KRALIK; RICCHI, 2017).

Dentre os diversos métodos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem gerado resultados positivos, permitindo avanços científicos rápidos. A PCR demonstra-se como uma técnica excelente para a detecção rápida e precisa de patógenos, incluindo aqueles cuja cultura em laboratório ainda é difícil ou inviável (KRALIK; RICCHI, 2017).

A técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida na década de 1980 pelo bioquímico Kary Banks Mullis, o que resultou no Prêmio Nobel em 1993 (BRUCE, 1999). Esta tecnologia reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA de uma célula, gerando grande impacto na pesquisa biológica a nível molecular (SPOLIDORIO, 2005).

A metodologia necessita de um prévio conhecimento, pelo menos de forma parcial, do DNA alvo de organismo experimentado. A PCR permite a síntese de fragmentos de DNA específicos por meio da enzima DNA-polimerase termoestável, resultando na replicação do material genético celular. Essa enzima sintetiza uma sequência complementar ao DNA de interesse na replicação (YANG, 2004).

A reação necessita de quatro desoxinucleotídeos (dNTPs), as sequências de hibridização (primers), uma DNA polimerase termoestável, o DNA molde que é previamente obtido da amostra experimentada (células animais, ou vegetais), cloreto de

magnésio ($MgCl_2$) que age como um cofator para ocorrer a ação da Taq DNA polimerase, um tampão que controla o pH e água ultrapura, estes, otimizam as condições de reação (SAIKI et al., 1988) (MULLIS, 1987) (MULLIS, 1990).

Em suma, o processo do PCR ocorre basicamente em três momentos. A cada ciclo o equipamento trabalha com diferentes temperaturas em tempos diferentes, para que todo o processo da amplificação ocorra. No primeiro momento, a dupla fita de DNA é desnaturada (aberta) pela temperatura elevada, logo, cada primer (oligonucleotídeos iniciadores) senso e anti-senso, se liga às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada (anelamento) a uma das fitas simples do DNA e após isso, ocorre o processo de extensão e polimerização da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da enzima Taq DNA polimerase (MULLIS, 1990).

Diversos ciclos ocorrem para que a quantidade de material existente seja replicada até alcançar uma quantidade grande de cópias (ERLICH, 1995). Os primers são utilizados de forma a limitar a sequência a ser replicada. Desta forma, o resultado é a amplificação em uma determinada sequência de DNA com milhares de cópias, que servirão para análise qualitativa, ou seja, haverá a presença ou a ausência do material genético experimentado (MULLIS, 1990; YANG, 2004).

Para a detecção de um agente viral, deve-se levar em conta que os genomas de diversos vírus são compostos de RNA (Ácido ribonucleico) ao invés de DNA (Ácido desoxirribonucleico). Dessa forma, primeiramente deve ser feita a transcrição reversa, na qual ocorre a transformação do RNA em cDNA (DNA complementar), para depois ocorrer a amplificação por PCR. Esta etapa é realizada utilizando a enzima transcriptase reversa (YANG, 2004), cuja função enzimática é transformar o RNA em um DNA complementar que servirá de alvo para a PCR convencional. Esta reação é denominada RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) (MACKAY, 2002).

É de suma importância que o material de ácido nucléico esteja livre de impurezas como proteínas, lipídeos, outros ácidos nucléicos e reagentes de extração. Para que todo o processo obtenha êxito (INNIS; GELFAND, 1990). Esta etapa ocorre através dos protocolos de extração e purificação. Apesar da vasta aplicabilidade da técnica de PCR, não existe um protocolo único que seja apropriado para todas as situações de replicação, sendo necessário a realização da otimização para cada nova aplicação do PCR (INNIS; GELFAND, 1990).

Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo sequenciados, há disponível catálogos de genes que podem ser explorados para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em PCR (YANG, 2004). A PCR em Tempo Real se mostra como um significativo avanço biotecnológico e vem conquistando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar, além de resultados qualitativos, resultados quantitativos. Esta técnica permite a quantificação de ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação (DEEPAK et al., 2007).

O sistema baseia-se no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento da replicação do material. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um corante quencher (silenciador) na extremidade 3'. Os fluoróforos (repórter) estão inseridos na sonda (Taqman), existe nesta, o repórter e o quencher (silenciador). O quencher está em equilíbrio com o repórter (fluoróforo) energeticamente, no momento que a Taq DNA polimerase (enzima) inicia o processo de extensão do RNA, ele separa ambas moléculas (o repórter e o quencher) nesse momento há a captação do sinal por parte da RT-PCR (EIRAS, 1998).

O CT ("Cycle Threshold") é o ponto em que se atinge o valor limite de fluorescência do fluoróforo repórter, separando os sinais de amplificação específica do "ruído de fundo" do sistema, ou seja, das amostras que possuem um valor menor que o limiar (Threshold).

A emissão de fluorescência aumenta na proporção do aumento da quantidade de produtos da PCR. Dessa forma, os valores de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. É importante ressaltar que as amostras que necessitam de uma quantidade de ciclos menor até chegar ao limiar de fluorescência estabelecido, demonstram uma quantidade maior de material de vírus presente (NOVAIS, 2004)

O uso da sonda é dirigido especificamente a uma região da sequência que se deseja amplificar, à medida que vai ocorrendo a amplificação, a sonda é degradada e há a liberação de um fluorocromo. Estas são moléculas que absorvem luz em comprimento de onda baixo e elevada energia e emitem luz em um comprimento de onda maior, de menor energia, este fenômeno é conhecido como fluorescência (MORTARINO, 2004; YANG, 2004).

A análise da emissão de luz ocorre através de um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal, com isso, será formado um gráfico da absorção obtida após cada ciclo de replicação do material na PCR (MORTARINO, 2004; YANG, 2004).

A razão da utilização da PCR em tempo real é referente a eliminação da etapa exaustiva no momento da pós-amplificação (onde deve ser preparado o gel para a eletroforese). Inúmeras são as vantagens da PCR em tempo real em relação a PCR convencional, fatores como a velocidade, a reprodutibilidade e capacidade de quantificação ganham destaque (SANTOS, 2004).

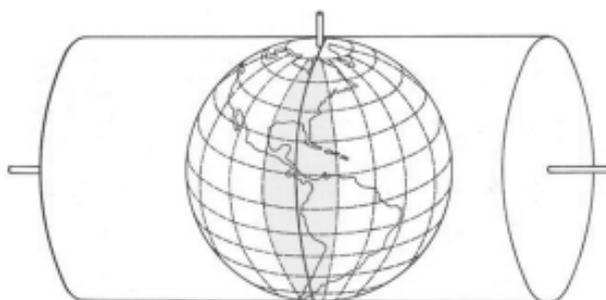
2.4 QUANTUM GIS (QGIS)

A Geodésia corresponde à ciência que visa determinar a forma, as dimensões terrestres e os parâmetros definidores do campo da gravidade. Esta ciência apresenta grande relevância para o posicionamento preciso de coordenadas (planimétrico), referenciamento de nível (altitude), assim como o levantamento de informações gravimétricas terrestres (aceleração da gravidade) (GEMAEL, 1994).

Os sistemas geodésicos globais, são convenientes às modernas técnicas de posicionamento, possibilitando levantamentos globais mais próximos da realidade. No Brasil utiliza-se o Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas-SIRGAS 2000.

A Projeção Universal Transversa de Mercator (UTM) é um sistema de projeção cartográfica e resulta numa transformação da projeção de Mercator, onde o cilindro secante é posto em posição transversa (TEIXEIRA, 2010), como segue na figura 1.

Figura 1 – Representação do sistema de projeção UTM: Cilindro secante na posição transversa

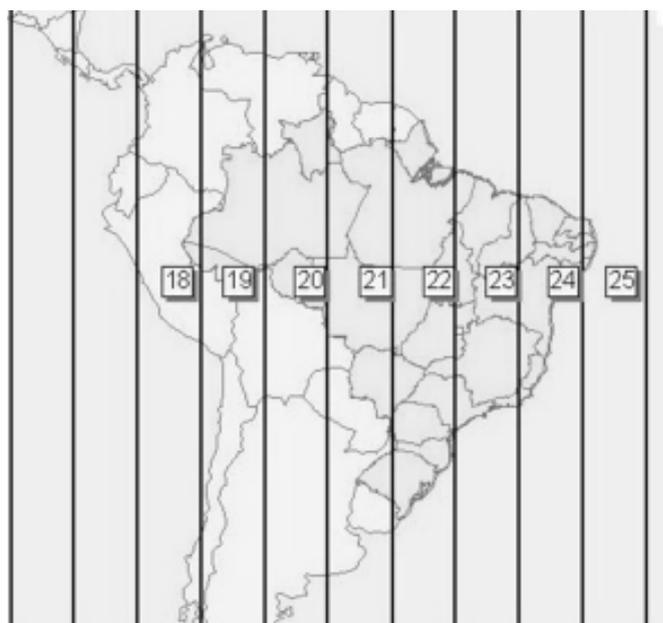


Fonte: TEIXEIRA, 2010.

Este sistema é adotado pela Diretoria de Serviço Geográfico do Exército (DSG) e pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) como sendo o padrão utilizado para o mapeamento sistemático brasileiro.

No Brasil existem oito fusos UTM, estes ocorrem de 6 em 6 graus, de forma que cobrem todo o território nacional, como segue na figura 2.

Figura 2 – Fusos UTM existentes no Brasil



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2010.

A cada fuso, é associado um sistema cartesiano métrico de referência, onde é atribuído à origem do sistema (ponto da interseção da linha do Equador com o meridiano central) as coordenadas no valor de 500.000 metros para contagem de coordenadas ao longo do Equador, e 10.000.000 metros ou 0 metros, para contagem de coordenadas ao longo do meridiano central, para os hemisférios sul e norte respectivamente. Estes valores eliminam a ocorrência de valores negativos de coordenadas (FURTADO et al., 2012).

O uso de mapas para detectar e monitorar os estresses bióticos a abióticos em culturas agrícolas podem apresentar certa redução de custo, frente às diferentes metodologias que são utilizadas para operar em áreas extensas (FLENNIKEN; STUGLIK; IANNONE., 2020). O primeiro Sistema de Informação Geográfica (SIG) surgiu na década de 1960 e a expressão Geographic Information System ao longo da década de 1970, o

objetivo do seu desenvolvimento primeiramente era por agentes governamentais devido a necessidade urgente de descrever grandes áreas, revelando em totalidade os recursos naturais presentes, que antes apresentavam-se com tamanha complexidade, e por fim utilizar estes dados para um inventário sobre os recursos presentes (CÂMARA; DAVIS; MONTEIRO., 2001).

Os estudos utilizando o SIG tiveram progresso juntamente da cartografia. Nas décadas seguintes houve uma evolução sucessiva dos SIGs, em razão dos progressos na área computacional (CÂMARA; DAVIS; MONTEIRO., 2001). Para o desenvolvimento de SIG, é necessária uma base de dados georreferenciados, cujos os dados associam-se a um sistema de coordenadas de latitude e longitude definidas (FITZ, 2008).

O SIG utiliza ferramentas através de uma conexão com a internet, de forma a reunir informações de sistemas de navegação por satélite (GNSS-Global Navigation Satellite System), como por exemplo, o Google Maps, o Sistema de Posicionamento Global (GPS), Google Earth, entre outras bases disponíveis. O SIG apresenta-se como um banco de dados, no qual o experimentador manipula informações em um espaço delimitado, através da inserção de pontos, linhas ou áreas (MANGHI; CAVALLINI; NEVES., 2011).

No Brasil, o geoprocessamento surgiu na década de 1980, trazendo consigo avanços em métodos e técnicas voltadas para a compreensão e o manejo de áreas delimitadas (CÂMARA; DAVIS; MONTEIRO., 2001). O geoprocessamento pode ser considerado uma disciplina que faz uso de metodologias matemáticas e computacionais, objetivando tratar diferentes informações geográficas (SILVA, 2012).

Surgem as pesquisas que operam sobre o processamento digital provenientes de satélites e SIGs, orientando diversos campos de investigação, como por exemplo, tratamento ambiental, análises e planejamentos de vias de transporte, seleção e manejo diferenciado para uma extensão de terra limitada, observação da quantidade de recursos naturais disponível, de maneira que incorporando todos estes dados, de diferentes fontes é possível criar um banco de dados georreferenciados (CÂMARA; DAVIS; MONTEIRO., 2001) (SILVA, 2012).

O Quantum GIS (QGIS) é um software que permite trabalhar sobre dados espaciais, com a possibilidade de uma visualização, seleção e edição dos dados de interesse, desenvolvendo novos mapas. Apresenta-se como um software gratuito, com

interface gráfica simples, de código aberto, escrito em C++1 e Python2 (ALMEIDA, 2011).

Sua demanda por capacidade de processamento é mínima, e as suas funcionalidades evoluem constantemente, por meio de atualizações das suas funções nativas e de novos complementos que os próprios usuários criam e compartilham em forma de “*plugins*”, o que torna o programa ideal para edição, análise, controle e visualização de dados georreferenciados concebidos em formato de mapa (FLENNIKEN; STUGLIK; IANNONE., 2020) (SANDHYA, 2020). Estas funções, quando somadas, possuem a capacidade de gerir extensões de terras, seja no processamento dos dados espaciais, ou na análise dos resultados com maior precisão (GOODCHILD; HAINING; WISE, 1992).

2.5 TERROIR

A palavra “*terroir*” demonstra as características que um viticultor espera da sua matéria-prima, como qualidade, quantidade e identidade única. E isso ocorre através da origem geográfica das videiras cultivadas. O conceito de “*terroir*” é frequentemente utilizado para explicar a hierarquia entre os vinhos de alta qualidade (SEGUIN, 1986).

Em suma, cada região possui o seu, trata-se de um ecossistema interativo (macroambiente e microambiente), em um determinado lugar do mundo, que inclui a atuação do clima (posição das plantas em relação ao sol, ventos, amplitude térmica, pluviosidade, horas diurnas e noturnas), características do solo (tipo de solo, umidade disponível, quantidade de matéria orgânica), a variedade utilizada e o manejo do homem sobre os vinhedos para controlar todos estes fatores bióticos e abióticos (SEGUIN, 1986) (DOWNEY, 2006) (PEREIRA; GUERRA; MANFROI, 2009) (PEREIRA et al., 2020).

A qualidade excepcional da uva para a produção de vinho tinto é obtida devido a um fator redução do vigor da videira e o tamanho da baga e aumento dos fenólicos presentes na casca da uva. Nos *terroirs* com grande reconhecimento, devido a alta qualidade dos frutos, esse fator limitante é o déficit hídrico moderado, seja porque o clima se apresenta como seco (baixa precipitação) ou porque a retenção de água no solo apresenta-se como baixa. A capacidade de retenção de água no solo pode ser baixa devido ao alto conteúdo de seixos ou à redução da profundidade do solo. Em razão disso, os solos para viticultura com grande potencial são pedregosos ou rasos (SEGUIN, 1986).

2.6 SISTEMAS DE CONDUÇÃO DA VIDEIRA: LATADA E ESPALDEIRA

O momento no qual inicia-se o crescimento vegetativo é possível visualizar o crescimento e desenvolvimento dos órgãos fotossinteticamente ativos (as folhas, os ramos jovens e bagas verdes), estes são dependentes da interação entre o genótipo (constituição genética) e as condições ambientais, resultando em um fenótipo, cuja expressão é típica da região onde encontra-se o vinhedo (CHAVES, 1986).

Com os experimentos relacionados às modificações nas estruturas do dossel vegetativo, é possível observar a elevada interferência, principalmente na taxa fotossintética das videiras, afetando de maneira direta o comportamento vegetativo e produtivo da videira, como também os diversos parâmetros químicos que atuam na qualidade dos frutos produzidos (CARBONNEAU, 1991).

As características da uva madura têm a sua origem no metabolismo fotossintético. Desta forma, a taxa da atividade fotossintética total de um parreiral numa estação determina o sucesso econômico dos produtos obtidos dessa espécie frutífera (KLIEWER, 1990). Para o cultivo de videiras é necessária uma estrutura de sustentação. A condução das vinhas por esta, visa domesticá-la, somada ao emprego de algumas práticas culturais que definem a arquitetura do vinhedo, controlando o ataque de patógenos, a poda e a colheita da uva (WINKLER, 1969).

A videira para ser cultivada de forma satisfatória em termos de quantidade e qualidade, necessita de uma forma de suporte. Devido a sua arquitetura de condução da sua porção vegetativa e das partes perenes. Dessa forma, utiliza-se um sistema de condução da videira, para uma distribuição favorável do seu dossel, do tronco e dos seus braços. (MIELE; MANDELLI, 2015).

O sistema de condução de latada distribui o dossel vegetativo de forma horizontal, esta forma de cultivo resulta no desenvolvimento de videiras com elevado vigor, para a produção em grande quantidade de cachos de uva. Em função da quantidade elevada de matéria prima, resulta em uma rentabilidade alta para o pequeno produtor. Porém, os custos de implementação e manutenção são muito elevados, o sistema de condução necessita ter uma boa estrutura para aguentar o vigor excessivo, assim como o impacto

dos fatores abióticos da região (MIELE; MANDELLI, 2015).

As videiras conduzidas em espaldeira têm dossel vegetativo na posição vertical, os frutos situam-se numa área do dossel vegetativo (parte inferior da planta) e as extremidades dos ramos em outra (parte superior), o que facilita as operações de manejo do dossel vegetativo. Referente ao custo de implantação, este apresenta-se menor em relação ao do sistema latada. Existe uma perda da produção em quantidade, porém a qualidade que os frutos apresentam, é elevada comparado ao sistema de condução latada (MIELE; MANDELLI, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial da ferramenta RT-PCR em tempo real juntamente do QGIS para a vitivinicultura de precisão. Avaliar e comparar a taxa de infecção viral de três vírus, em cada vinícola estudada da safra em questão e desenvolver mapas com georreferenciamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleção de videiras sintomáticas e assintomáticas, para estudo dos vírus Grapevine leafroll-associated vírus (GLRaV-3), Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB);
- Indexação viral por RT-PCR em tempo real (RT-PCR TaqMan);
- Criação de mapas das áreas estudadas utilizando o Quantum GIS (QGIS);

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DE PLANTAS SINTOMÁTICAS E ASSINTOMÁTICAS

Através do prévio conhecimento literário, considerou-se os sintomas causados por esses patógenos que são visíveis no limbo foliar, para determinar valores preliminares de quais eram as videiras sintomáticas e quais eram assintomáticas.

Para haver a representação de toda a área experimentada, o material foi obtido de forma aleatória. Foram efetuadas coletas em 3 vinhedos comerciais e a variedade estudada foi a Cabernet Sauvignon, em cada vinhedo recolheu-se 70 amostras.

Coletou-se 40 amostras de plantas com valores preliminares assintomáticos para os vírus experimentados e 30 amostras de plantas sintomáticas, totalizando 210 amostras, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Material foliar coletado

Vinícola	Coordenadas	Variedade	Quantidade de amostras	Vírus estudados
A	29°10'51.1"S 51°33'23.3"W	Cabernet sauvignon	70	GLRaV-3 = Grapevine leafroll-associated virus; GVA = Grapevine virus A; GVB = Grapevine vírus B.
B	29°06'52.6"S 51°26'47.1"W	Cabernet sauvignon	70	
C	29°08'36.5"S 51°29'35.0"W	Cabernet sauvignon	70	

Fonte: Autor, 2022.

Para conceber o valor preliminar de sintomáticas, observou-se o enrolamento da folha para baixo e o avermelhamento entre as nervuras do limbo foliar, como demonstra a imagem 1.

Imagem 1 – Videira sintomática

Fonte: Autor, 2022.

Para a representação de videiras com o valor de assintomática, observou-se o limbo foliar sem mudanças nas suas características morfológicas, conforme demonstra a imagem 2.

Imagem 2 – Videira assintomática

Fonte: Autor, 2022.

Recolheu-se a quantidade de 4 pecíolos com suas respectivas folhas, de cada planta analisada. Este material foi armazenado em sacos plásticos, numerados e direcionados para geladeira em uma temperatura de -20°C, sendo armazenado até o dia seguinte para o início do processo de extração de RNA no laboratório de virologia da EMBRAPA-Uva e Vinho.

4.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS TOTAIS DE PLANTAS COM SÍLICA

Para extração de ácidos nucléicos totais de plantas com sílica, cortou-se os pecíolos e pesou-se 1 g. O material foi triturado com nitrogênio no almofariz, inseriu-se 3 mL de tampão de extração (CH₅N₃HCl 4 M, NaOAc 0,2 M, EDTA 25 mM, KOAc 1 M e PVP- 40 2,5%). Logo 500 µl do material da estrutura triturada foi então transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL no qual foi adicionado 100 µl de SDS 10%.

A mistura foi incubada a 70°C com agitação intermitente por 10 min, colocada em gelo por 5 min, e então centrifugado a 13.000 rpm por 10 min. A quantia de 300 µl do sobrenadante foi então transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 150 µl de EtOH absoluto, 300 µl de NaI 6 M e 25 µl de sílica ressuspendida. Logo, incubou-se à temperatura ambiente por 10 min com agitação intermitente e centrifugou-se a 6.000 rpm por 1 min.

O sedimento foi ressuspendido em 500 µl de tampão de lavagem (Tris-HCl 10,0 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 50,0 mM, etanol 50%), depois foi vortexado para ressuspende o pellet e centrifugado a 6.000 rpm por 1 min. A etapa de lavagem foi repetida uma vez e o sedimento foi deixado para secar por 30 minutos a 50°C. O pellet foi ressuspendido em 100 µl de H₂O autoclavada através da agitação em vortex. A mistura foi incubada a 70°C por 4 min, centrifugada a 13.000 rpm por 3 min, a quantia de 80 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C (CATARINO et al., 2015) (ROTT; JELKMANN., 2001).

4.3 RT-PCR EM TEMPO REAL

Fez-se a replicação do material genético obtido pela extração de ácidos nucléicos

totais de plantas com sílica. Os dados foram obtidos e mostrados através de um gráfico.

Objetivou-se observar a presença e a ausência do RNA dos vírus selecionados com base nas amostras coletadas de cada videira. Foi utilizada uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um corante repórter fluorescente (6-FAM ou VIC) na extremidade 5' e um corante quencher (silenciador) na extremidade 3'.

Na tabela 2 segue as informações do material utilizado no RT-PCR.

Tabela 2- Conjuntos de primers e sondas utilizados no RT-PCR em tempo real para detecção dos vírus.

Vírus	Oligonucleotídeo e sonda	Fluoróforo/quencher	Orientação	Gene alvo	Sequência de nucleotídeos	Tamanho (pb)	Referência
GVA	GVA-77 F1	-----	F	CP	CGACCGAAATATGTACCTGAATACTC	115	Osman & Rowhani (2008).
	GVA-77 F2	-----	F		CGACCGAACTATGTACCTGAATACTC		
	GVA-192 R1	-----	R		TTTGCTAGCTTTAGGACCTACTATATCTACCT		
	GVA-192 R2	-----	R		CTTGCTAGCCTTAGGTCTACTATATCTACCT		
	GVA-104 P	VIC / TAMRA	P		CTTCGGGTACATCGCCTTGGTCGG		
GVB	GVB-92 F1	-----	F	CP	CTAGGAGTGCGGCTAAACGAA	110	
	GVB-92 F2	-----	F		GGAGTGCGGCCAAACGA		
	GVB-92 F3	-----	F		CAAGGAGTGCGGCTAAACGAA		
	GVB-202 R1	-----	R		CCTTAACCTCGTCCTGTGATATGGT		
	GVB-202 R2	-----	R		CCTTCACCTCATCYTGGGATCGTGT		
	GVB-119 P1	6-FAM / TAMRA	P		CTCGTTATGGTCGCTGTACTGTTGTGGTAG		
	GVB-119 P2	6-FAM / TAMRA	P		ACCGTTACGGCCGTTGTTACTGTTGTGGTAG		
GLRaV-3	GLRaV-3 56 F	-----	F	HSP70	AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA	254	Osman & Rowhani (2006); Osman et al. (2007).
	GLRaV-3 285 R	-----	R		GTATTGGACTACCTTTCGGGAAAAT		
	GLRaV-3 181 P	VIC / TAMRA	P		CAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACA		

Obs.: F = oligonucleotídeo "forward" (viral); R = oligonucleotídeo "reverse" (complementar); P = "probe" (sonda com fluoróforo); CP (proteína capsidial), HSP70 (proteína de choque térmico 70).

Fonte: Adaptado de DUBIELA, 2013.

Utilizou-se os isolados virais das plantas-controle da casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS). Videiras comprovadamente sadias foram utilizadas como controle negativo. Assim como, para o controle positivo das reações, utilizou-se amostra de RNA extraído de videiras com infecção viral, mantidas na mesma casa de vegetação. Estas amostras encontram-se mantidas sob condições controladas e foram previamente indexadas. Desta forma, os vírus que ocasionam a infecção são

conhecidos.

Indexou-se as amostras em ensaios simplex (detecção ocorreu de forma individual) e duplex (marcou-se as sondas utilizando o fluoróforo 6-FAM ou VIC presentes na extremidade 5'), e utilizando o quencher TAMRA (fluoróforo bloqueador) na extremidade 3', objetivando-se a detecção ao mesmo tempo de dois vírus na amostra testada. Conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3- Testes efetuados com RT-PCR em tempo real

Placa de 96 poços	Vinícola	Ensaio
1	A	Simplex GLRaV-3 (VIC)
2	A	Duplex GVA (VIC) / GVB (FAM)
3	B	Simplex GLRaV-3 (VIC)
4	B	Duplex GVA (VIC) / GVB (FAM)
5	C	Simplex GLRaV-3 (VIC)
6	C	Duplex GVA (VIC) / GVB (FAM)

Fonte: Autor, 2022.

As reações de RT-PCR em tempo real em um único tubo (“One Step”) foram realizadas em placas de 96 poços usando o kit TaqMan Master Mix One-Step RT-PCR (Applied Biosystems) como demonstrado a seguir: 6,1 µL do One-Step RT-PCR Master Mix (contendo a polimerase de DNA AmpliTaq Gold, dNTPs, um ROX de referência passivo e buffer otimizado); 0,6 µL da mistura de iniciadores e sonda (iniciador 415 nM e sonda 85 nM); 0,3 µL de transcriptase reversa MuLV e inibidor de RNase, 2 µL de água e 3 µL de RNA total previamente extraído para um volume final de 12 µL (DUBIELA et al., 2013).

Para as reações de RT-PCR duplex em tempo real, os volumes dos reagentes foi ajustado da seguinte forma: de acordo com as duas condições realizadas: (1) Duplex com RNA total da amostra controle infectada pelo vírus: 8,1 µL do reagente Master Mix; 0,8 µL de cada mistura de primer e sonda de vírus 1 e 2; 0,4 µL MuLV RT e inibidor de RNase; 3 µL de cada RNA total de controles para um volume final de 16,1 µL. (2) Duplex com RNA total de amostras com status de infecção desconhecida: 6,1 µL do reagente Master Mix; 0,6 µL de cada mistura de primer e sonda de vírus 1 e 2; 0,3 µL MuLV RT e inibidor de RNase e 3 µL de RNA total para um volume final de 12 µL.

Na primeira situação citada acima, utilizou-se dois acessos de videira infectados

com vírus (controles positivos) em uma única reação. Na segunda situação, as videiras sintomáticas e assintomáticas, com estado sanitário desconhecido, foram testadas em reações únicas. Em ambas as situações, as detecções duplas envolveram combinações pareadas de reagentes para GVA, (sonda VIC) com reagentes para vírus GVB (sonda 6-FAM). Utilizou-se um termociclador com sistema voltado para a emissão e estímulo da fluorescência (equipamento: StepOnePlus Real-time PCR System Applied Biosystems da seguinte forma: 45 ° C por 35 min (para transcrição reversa), 95 ° C por 10 min (para ativar a AmpliTaq Gold), seguido por 40 ciclos a 95 ° C por 15 s (desnaturação) e 60 ° C por 1 min (pareamento e extensão).

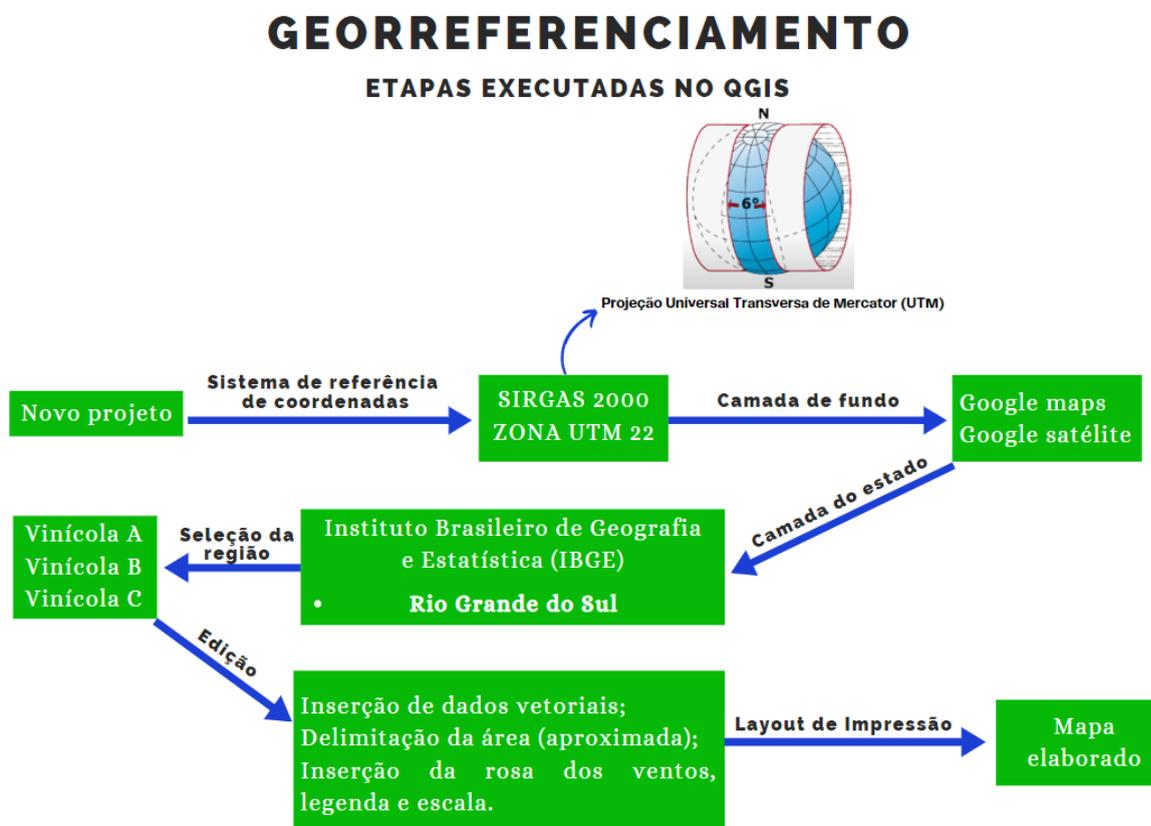
Os dados da reação foram gerados e analisados através de gráficos, utilizando o software StepOne Software v2.3(Applied Biosystems) através da determinação do C_T ("threshold cycles"), correspondente ao ciclo limiar.

Os valores de C_T abaixo do valor de 35 foram considerados como resultados positivos e confiáveis (OSMAN et al., 2008).

4.4 CRIAÇÃO DE MAPAS (QGIS)

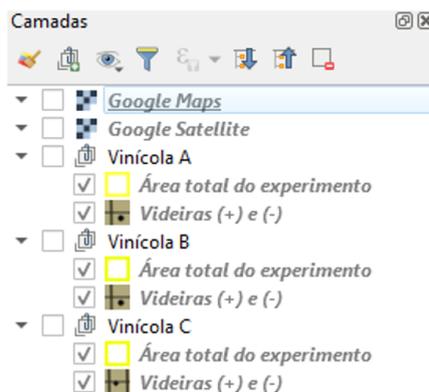
Utilizou-se o software Quantum GIS, que apresenta-se como um Sistema de Informações Geográficas (SIG) de código aberto. O software possibilitou a edição, visualização, análise e a produção de informações geográficas voltadas para exploração e a visualização dos metadados da região de interesse. Desenvolveu-se um produto de geoinformação, como forma de representação da área explorada, as etapas seguidas são demonstradas no fluxograma da figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do desenvolvimento de mapas



Fonte: Autor, 2022.

Visou-se comunicar informações sobre os aspectos da paisagem e localização exata de cada vinícola estudada. Utilizou-se ferramentas “*plugins*” disponíveis no QGIS para edição de dados geoespaciais. Os mapas foram elaborados utilizando imagens do google maps, satélite e imagens do estado do Rio Grande do Sul, com suas respectivas cidades, esta última encontra-se disponível em banco de dados online no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estas imagens foram sobrepostas formando camadas que completaram-se ao longo do processo de edição do mapa, conforme mostra a figura 4.

Figura 4 – Edição de camadas no QGIS

Fonte: Autor, 2022.

Criou-se um polígono através de pontos em volta de cada área estudada para delimitar e observar o tamanho aproximado em metros quadrados, inseriu-se a rosa dos ventos (importante para a navegação geográfica correta), desenvolveu-se uma legenda compatível com o mapa gerado, a fim de demonstrar a escala para comparação dos dados de forma prática no campo, bem como representar as videiras estudadas. Para esta representação, utilizou-se de dados vetoriais (pontos) que foram inseridos na área delimitada, gerando uma informação visual de fácil compreensão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MAPAS DESENVOLVIDOS UTILIZANDO O SOFTWARE (QGIS) DEMONSTRANDO A PORCENTAGEM VIRAL CONFIRMADA ATRAVÉS DO RT-PCR EM TEMPO REAL.

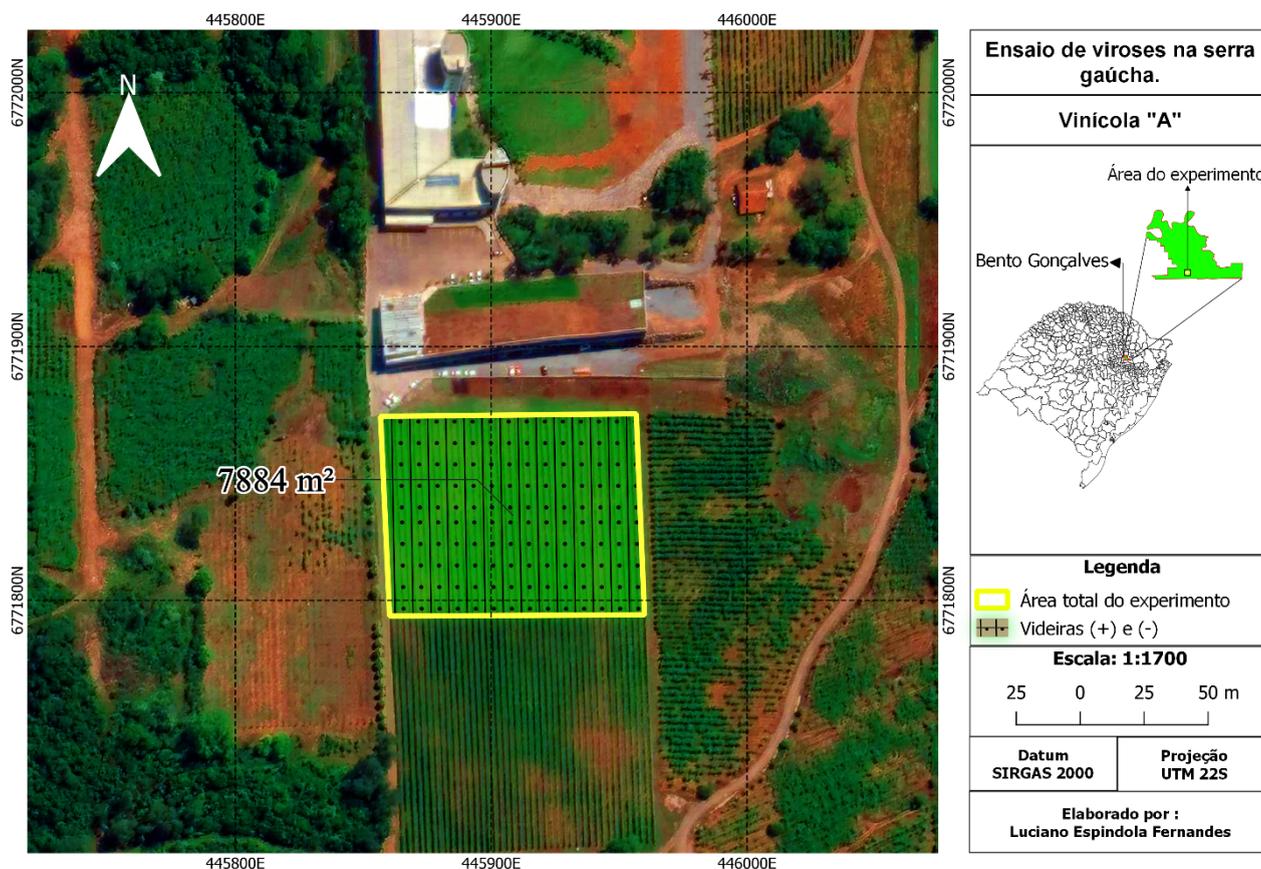
Os mapas gerados podem ser valiosos em muitos contextos. A comunidade científica da vitivinicultura pode criar um banco de dados de mapeamento de áreas, para ter a clareza da evolução da taxa viral sobre diferentes parcelas em distintos vinhedos.

Estes mapas juntamente do rt-pcr em tempo real podem servir como ferramenta de predição da qualidade da matéria-prima ofertada por tais plantas. Os viticultores podem gerir diferentes parcelas de um bloco de cultivo de uvas, conforme as taxas de infecção viral, de forma desigual, observando a qualidade da matéria prima resultante da safra em questão. Da mesma forma, o vitivinicultor pode usar essas informações para tomar decisões sobre qual deve ser o melhor produto a ser elaborado.

O presente estudo apontou o software Quantum Gis como eficaz e satisfatório, estando de acordo com o trabalho desenvolvido por CHEN et al (2008), que comparou 31 softwares para estudos de dados geoespaciais, e elegeu o QGIS como o melhor.

Conclui-se que este, apresenta uma interface gráfica de fácil manipulação, diversas ferramentas ofertadas para manipulação de dados espaciais, levantamento de dados que facilitam o estudo do estado da área em questão por meio de sua identificação, localização, extensão da área, conseqüentemente prestando assistência ao planejamento, gestão territorial e direcionamento das uvas obtidas, apresentando com maior precisão o local experimentado.

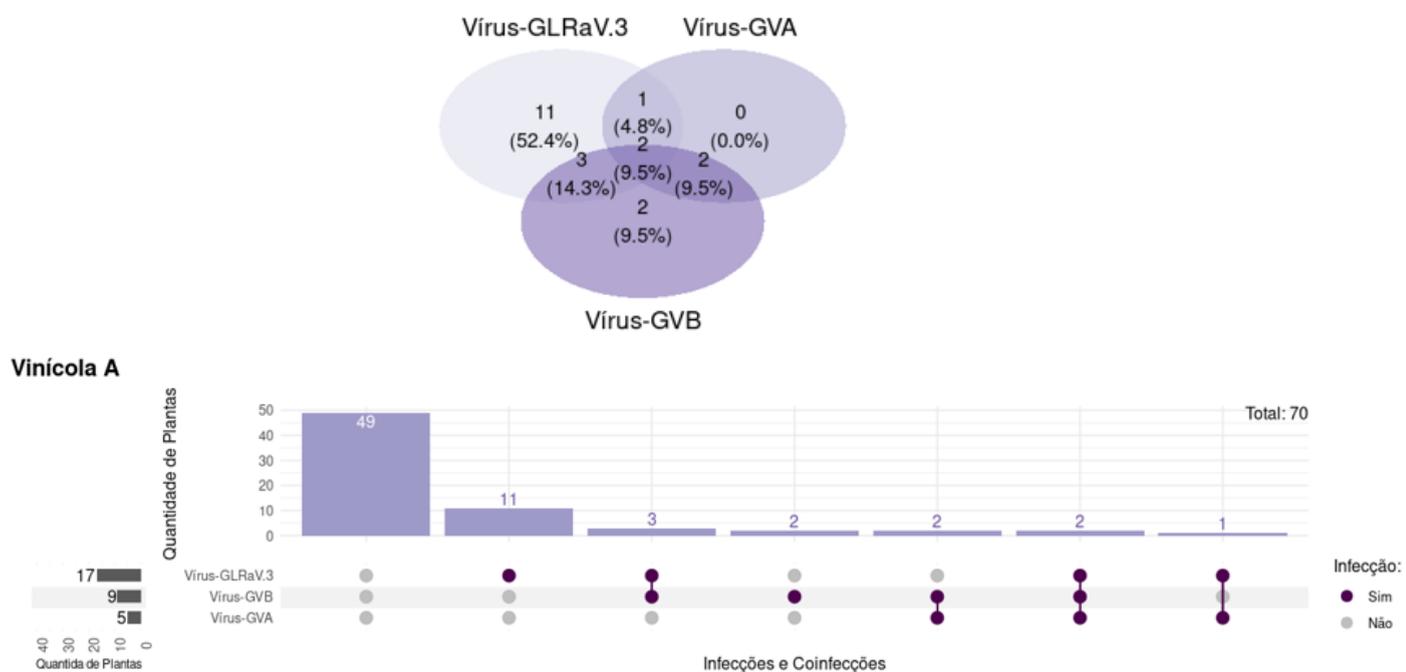
Imagem 3 – Mapa da Vinícola A



Fonte: Autor, 2022.

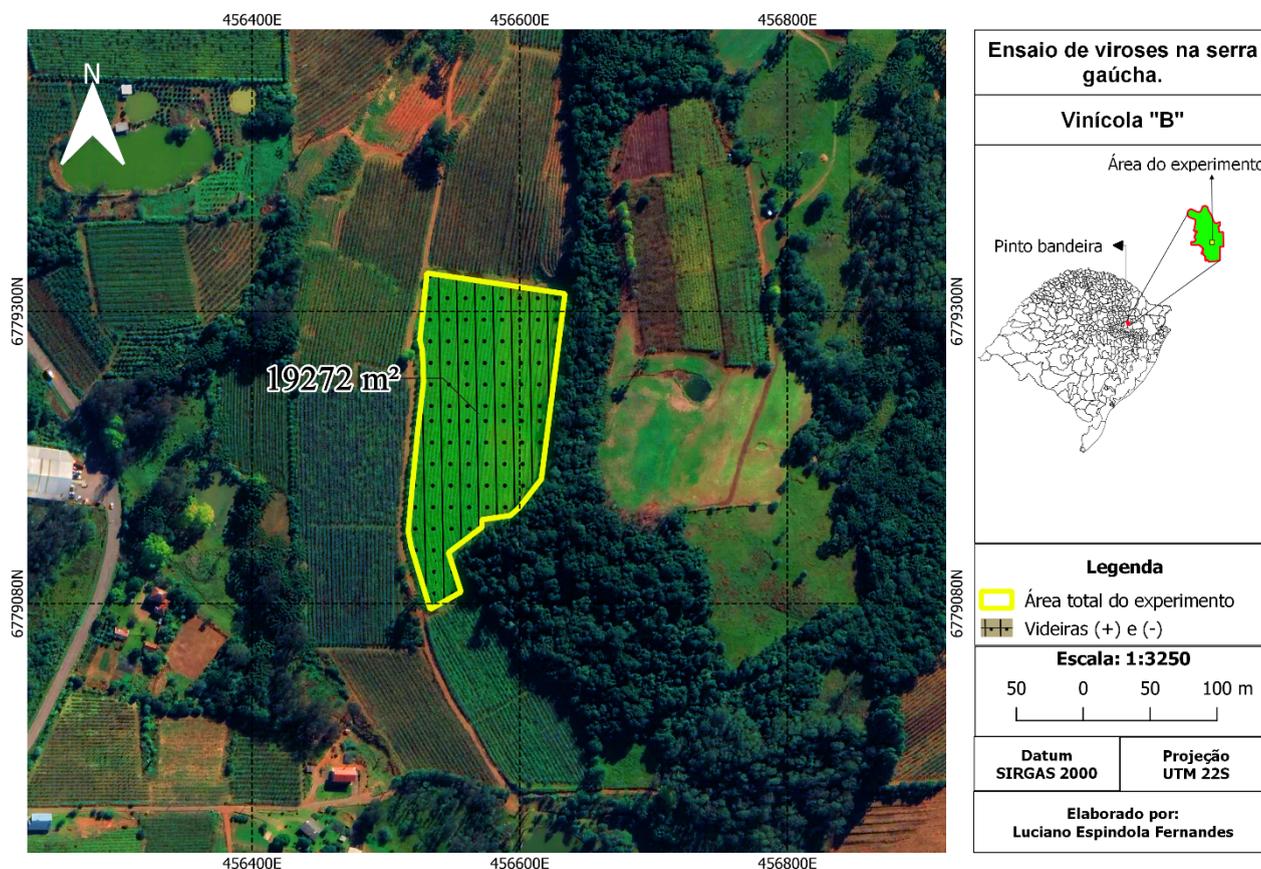
A imagem 3 representa o mapa desenvolvido da vinícola A. A área de estudo aproximada foi de 7884 m², localizada em Bento Gonçalves, no estado do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil. A porcentagem de videiras afetadas para um único vírus foi de 0% para o vírus GVA, 9,5% para GVB e 52,4% para o GLRaV-3. Os valores encontrados para plantas que apresentaram a coinfeção dos 3 vírus foi de 9,5%, para plantas que apresentaram o GLRaV-3 e GVB foi de 14,3%, para GLRaV-3 e GVA 4,8%, para GVA e GVB 9,5% conforme demonstrado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Descrição do número total de amostras indexadas para os vírus estudados na vinícola A, número total de plantas infectadas com seus respectivos vírus e o percentual das infecções.



Fonte: Autor, 2022.

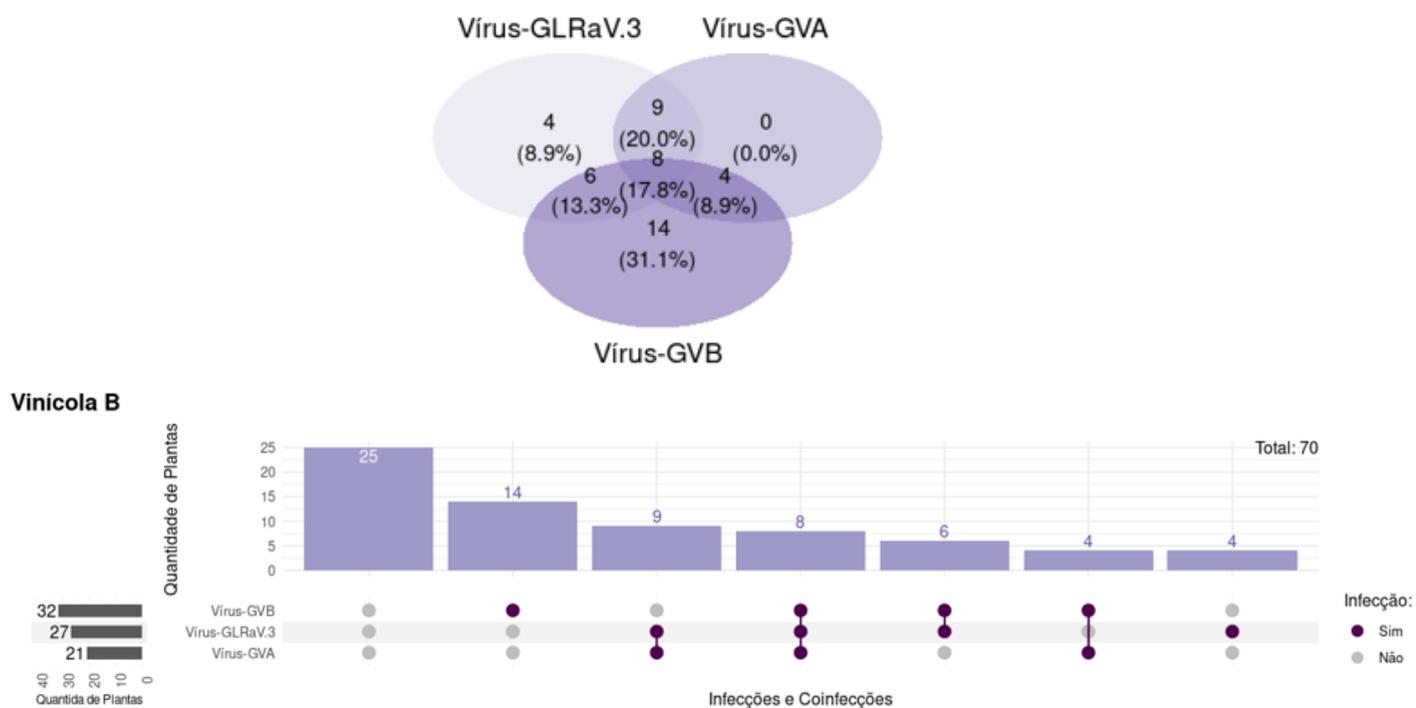
Imagem 4 – Mapa da Vinícola B



Fonte: Autor, 2022.

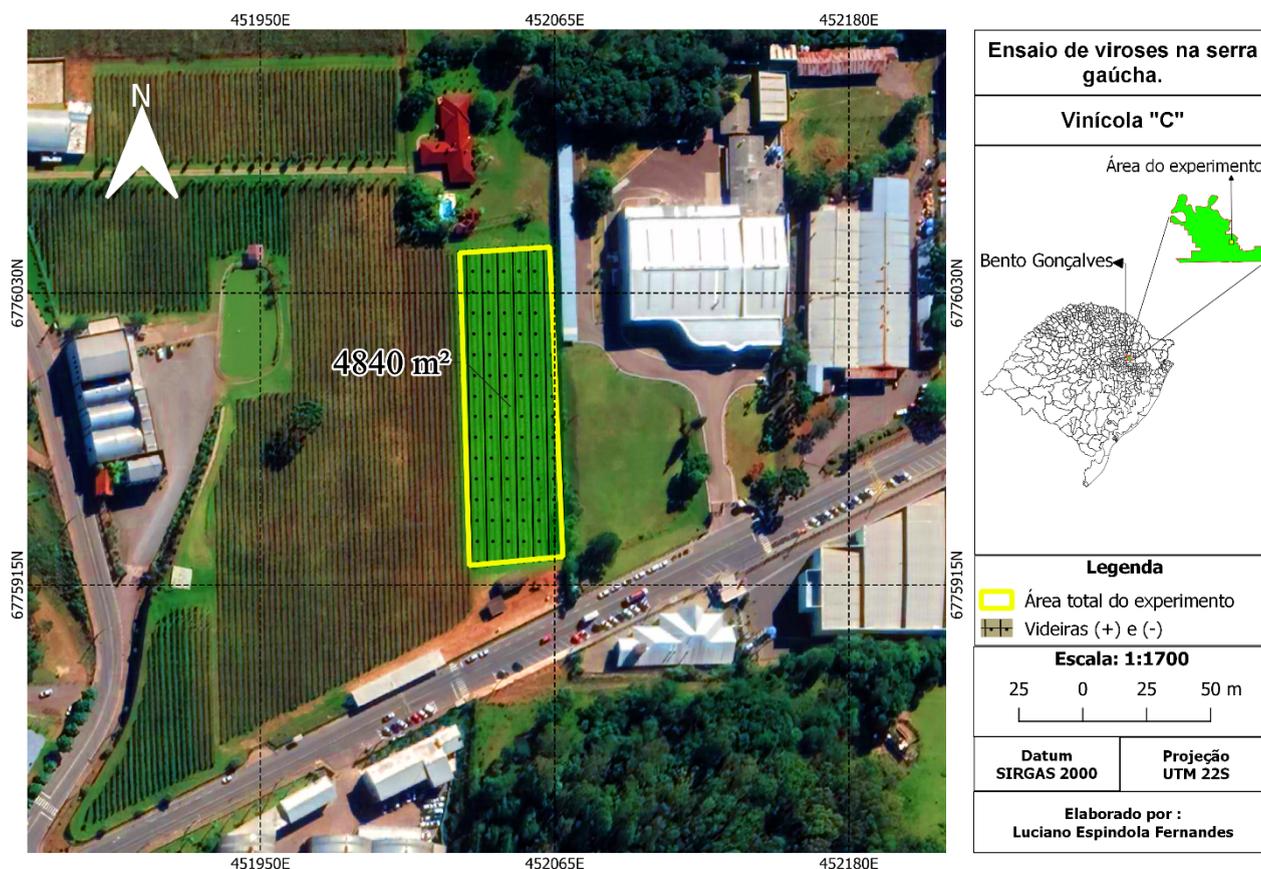
A imagem 4 representa o mapa desenvolvido da vinícola B. A área de estudo aproximada foi de 19272 m², localizada em Pinto Bandeira, no estado do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil. A porcentagem de videiras afetadas para um único vírus foi de 0% para o vírus GVA, 31,1% para GVB e 8.9% para o GLRaV-3. Os valores encontrados para plantas que apresentaram a coinfeção dos 3 vírus foi de 17.8%, para plantas que apresentaram o GLRaV-3 e GVB 13,3%, para GLRaV-3 e GVA 20%, para GVA e GVB 8.9% conforme demonstrado no gráfico 2.

Gráfico 2 - Descrição do número total de amostras indexadas para os vírus estudados na vinícola B, número total de plantas infectadas com seus respectivos vírus e o percentual das infecções.



Fonte: Autor, 2022.

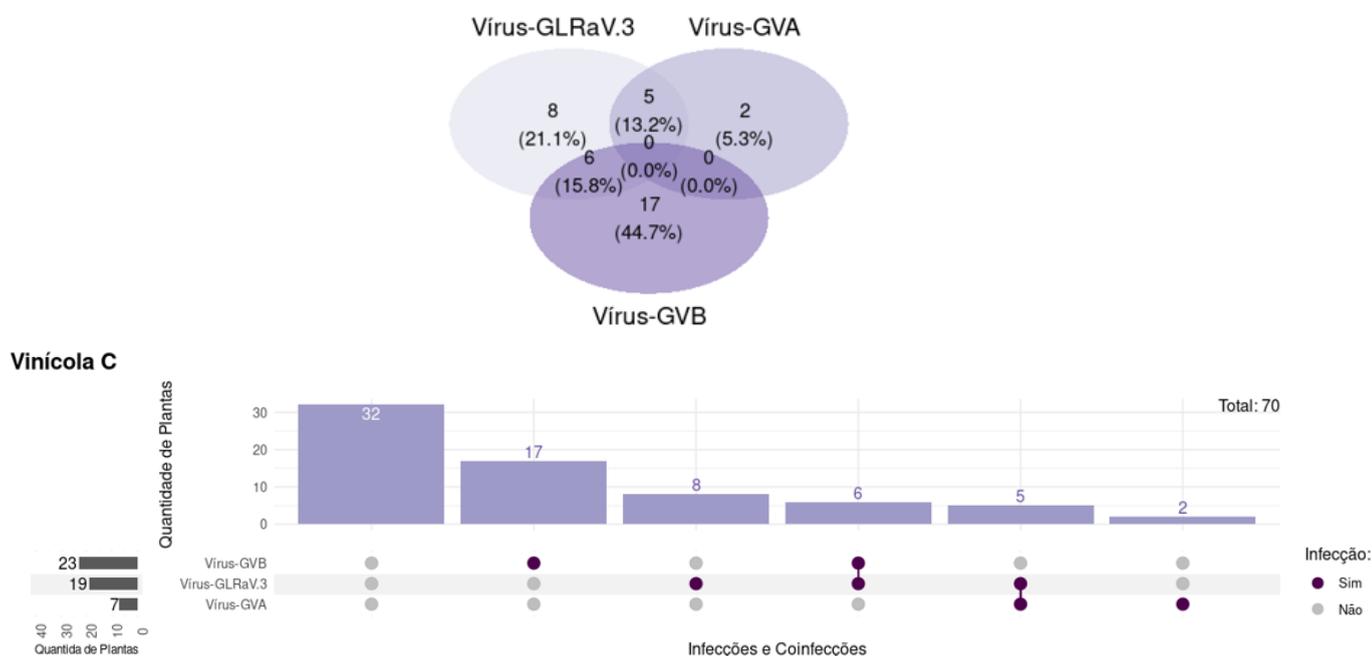
Imagem 5 – Mapa da vinícola C



Fonte: Autor, 2022.

A imagem 5 representa o mapa desenvolvido da vinícola C. A área de estudo aproximada foi de 4840 m², localizada em Bento Gonçalves, no estado do Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil. A porcentagem de videiras afetadas para um único vírus foi de 5,3% para o vírus GVA, 44,7% para GVB e 21,1% para o GLRaV-3. Os valores encontrados para plantas que apresentaram a coinfeção dos 3 vírus foi de 0%, para plantas que apresentaram o GLRaV-3 e GVB 15,8%, para GLRaV-3 e GVA 13,2% , para GVA e GVB 0%, conforme demonstrado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Descrição do número total de amostras indexadas para os vírus estudados na vinícola C, número total de plantas infectadas com seus respectivos vírus e o percentual das infecções.



Fonte: Autor, 2022.

A observação de videiras sintomáticas e assintomáticas quanto a viroses é frequente em vinhedos nas principais regiões vitícolas brasileiras (BASSO et al., 2010a).

Os resultados demonstram que cada *terroir* (SEGUIN, 1986) (CARBONNEAU et al., 2015) expressa uma quantidade de infecção viral distinta para cada vírus presente. Isso é devido sobretudo pela existência de um ecossistema interativo único, composto por um macroambiente e microambiente (BASSOI et al., 2014)(MIELE et al., 2014)(PEREIRA et al., 2020). De acordo com Catarino et al., 2015 a ocorrência de diferentes vírus se faz presente em distintas regiões vitícolas do Brasil, o que traz consigo a necessidade da convivência com os vírus no vinhedo. Pois não existem cultivares e porta-enxertos resistentes a todas as cepas virais existentes (MALIOGKA et al., 2015). Outra problemática a ser analisada segundo SILVA et al., 2016, é que a identificação das cochonilhas farinhentas, apresenta-se como um obstáculo na implantação de técnicas de manejo, visto que esse trabalho é feito por poucos especialistas e sobre a cultura da videira, *Vitis* spp., há uma grande diversidade de espécies invasoras, servindo como fontes da dispersão viral.

Estas infecções virais atuam sobre a qualidade e quantidade das uvas, estando

ligada a fatores como, as condições ambientais, a fase do ciclo de desenvolvimento em que a videira se encontra, o seu estado nutricional, se a mesma encontra-se afetada por algum estresse, assim como, quais são as práticas de manejo que são utilizadas para combater os patógenos presentes e os estresses abióticos (FAJARDO et al., 2002) (FAJARDO et al., 2004) (FAJARDO; MENEZES; NICKEL, 2021). A combinação de estirpes virais presentes na cultivar e o tempo decorrido desde o início da infecção, terão um maior ou menor impacto sobre a maturação regular ou irregular, assim como, completa ou incompleta das uvas. Esta manifestação acaba produzindo impactos econômicos para a atividade vitícola, necessitando de pesquisas que otimizem a utilização desta matéria prima discrepante em relação às uvas geradas por plantas saudáveis. (BASSO et al., 2010a; NAIDU et al., 2014).

As videiras com uma única infecção ou coinfeções presentes, podem apresentar variações na expressão de genes responsáveis pela síntese de compostos fenólicos, sínteses de açúcares no fruto, limitação do potencial fotossintético por conta das suas estruturas que sofrem mudanças morfológicas, entre outros processos que são necessários para o desenvolvimento da planta e o dos seus respectivos frutos (ESPINOZA et al., 2007) (GIRIBALDI et al., 2011).

Pesquisa semelhante ocorreu no vale do Rio do peixe em Santa Catarina por Fajardo e colaboradores (2021), foi demonstrado a porcentagem da incidência de patógenos virais em infecções mistas, assim como, o momento no qual a videira se encontra no seu ciclo de vida, influencia diretamente na qualidade do material para ser feita o diagnóstico viral, ressaltando que se deve optar por tecidos maduros, para assegurar um diagnóstico confiável. Outra conclusão de suma importância foi que videiras cujos sintomas não estão manifestados, não podem ser consideradas sadias, por isso a necessidade de utilizar uma ferramenta que demonstre resultados confiáveis, e quais são os vírus presentes. Para isso faz-se necessário o uso do rt-pcr em tempo real, cuja qualidade dos ensaios tem sido reconhecida como superior às outras técnicas existentes (DUBIELA et al., 2013) (OSMAN et al., 2018) (FAJARDO; MENEZES; NICKEL, 2021).

Os resultados demonstraram uma extensão de terra, onde novos estudos podem vir a demonstrar a evolução da taxa viral através da comparação de novos mapas desenvolvidos no QGIS para manter atualizado o georreferenciamento, utilizando juntamente o rt-pcr em tempo real como ferramenta analítica, demonstrando a cada safra

a evolução da taxa viral (FAJARDO et al., 2002) (FAJARDO et al., 2004). Outra característica confirmada é que a infecção mista ocorreu em todas as vinícolas, sendo este um fator de difícil controle, pois diversas estirpes virais podem estar presentes em uma mesma videira ou vinhedo (NAIDU, et al., 2014) (FAJARDO et al., 2004). A remoção das plantas apresenta-se como uma estratégia difícil de ser executada, pois o produtor além de ter uma dificuldade com a mão de obra, gastos com novas cultivares, tem o fator cultural, onde as videiras estão presentes por gerações e o viticultor procura não se desfazer das suas plantações, visto que resultaria em perdas maiores na quantidade de matéria-prima e também a espera pelo tempo necessário para o desenvolvimento fisiológico da videira para gerar frutos com a qualidade esperada. (NASCIMENTO et al., 2015). Este trabalho visou demonstrar que é possível agregar uma ferramenta de análise molecular ao georreferenciamento de distintas áreas, buscando-se uma logística de manejo mais apurada e somando aos trabalhos já desenvolvidos sobre o tema da incidência de viroses em diversos vinhedos brasileiros, tais como no estado de São Paulo na região de São Roque (MOURA et al., 2018), no Vale do São Francisco, Zona da Mata em Pernambuco, na Bahia (CATARINO et al., 2015) e na Serra Gaúcha localizada no estado do Rio Grande do Sul (FAJARDO et al., 2020).

Devido ao potencial de plasticidade presentes nas uvas para vinificação. São necessários mais estudos sobre a composição analítica e sensorial dos vinhos originados a partir de videiras com presença viral, assim haveria a possibilidade de definir e valorizar a tipicidade destes vinhos em determinada região. Essas estimativas de infecção viral juntamente de um georreferenciamento podem ajudar os viticultores a realizar monitoramentos simultâneos em campo de distintas áreas, tomar decisões estratégicas de manejo para combater os danos causados por estas infecções com base na taxa viral presente no vinhedo (JUNGES et al., 2017) (PAULETTO et al., 2022).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.C. (2011). "Análise espacial de dados com o Quantum Gis: exercícios realizados durante tópico especial ofertado pelo programa de Pós-Graduação em Geografia da UFSC", *Observatorium*, 3:173-194.

BASSO, M. F. et al. Fisiologia foliar e qualidade enológica da uva em videiras infectadas por vírus. *Tropical Plant Pathology*, v. 35, n. 6, p. 351-359, 2010a.

BASSO, M. F. et al. Avanços e perspectivas no estudo das doenças virais e subvirais em videira com ênfase na realidade brasileira. In: *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 22, Passo Fundo, p. 1-25, 2014.

BASSOI, LH, et al. "Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar." (2014).

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 28 nov. 1986. Seção 1, pt. 2.

BRAVO, J. V. M.; SLUTER, C. R. O PROBLEMA DA QUALIDADE DE DADOS ESPACIAIS NA ERA DAS INFORMAÇÕES GEOGRÁFICAS VOLUNTÁRIAS. *Boletim de Ciências Geodésicas*. 2015, v. 21, n. 1, pp. 56-73.

BELL V.A., 2015. An integrated strategy for managing Grapevine leafroll-associated virus 3 in red berry cultivars in New Zealand vineyards. Ph.D. Thesis. Victoria University of Wellington, New Zealand. <<http://researcharchive.vuw.ac.nz/xmlui/handle/10063/4147>> (Acesso em 19/08/2021).

BERTIN, A.; BORTOLI, L. C.; BOTTON, M.; PARRA, J. R. P. Host plant effects on the development, survival, and reproduction of *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera : Pseudococcidae) on Grapevines. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 106,

n. 5, p. 604–609, 2013.

BLOUIN, Jacques; PEYNAUD, Émile. *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. 4 ed. Madrid: Mundi –prensa, 2003.

BRUCE, A.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RASS, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. (1999). *Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul.

BRUWER, J., FONG, M., SALIBA, A., 2013. Perceived risk, risk-reduction strategies (RRS) and consumption occasions: Roles in the wine consumer’s purchase decision. *Asia Pac. J. Mark. Logist.* 25, 369–390.

BUGLASS, A. J. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. Edited 2011. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0- 470-51202-9. Pág-1114.

CARBONNEAU, A. Etude écophysiological des principaux systèmes de conduite intérêt qualitatif et économique des vignes en Lyre: premières indications de leur comportement en situation de vigueur élevée. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 6., 1990, Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV/ABTE/OIV, 1991. p. 21-34.

CATARINO, A.M.; FAJARDO, T.V.M.; PIO-RIBEIRO, G.; EIRAS, M.; NICKEL, O. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. *Ciência Rural*. Santa Maria, vA5, n.3, p.379-385, mar. 2015

CHAVES, M. M. *Fotossíntese e repartição dos produtos de assimilação em Vitis vinifera L.* 1986. 220 f. Tese (Doutorado) – Universidade Técnica de Lisboa, 1986.

CÂMARA, G.; DAVIS, C. E MONTEIRO, A.M.V. (2001). “Introdução à ciência da

geoinformação”, INPE, São José dos Campos, SP, 13:345.

CHEN, D.; CARMONA M. C.; LEONE A.; SHAMS, S. Assessment of Open Source GIS Software for Water Resources Management in Developing Countries. EUR 23705 EN. Luxembourg (Luxembourg): OPOCE; 2008.

CREDI, R. E GIUNCHEDI, L. (1996). Grapevine leafroll-associated viroses and Grapevine virus A in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy, *Plant Pathology*. 45: 1110-1116.

CRETAZZO, E.; PADILHA, C.; CARAMBULA, C.; HITA, I.; SALMERÓN, E.; CIFRE, J. Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v. 156, p. 1-12, 2010.

CATARINO, ARICLÉIA DE MORAES et al. Incidência de vírus em videiras no Nordeste brasileiro e caracterização molecular parcial de isolados virais locais. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 45, n. 3, p. 379-385, mar. 2015.

CURZI, D., PACCA, L., 2015. Price, quality and trade costs in the food sector. *Food Policy* 55, 147– 158. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2015.06.007>

DAANE K.M., ALMEIDA R.P.P., BELL V.A., WALKER J.T.S., BOTTON M., FALLAHZADEH M., MANI M., MIANO J.L., SFORZA R., WALTON V.M., ZAVIEZO T., 2012. Biology and management of mealybugs in vineyards. In: Bostanian N.J., Vincent C., Isaacs R. (eds). *Arthropod management in vineyards: pests, approaches and future directions*, pp. 271-307. Springer, Netherlands.

DEEPAK S, KOTTAPALLI K, RAKWAL R, OROS G, RANGAPPA K, IWAHASHI H, MASUO Y, AGRAWAL G. PCR em tempo real: Revolucionando a detecção e análise de expressão de genes. *Curr Genomics*. Junho de 2007; 8 (4): 234-51. doi: 10.2174 / 138920207781386960. PMID: 18645596; PMCID: PMC2430684.

DIAS, F. S., SILVA, M. F., DAVID, J. M. Determination of quercetin, gallic acid, resveratrol, catechin and malvidin in Brazilian wines elaborated in the Vale do São Francisco using liquid-liquid extraction assisted by ultrasound and GC-MS. *Food Analytical Methods*, 6, 963-968, 2013.

DOWNEY, M.O.; DOKOOZLIAN, N.K.; KRSTIC, M.P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.57, 2006

DUBIELA, C.R. et al. Simultaneous detection of Brazilian isolates of grapevine viruses by TaqMan real-time RT-PCR. *Tropical Plant Pathology*, v.38, p.158-165, 2013.

EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. *Fitopatologia Brasileira*, 23:5-17, 1998.

ESPINOZA, C.; VEGA, A.; MEDINA, C.; SCHLAUCH, K.; CRAMER, G.; ARCE-JOHNSON, P. Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. *Functional and Integrative Genomics*, v.7, p.95-110, 2007.

ERLICH, A.E. PCR. *Tecnologic*. In MEYERS, R.A. *Molecular biology and biotechnology. A comprehensive desk reference*. New York: Vch. p.641-648, 1995.

FAIRFIELD SMITH, H. (1938). An empirical law describing heterogeneity in the fields of agricultural crops. *Journal of Agricultural Science*, 28, p.1-23.

FAJARDO, T.V.M., KUHN, G.B., EIRAS, M. & NICKEL, O. Detecção de Closterovirus em videira e caracterização parcial de um isolado do Grapevine leafroll-associated virus 3 *Fitopatologia Brasileira* 27:58-64. 2002.

FAJARDO, T. V. M. et al. Detecção e caracterização biológica e molecular de Rupestris

stem-pitting associated virus e seu efeito na fotossíntese de videiras. *Fitopatologia Brasileira*, n. 29, p. 209-214, 2004.

FAJARDO, T.v.M.; BERTOCCHI, A.A.; NICKEL, O. Determination of the grapevine virome by high throughput sequencing and grapevine viruses detection in Serra Gaúcha, Brazil. *Revista Ceres*. Viçosa, v.67, n.2, p.156-163, abr. 2020.

FIORE, N. et al. Grapevine viruses in the Atacama Region of Chile. *Journal of Phytopathology*, n. 159, p. 743-750, 2011.

FIORE, N. et al. Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, n. 90, p. 125-30, 2008.

FITZ, P.R. (2008). *Geoprocessamento sem complicação*, Oficina de Textos, São Paulo, 160 pp.

FURTADO, A. J. L M.; MALTA, F. S.; FRANCISCO, J. C. SILVA, N. C. C. *Quantum GIS – QGIS Básico*. IBGE. Rio de Janeiro, 2012.

FLENNIKEN, J. M., STUGLIK, S., & IANNONE, B. V. (2020). Quantum GIS (QGIS): An introduction to a free alternative to more costly GIS platforms: FOR359/FR428, 2/2020. *EDIS*, 2020(2), 7-7.

GARAU, R., PROTAI, V.A., PIREDDAR, R., BOSCIA, D. E PROTA, U. (1994). On the relationship between Kober stem grooving and Grapevine virus A. *Vitis* 33:161-163.

GEMAEL, C. *Introdução ao ajustamento de observações: aplicações geodésicas*. Curitiba: Editora UFPR, 1994. 319 p.

GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.; CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M.G.; MARZACHI, C. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality

of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Journal of Proteomics*, v.75, p.306-315, 2011.

GIOVANNINI, E. (2008) *Produção de uvas para vinho, suco e Mesa*. 3ª Ed.: Editora Renascença, Porto Alegre, 362 p.

GRIS, E. F., MATTIVI, F., FERREIRA, E. A., VRHOVSEK, U., FILHO, D. W., PEDROSA, R. C., BOR-DIGNON-LUIZ, M. T. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 31-40, 2013.

GOODCHILD, M.; HAINING, R.; WISE, S. Integrating GIS and spatial data analysis: problems and possibilities. *International Journal of Geographical Information Systems*, v. 6, n. 5, p. 407–423, set. 1992.

HOLBROOK, M.B., CORFMAN, K.P., 1985. Quality and value in the consumption experience: Phaedrus rides again. *Perceived Qual.* 31, 31–57

HOPFER, H., HEYMANN, H., 2014. Judging wine quality: Do we need experts, consumers or trained panelists? *Food Qual. Prefer.* 32, Part C, 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.10.004>

HULL R (2004) *Matthews' Plant Virology*. 4th Ed. San Diego. Elsevier Academic Press.

JAMES D, VARGA A, PALLAS V, CANDRESSE T (2006) Strategies for simultaneous detection of multiple plant viruses. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28:16-29.

JUNGES, A. H.; FONTANA, D. C.; ANZANELLO, R.; BREMM, C. 2017. Normalized difference vegetation index obtained by ground-based remote sensing to characterize vine cycle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*. v. 41. n. 5. p. 543-553.

KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M. Os vírus, esses terríveis inimigos. *Cultivar HF*,

Pelotas, n. 23, p. 18-24, dez.2003 / jan.2004.

KUNTZMANN, P., S. VILLAUME, P. LARIGNON, and C. BERTSCH. 2010. Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis* 49: 71-76

KRALIK P, RICCHI M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol.* 2017;8:108. Published 2017 Feb 2. doi:10.3389/fmicb.2017.00108

KRITZINGER, E. C., BAUER, F. F., & DU TOIT, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 269–277.

LIMA, M. F. 2009. Detecção e controle de viroses em videiras. Circular Técnica 90. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf> Acesso em: 15 nov. 2021.

LOCKSHIN, L., CORSI, A.M., 2012. Consumer behaviour for wine 2.0: A review since 2003 and future directions. *Wine Econ. Policy* 1, 2–23. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2012.11.003>

LONGLEY, P.A.; GOODCHILD, M.F.; MAGUIRE, D.J. & RHIND, D.W. (2013). *Sistemas e ciência da informação geográfica*, Porto Alegre, Bookman, 3a. ed., 540 pp.

LONVAUD-FUNEL A., 1986. Recherches sur les bactéries lactiques du vin : fonctions métaboliques, croissance. génétique plasmidique. Thèse Doctorat ès Sciences, Université Bordeaux).

LIMA, M. F. 2009. Detecção e controle de viroses em videiras. Circular Técnica 90. Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/CTE90.pdf> Acesso em: 15

nov. 2021.

MARBOT S, KUMMERT J, SALMON M, VENDRAME M, DUTRECQ O, LEPOIVRE P (2004) Development of RT-PCR assays using fluorogenic 3' minor groove binder DNA probes for detection of fruit tree viruses. *Acta Horticulturae* 657:547-551.

MARTELLI G, WALTER B (1998) Virus certification in grapevines. In: Hadidi A, Khetarpal R, Koganezawa H (eds) *Plant virus disease control*. APS Press, St. Paul, p 684.

MALIOGKA, V. et al. Control of Viruses Infecting Grapevine. In: *Advances in Virus Research: Control of Plant Virus Diseases: Vegetatively Propagated Crops*, v. 91, Burlington: Elsevier Academic Press, 2015, p. 175-227.

MARTELLI, G.P., MINAFRA, A. & SALDARELLI, P. *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 142:1929-1932. 1997.

MARTELLI, G.P. Grapevine virology highlights 2010-2012. In: *Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, 17., 2012, Davis, USA. *Proceedings...* Davis: ICVG, 2012. p.13-31.

MACKAY IM, ARDEN KE, NITSCHKE A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292. PMID: 11884626; PMCID: PMC101343.

MANGHI, G.; CAVALLINI, P. & NEVES, V. (2011). "Quantum GIS: Um desktop potente e amigável", *Revista FOSSGIS Brasil*, 1(2):10-15.

MAREE H.J., ALMEIDA R.P.P., BESTER R., CHOOI K.M., COHEN D., DOLJA V.V., FUCHS M.F., GOLINO D.A., JOOSTE A.E.C., MARTELLI G.P., NAIDU R.A., ROWHANI A., SALDARELLI P., BURGER J.T., 2013. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* 4: 82.

MELLO, L. M. R. de MACHADO, C. A. E. 2020. Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. Comunicado Técnico (CNPUV), Embrapa- uva e vinho, Bento Gonçalves-RS. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1124189>> Acesso em 08/01/2022.

MIELE, A. FLORES, C. A.; FILIPPINI ALBA, J. M. Precision viticulture in Brazil: Current research status on wine grape. *BIO Web of Conferences*, v. 3, p. 01013, 2014.

MIELE, A.; MANDELLI, F. Sistemas de condução da videira: latada e espaldeira. In: SILVEIRA, S. V. da; HOFFMANN, A.; GARRIDO, L. da R. (Eds.). *Produção integrada de uva para processamento: implantação do vinhedo, cultivares e manejo da planta*. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 3, cap. 3, p. 41-49.

MONTERO, R., EL AOU OUAD, H., PACIFICO, D., MARZACHÌ, C., CASTILLO, N., GARCÍA, E., DEL SAZ, N., FLOREZ-SARASA, I., FLEXAS, J. and BOTA, J. (2017), Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology in asymptomatic plants of *Vitis vinifera*. *Ann Appl Biol*, 171: 155-171.

MORANDI FILHO, W. J.; PACHECO DA SILVA, V. C.; GRANARA DE WILLINK, M. C.; PRADO, E.; BOTTON, M. A survey of mealybugs infesting South-Brazilian wine vineyards. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 59, n. 3, p. 251-254, July/Sept. 2015. Doi: 10.1016/j.rbe.2015.05.002.

MORTARINO M, FRANCESCHI A, MANCIANTI F, BAZZOCCHI C, GENCHI C, BANDI C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parasitol* 46: 163-167, 2004.

MOURA, C.J.M.; FAJARDO, T.v.M.; EIRAS, M.; SILVA,F.N.;N ICKEL, O. Molecular Characterization of GSyV-1 and GLRaV-3 and prevalence of grapevine viruses in a grape-growing area. *Scientia Agricola*. Piracicaba, v.75, n.1, p.43-51, fev. 2018.

MULLINS, M.G., BOUQUET, A., WILLIAMS, L.E. (1992) *Biology of horticultural crops: Biology of the grapevine*. Ed. Cambridge University Press, pp. 239.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique*, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*. SanDiego. v. 55, p.335-350, 1987.

NAIDU, R. et al. Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. *Plant Disease*, v. 98, n. 9, p. 1173-1185, 2014

NASCIMENTO, M. B. et al. Desempenho agrônômico de videiras com e sem sintomas de viroses, e comparação molecular de isolados virais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* [online]. 2015, v. 50, n. 07 pp. 541-550. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000700004>> (Acesso em 21/07/2021).

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 33:10-13, 2004.

OLIVEIRA, J.B. et al. Chemical and Sensorial Characterization of Tropical Syrah Wines Produced at Different Altitudes in Northeast of the Brazil. *S. Afr. J. Enol. Vitic., Stellenbosch*, v. 40, n. 2, p. 1-15, 2019.

OIV, Compendium of international methods of wine and must analysis. International Organization of Vine and Wine, volume 1, Paris edição, 2021.

OSMAN, F.; ROWHANI, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time RT-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 133:130-136, 2006.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9.

Journal of Virological Methods, 141:22-29, 2007.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Comparison of low density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. Journal of Virological Methods, 149:292-299, 2008.

PACHECO DA SILVA, V. C.; GALZER, E. C. W.; MALAUSA, T.; GERMAIN, J-F.; KAYDAN, M. B.; BOTTON, M. The vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae) damaging vineyards in Rio Grande do Sul, Brazil. Neotropical Entomology, 2016.

PALLAS V, SANCHEZ-NAVARRO J, VARGA A, APARICIO F, JAMES D (2009) Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of plant viruses. Methods in Molecular Biology 508:193-208

PEREIRA, G.E.; ZANUS, M. C. ; MELLO, L. M. R.; LIMA, M. S.; PEREGRINO, I. Overview of production and national market of sparkling wines. Informe Agropecuário, v. 41, p. 7, 2020.

PEREIRA, G. E.; HOFFMANN, A.; GARRIDO, L. da R.; SILVEIRA, S. V. Cuidados com a matéria-prima, processos de elaboração, controle da contaminação e de perigos em vinhos e sucos. Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho: IBRAVIN, 2011. 130 p. (Boas Práticas Agrícolas - BPA; Uva para processamento, 7). Programa de Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Vinhos, Espumantes e Suco de Uva - PAS. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/203777/1/descricao-dos-processos-de-elaboracao.pdf>> Acessado em: 14/11/2021.

PAULETTO, H. et al. Orbital images for spatial and temporal characterization of vineyard by vegetation index in the “campanha gaúcha” wine region, brazil. brazilian journal of agriculture - Revista de Agricultura, v. 97, n. 1, p. 86–116, 30 abr. 2022.

PIQUERAS-FISZMAN, B., SPENCE, C., 2012. The weight of the bottle as a possible extrinsic cue with which to estimate the price (and quality) of the wine? Observed correlations. *Food Qual. Prefer.* 25, 41–45.

RADAELLI, P. et al. Variabilidade do gene da proteína capsial de três espécies virais que infectam videiras no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. 297-305, 2009.

RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., & DUBOURDIEU, D. Handbook of enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, v. 2, West Sussex, UK: Wiley & Sons, 2006.

RIBÉREU-GAYON, P. et al. Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda., 2006. v. 1.

RIBEREAU-GAYON, P.; LONVAUD, A.; DONECHE, B.; DUBUORDIEU, D. Tratado de Enologia I: Microbiologia del Vino Vinificaciones. Ediciones Mundi-Prensa. 1ª Edição. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 2003.

RIBÉREAU-GAYON P., 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Anal. Chim. Acta*, 52, 627-63.

RIBÉREAU-GAYON, P. AND STONESTREET, E. (1966) Le dosage des tannins du vin rouge et la détermination de leur structure. *Chimie Analytique*, 48, 188-196.

RIZZON, L. A. Características Analíticas dos vinhos da micro região homogênea viticultura de Caxias do Sul (MRH 311): análises clássicas. Bento Gonçalves, EMBRAPA Uva e Vinho, 1987.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Extrato seco total de vinhos brasileiros: comparação de métodos analíticos. *Ciência Rural* [online]. 1996, v. 26, n. 2 [Acessado 2 Janeiro 2022], pp.

297-300. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000200022>>. Epub 25 Set 2008. ISSN 1678-4596.

Rott ME, Jelkmann W (2001) Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107:411-420.

SÁENZ-NAVAJAS, M.-P., AVIZCURI, J.-M., BALLESTER, J., FERNÁNDEZ-ZURBANO, P., FERREIRA, V., PEYRON, D., VALENTIN, D., 2015. Sensory-active compounds influencing wine experts' and consumers' perception of red wine intrinsic quality. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 400–411.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J., HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SALTON, M. A.; DAUDT, C. E.; RIZZON, L. A. Influência do dióxido de enxofre e cultivares de videira na formação de alguns compostos voláteis e na qualidade sensorial do destilado de vinho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, Vol. 20, n. 3, p. 302-308, 2000.

SAMPOL, T., BOTA, J., MEDRANO, H. & FLEXAS, J. Effects of virus infection in photosynthesis of Banyalbufar Malmsey grapevines. *Libro de actas, XIII Jornadas GESCO*, Montevideo, Uruguay. 2003. pp.275-279.

SANDHYA M C, 2020, Exploring Opportunities with Open Source GIS, *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING RESEARCH & TECHNOLOGY (IJERT)* Volume 09, Issue 05 (May 2020).

SANTOS, C.F.; SAKAI, V.T.; MACHADO, M.A.A.M.; SCHIPPERS, D.N.; GREENE, A.S. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J. Appl. Oral Sci.* 12 (1): 1-11.

SANTOS, A. M. T.; SANTOS, I. M.; OLIVEIRA, W. P.; LIMA, K. M.; PEREIRA, G. E.; DELLACQUA, M. N. -. Efeitos in vivo e in vitro de polifenóis presentes em vinhos tintos do Vale do São Francisco. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 20, p. 539-546, 2021.

SILVA, J.X. (2012). “Uma Posição Crítica e Atuante para a Geografia an Active and Questioning Position in Geography”, *Espaço Aberto*, Rio de Janeiro, PPGG-UFRJ, 2(1):17-26.

SILVA, V. C. P. da; BOTTON, M.; PRADO, E.; OLIVEIRA, J. E. de M. *Bioecologia, Monitoramento e Controle de Cochonilhas Farinhentas (Hemiptera: Pseudococcidae) na Cultura da Videira*. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016.

SPOLIDORIO, D.M.P.; SPOLIDORIO, L.C. (2005). Técnicas básicas de biologia molecular. In: ESTRELA, C. *Metodologia científica- Ciência-Ensino-Pesquisa*. São Paulo: Artes Médicas.

STOORVOGEL, J. AND BOUMA, J. 2005. Precision agriculture: the solution to control nutrient emissions? In Stafford, J., editor, *Precision agriculture '05: Proceedings of the 5th European Conference on Precision Agriculture*, p. 47-55, Uppsala, Sweden. Wageningen Academic Publishers.

TAYLOR J., TISSEYRE B., PRAAT J.P., 2005. Bottling good information: mixing tradition and technology in vineyardsss. *Proceedings of the Fruits and nuts and vegetable production engineering TIC (Frutic05) Conférence*, Montpellier, 19-37.

TEIXEIRA, A. H. C. *Aplicação do georreferenciamento (coordenadas UTM) em projetos geotécnicos e geométricos de rodovias*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Minas, NUGEO, 2010.

TONIETTO, J., FALCADE, I. (2003) Regiões vitivinícolas brasileiras. In: *UVAS para processamento*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 134p. (Frutas do Brasil, 34)

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA. Dados estatísticos: produção de vinhos. Bento Gonçalves, 2022. Disponível em<
<http://www.uvibra.com.br/noticias/01-02-2022-mercado-externo-do-brasil-para-o-mundo>>.
Acesso em: 09 fev. 2022.

VAN LEEUWEN C. AND SEGUIN G., 2006. The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.*, 17, 1-10. doi:10.1080/09571260600633135

VEGA A, GUTIÉRREZ RA, PEÑA-NEIRA A, CRAMER GR, ARCE-JOHNSON P. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Mol Biol.* 2011 Oct;77(3):261-74. doi: 10.1007/s11103-011-9807-8. Epub 2011 Jul 24. PMID: 21786204.

WINKLER, A. J. Effect of vine spacing in an unirrigated vineyard on vine physiology, production and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 20, p. 7-15, 1969.

YANG S, ROTHMAN R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet* 4: 337-348, 2004.