

LEVANTAMENTO DA DIVERSIDADE DE VÍRUS EM BATATA-DOCE DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DA EMBRAPA HORTALIÇAS

Karen Fernanda Oliveira e Silva¹; Jamile Mendes de Souza¹; Fernanda Rausch Fernandes²

¹Universidade Católica de Brasília, 71966-700, Brasília-DF; ²Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília-DF; karen_egk@hotmail.com; jamiemendes.s@gmail.com; fernanda.rausch@embrapa.br

RESUMO

Mais de 30 vírus que infectam a cultura da batata-doce (*Ipomoea batatas*), distribuídos em nove famílias taxonômicas, já foram identificados. A maioria desses vírus está associada a infecções assintomáticas em batata-doce e, em alguns casos, até mesmo na planta indicadora *Ipomoea setosa*. A identificação das espécies de vírus que ocorrem em batata-doce no Brasil é de grande importância para o delineamento de estratégias de manejo das lavouras e para a indexação de matrizes nos programas de produção de batata-doce livres de vírus. O presente trabalho teve o objetivo de realizar um levantamento de vírus no Banco Ativo de Germoplasma de batata-doce da Embrapa Hortaliças. Foram amostrados 433 genótipos de batata-doce para a análise, que consistiu inicialmente na enxertia na planta indicadora *Ipomoea setosa* e posterior detecção viral pela técnica NCM-Elisa para dez vírus que infectam a batata-doce: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), *Sweet potato C-6 virus* (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Sweet potato collusive virus* (SPCV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). Oito antissoros foram adquiridos no Centro Internacional de la Papa (Lima, Peru) e os outros dois (para o SPFMV e CMV) foram produzidos na Embrapa Hortaliças. Infecções simples e mistas foram identificadas nas amostras submetidas à análise. Foram observadas plantas infectadas por apenas uma espécie de vírus (17,32%), duas (17,78%), três (19,86%), quatro (13,16%), cinco (10,39%), seis (7,62%), sete (3,23%), oito (1,15%), nove (0,23%) e dez espécies de vírus (0,23%). Ou seja, grande parte das plantas de batata-doce está infectada por complexos virais (compostos por diferentes combinações de vírus). Trinta e nove acessos de batata-doce (9%) não apresentaram a infecção para nenhum dos dez vírus testados (não houve reação com os antissoros testados), o que os torna potenciais fontes

de estudo para análise de resistência a vírus no programa de melhoramento genético da cultura.

PALAVRAS-CHAVE: *diagnose viral, batata-doce, indexação, vírus.*

ABSTRACT

More than 30 viruses that infect the culture of sweet potato, distributed in nine taxonomic families were identified. Most of these viruses is associated with asymptomatic infections sweet potatoes, and in some cases even even in the control plant *Ipomoea setosa*. The identification of virus species that occur in sweet potato in Brazil is of great importance for the design of strategies for management of crops and for indexing arrays in production programs of sweet potato virus-free. This study Aimed to conduct a survey of viruses in the Active Germplasm Bank of the sweet potato crop systems from Embrapa Vegetables. We sampled 433 genotypes of sweet potato for the analysis, which originally consisted of grafting on indicator plant *Ipomoea setosa* and subsequent viral detection in NCM-ELISA for ten viruses infecting sweet potato: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), Sweet potato C-6 virus (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), Sweet potato collusive virus (SPCV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). Eight antisera were purchased at the International Potato Center (Lima, Peru) and the other two (for SPFMV and CMV) were produced in Embrapa Vegetables. Simple and mixed infections were identified in samples submitted for analysis. Infected plants were observed for only one kind of virus (17,32%), two (17,78%), three (19,86%), four (13,16%), five (10,39%), six (7,62%), seven (3,23%), eight (1,15%), nine (0,23%) and ten virus species (0,23%). That is, most plants of sweet potato are infected by virus complex (composed of different combinations of viruses). Thirty-nine genotypes of sweet potato (9%) had infection for any of the ten viruses tested (there was no reaction with the antisera tested), which makes them potential sources of study for analysis of virus resistance in the sweet potato breeding program.

Keywords: *viral diagnostics, sweet potato, indexing and virus*

INTRODUÇÃO

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), membro da família *Convolvulaceae*, é considerada uma importante cultura para a segurança alimentar nos países em desenvolvimento (Barrera, 1986; Valverde et al., 2007; Gibson et al., 2009). O método de propagação vegetativo facilita o acúmulo de fitopatógenos nas plantas de batata-doce, particularmente os de etiologia viral, causando a degenerescência e resultando em declínio na produtividade e na qualidade do produto colhido (revisado por Karyeija et al., 1998; Loebenstein et al., 2003; Tairo et al., 2005; Valverde et al., 2007). Embora esta seja uma característica comum da produção da batata-doce, a natureza dos complexos virais que ocorrem em diferentes regiões e as estratégias tomadas para manejar a doença tem sido bastante variadas nos diferentes países (Clark et al., 2012). A batata-doce é frequentemente infectada por complexos virais (infecções mistas) e as interações entre esses vírus influenciam os sintomas e as perdas de produção (Carey et al., 1999; Chung et al., 1986; Clark et al., 1998; Cohen et al., 1995; Di Feo et al., 2000; Scheafers & Terry, 1976, Valverde, 2007). Existem combinações virais que refletem em um quadro sintomatológico mais expressivo e, conseqüentemente, maior perda de rendimento da cultura e outras combinações que conduzem a infecções mais brandas.

A detecção rápida e precisa dos vírus é essencial para o seu correto manejo. No entanto, a diagnose dos vírus de batata-doce é dificultada devido à ocorrência de infecções mistas, diversas estirpes virais, e a distribuição desigual do vírus no interior da planta (Valverde et al., 2007; Clark et al., 2012). Devido à grande variabilidade de sintomas em função do genótipo e idade da planta, condições ambientais e presença de complexos virais, os sintomas na batata-doce, inclusive a ausência de sintomas, têm pequeno valor no diagnóstico viral. Nos anos recentes, os vírus têm sido detectados por meio de uma combinação de ensaios sorológicos e baseados em ácido nucléico, mas em muitos casos, os títulos virais são tão baixos que esses métodos devem ser combinados com a enxertia prévia em *I. setosa* ou outros hospedeiros (Pozzer et al., 1995). Quando se promove a enxertia combinada com os métodos de detecção sorológica, verifica-se que a eficiência de detecção pode ser altamente incrementada. Os métodos sorológicos mais conhecidos, tais como o ELISA em membrana de nitrocelulose (NCM-Elisa) ou em microplaca são amplamente utilizados para a detecção de vírus de batata-doce. O CIP (Centro Internacional de La Papa, Lima – Peru) fornece um kit diagnóstico para a detecção sorológica de oito dos mais comuns vírus de RNA de batata-doce.

O objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento de vírus no Banco Ativo de Germoplasma de Batata-doce da Embrapa Hortaliças.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de levantamento de vírus no Banco Ativo de Germoplasma de Batata-doce foi iniciado em 2011. A coleção de batata-doce fica situada na Fazenda Tamanduá, localizada na BR-060, Km 09, Bairro Gama, Brasília-DF, com as seguintes coordenadas: latitude de 15°56'31S e longitude 48°8'55"O e a uma altitude de 997m sobre o nível do mar. Um total de 433 genótipos provenientes de diversas regiões do Brasil foram submetidos à detecção viral.

Foram coletadas ramas de batata-doce com três nós e levadas para a casa-de-vegetação onde foi realizada a enxertia em *Ipomoea setosa*. Para tal, foram realizadas sementeiras da planta indicadora de modo que houvesse a disponibilização de plantas em ponto de enxertia de forma escalonada para a avaliação. Para cada amostra, realizou-se a enxertia em três plantas de *Ipomoea setosa*. O procedimento de enxertia consistiu em utilizar excisões de aproximadamente 3 cm de comprimento de caules de batata-doce coletadas como enxerto em *I. setosa*. As excisões foram cortadas em bisel e enxertadas lateralmente na região do hipocótilo das plantas-teste (*I. setosa*) que tiveram suas folhas e ápice destacados. Enxerto e porta-enxerto foram unidos por meio de uma presilha. As plantas foram cobertas por plástico umedecido para aclimatá-las e evitar a ação de fitopatógenos por um período de dois dias e foram identificadas com o registro do BAG utilizadas como enxerto e a data de realização da enxertia. Adicionalmente, as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e continuamente observadas quanto à manifestação de sintomas nas novas folhas emergentes de *I. setosa* por um período de 30 dias. Posteriormente, três folhas de *I. setosa* foram coletadas (uma de cada planta que recebeu enxerto do mesmo acesso de batata-doce do BAG), formando uma amostra composta, e foram levadas ao Laboratório de Virologia Vegetal da Embrapa Hortaliças para a diagnose viral.

Foi realizada a detecção viral de 10 espécies que infectam a batata-doce: *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV), *Sweet potato latent virus* (SPLV), *Sweet potato mild speckling virus* (SPMSV), *Sweet potato virus G* (SPVG), *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), *Sweet potato chlorotic fleck virus* (SPCFV), *Sweet potato C-6 virus* (C-6), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Sweet potato collusive virus* (SPCV) e

Cucumber mosaic virus (CMV). Oito antissoros foram adquiridos no Centro Internacional de la Papa (Lima, Peru) e os outros dois (para o SPFMV e CMV) foram produzidos na Embrapa Hortaliças. As amostras foram processadas por meio de maceração manual com um rolo na presença do tampão de extração 0,5 PBS (0,07M NaCl + 1mM KH₂PO₄ + 4mM Na₂HPO₄. 12H₂O + 1mM KCl). Foram aplicadas em membrana de nitrocelulose (Millipore 0,45 µM) alíquotas de 6µL de cada amostra, assim como os controles de planta sadia (negativo) e controles positivos que acompanham o kit de antissoros do CIP. As membranas foram deixadas para secar por um período de 1 hora em temperatura ambiente para a fixação do extrato vegetal aplicado na membrana. Em seguida, as membranas foram mergulhadas em solução bloqueadora composta pelo tampão 0,5 PBS, acrescido de 2% de leite em pó desnatado, permanecendo por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação de 60rpm. Após o bloqueio, colocou-se as membranas no IgG (imunoglobulina) antissoros na diluição 1:1000 sob agitação constante de 60 rpm em *overnight*.

No dia seguinte as membranas foram submetidas à tríplex lavagem em tampão 0,5 PBS, em intervalos de 3 minutos sob agitação a 100 rpm e em seguida incubadas. Numa solução de tampão 0,5 PBS diluiu-se o anti-IgG (imunoglobulina) geral para todos os vírus testados (SPFMV, SPMSV, SPCFV, SPMNV, SPLV, SPVG, SPCSV, SPCV, C-6 e CMV) na diluição 1:1000 por 4 horas com agitação de 60 rpm. Após as 3 horas de agitação, as membranas foram submetidas à tríplex lavagem em tampão 0,5 PBS, em intervalos de 3 minutos, sob agitação a 100rpm. Seguindo de uma fase de revelação onde a detecção do complexo antígeno-anticorpo foi detectado adicionando-se 10mL de tampão de revelação (100mM NaCl + 100mM Tris-base + 5mM MgCl₂) acrescido de 30µL BCIP e 60µL NBT. A interpretação dos resultados foi feita visualmente, considerando-se positivas as amostras que resultaram no aparecimento de manchas de coloração púrpura na membrana de nitrocelulose e negativa quando mantidas a coloração de clorofila verde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 433 plantas provenientes da região Centro-Oeste, região Norte, região Nordeste, região Sul, região Sudeste, amostras do Exterior e amostras de procedência desconhecida foram submetidas às análises por meio da enxertia em *I. setosa* e posterior diagnose por NCM-Elisa. Infecções simples e mistas foram identificadas nas amostras

submetidas à análise. A enxertia de caule mostrou-se como um eficiente método de transmissão para os vírus testados, corroborando o estudo de Pozzer et al. (1993a), que estudaram qual o tipo de amostra para a detecção do SPFMV, sendo que a enxertia prévia em *I. setosa* mostrou-se extremamente eficaz na transmissão e detecção do vírus pelo teste sorológico NCM-Elisa. A indexação biológica em *I. setosa* apresentou-se como um método de elevada simplicidade e confiabilidade, sendo os seus resultados associados à NCM-Elisa bastante eficazes na diagnose dos vírus de batata-doce. Além de evidenciar as amostras com nitidez, e ser econômico e rápido, pode ser largamente adotado nos estudos de diversidade viral e no processo de indexação de plantas matrizes de batata-doce proveniente do processo de limpeza clonal. É possível verificar também que muitas vezes, a planta de batata-doce não manifesta sintomas claros da infecção viral, entretanto, após a enxertia em *Ipomoea setosa* verifica-se a expressão de sintomas típicos da infecção viral.

Um total de 46 acessos do BAG analisados foram provenientes do Centro-Oeste (Distrito Federal e Mato Grosso), 46 da região Norte (Rondônia e Amazonas), 86 da região Nordeste (Ceará e Piauí), 102 da região Sul (Paraná e Santa Catarina), 31 da região Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), 3 amostras do Exterior (Argentina) e 119 amostras de procedência desconhecida. Foram observadas plantas infectadas por apenas uma espécie de vírus (17,32%), duas (17,78%), três (19,86%), quatro (13,16%), cinco (10,39%), seis (7,62%), sete (3,23%), oito (1,15%), nove (0,23%) e dez espécies de vírus (0,23%) (Tabela 1). Um maior percentual de amostras de batata-doce mostrou-se infectado pelo SPFMV (68,13%) que é o mais comum, seguido pelo SPMSV (51,96%), SPVG (45,73%), SPCV (33,49%), SPMMV (30,48%), SPCSV (28,18%), SPCFV (17,55%), SPLV (13,63%), CMV (8,55%) e C-6 (1,39%) (Tabela 2). Foram identificados 39 genótipos livres dos vírus testados (9,01%), (não houve reação com os antissoros testados), o que os torna potenciais fontes de estudo para análise de resistência a vírus e um possível melhoramento genético, haja visto que as plantas do BAG são mantidas em condições *in vivo*, suscetíveis à infecção pelos vírus por meio da transmissão via vetor. Sendo assim, grande parte das plantas de batata-doce está infectada por complexos virais (compostos por diferentes combinações de vírus).

É possível verificar uma elevada proporção de plantas de batata-doce infectadas simultaneamente pelo SPFMV e SPCSV, caracterizando a combinação viral responsável

pela “sweet potato virus disease” (SPVD). Pelo fato de cada acesso do BAG ser representado por apenas duas plantas de batata-doce (cultivadas em vasos), não é possível inferir em relação a possíveis decréscimos de produtividade, em função da infecção simultânea das espécies SPFMV e SPCSV, mas é possível multiplicar os acessos para serem cultivados em condições de campo, possibilitando a avaliação do desempenho agrônomo, contrastando-se a produtividade dos acessos infectados com diferentes combinações virais.

Estudos recentes indicam que o controle das doenças virais nas lavouras de batata-doce é mais desafiador do que se pensava previamente. Existem muito mais vírus que infectam a cultura do que se conhecia previamente. A maioria, senão todos os vírus parecem ser distribuídos no mundo inteiro como consequência do movimento de germoplasma ao longo das últimas décadas e séculos. Apesar dos progressos na identificação dos vírus de batata-doce, muitos dos quais provaram ser disseminados, várias linhas de evidências sugerem que mais vírus permanecem ainda sem identificação (Clark et al., 2012) e programas de quarentena continuam a enfrentar novos desafios. Vírus de batata-doce continuam sendo frequentemente detectados em programas de quarentena e testes adicionais podem ser necessários para estes vírus (Li et al., 2008; Paprotka et al., 2010).

Todas as dez espécies de vírus foram detectadas. O presente trabalho foi bastante relevante pelas informações geradas para a caracterização inicial do BAG quanto à resistência a viroses e direcionará estudos futuros que enfoquem a avaliação da resistência em condições controladas para que sejam selecionados genótipos no programa de melhoramento. Assim também, as informações geradas serão de grande importância no processo de indexação de matrizes de batata-doce após o processo de limpeza clonal.

REFERÊNCIAS

- BARRERA, P. Batata-doce: uma das doze mais importantes culturas do mundo. (Coleção Brasil Agrícola). São Paulo: Ícone Editora, 91 p, 1986
- CAREY, EE; GIBSON, RW; FUENTES, S; MACHMUD, M; MWANGA, ROM; TURIAMUREEBA, G; ZHANG, L; MA, D; ABO EL-ABBAS, F; EL-BEDEWY, R & SALAZAR, LF. 1999. The causes and control of virus diseases of sweetpotato in developing countries: is sweetpotato virus disease the main problem? CIP program report 241-248, International Potato Center, Lima, Peru 1997-98.

- CHUNG, ML; HSU, YH; CHEN, MJ. & CHIU, RJ. Virus diseases of sweet potato in Taiwan. *Plant Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Sub-Tropics* 33, 84. FFTC Book Series, 1986.
- CLARK, C.A; HOY, MW; Valverde, RA; Cannon, JM.; La Bonte, DR & Wallace, H. 1998. Effect of viruses on yield of sweetpotato in Louisiana, *Phytopathology* 88, S17, 1996-1997.
- CLARK, CA; DAVIS, JA; ABAD, JA; CUELLAR, W.J; FUENTES, S; KREUZE, JF; GIBSON, RW; MUKASA, SB; TUGUME, AK; TAIRO, FD; VALKONEN, JPT. Sweetpotato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease* 96:2, 168-185, 2012.
- COHEN, J; MILGRAM, M & LOEBENSTEIN, G. Virus diseases of sweet-potato in Israel-epidemiological aspects. Abstracts of the International Society of Plant Pathology, 6th International Plant Virus Epidemiology Symposium, p 42, 1995.
- DI FEO, L; NOME, SF; BIDERBOST, E; FUENTES, S & SALAZAR, LF. Etiology of sweet potato chlorotic dwarf disease in Argentina. *Plant Disease* 84, 35-39, 2000.
- GIBSON, RW; MWANGA, ROM; NAMANDA, S; JEREMIAH, SC; BARKER, I. Review of sweetpotato seed systems in East and Southern Africa. International Potato Center (CIP), Lima, Peru, Integrated Crop Management Working Paper, 2009
- KARYEJIA, RF; GIBSON, RW; VALKONEN, JPT. Resistance to sweetpotato virus disease (SPVD) in wild East African *Ipomoea*. *Ann. Appl. Biol.* 133:39-44, 1998.
- LI, R; MOCK, R; HUANG, Q; ABAD, J; HARTUNG, J; KINARD, G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *J. Virol. Methods*, 154:48-55, 2008.
- LOEBENSTEIN, G; THOTTAPPILLY, G; FUENTES, S; COHEN, J. Virus and phytoplasma diseases. Pages 105-134 in: *The Sweetpotato*. G. Loebenstein and G. Thottappilly, eds. Dordrecht, The Netherlands, Springer Sciences Business Media BV, 2003.
- MIRANDA, JEC; FRANÇA, FH. *In*: França, FH; Lopes, C.A; Jabuonski, RE; Melhoramento de batata-doce no CNPHortaliças. eds. Seminário sobre a cultura da batata-doce. Brasília: EMBRAPA-CNPq, p. 37-54, 1987.
- PAPROTKA, T; BOITEUX, LS; FONSECA, MEN; RESENDE, RO; JESKE, H; FARIA, J.C; et al. Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank. *Virus Res.* 149:224-233, 2010.
- POZZER, L; DUSI, AN; LIMA, MI; KITAJIMA, EW. Caracterização de um isolado brasileiro do Sweet potato feathery mottle virus infectando batata-doce. 20(1) p. 65-71 *Fitopatologia Brasileira*, 1995.
- TAIRO, F; MUKASA, SB; JONES, RA. C; KULLAYA, A; RUBAIHAYO, PR; & VALKONEN, JPT. Unravelling the genetic diversity of the three main viruses involved in Sweet Potato Virus Disease (SPVD), and its practical implications. *Mol. Plant Pathol.* 6:199-211, 2005.
- VALVERDE, RA; CLARK, CA; AND VALKONEN, JPT. Viruses and virus disease complexes of sweetpotato. *Plant Viruses* 1:116-126, 2007.

1 **Tabela 1.** Distribuição das amostras de batata-doce analisadas quanto ao número de espécies virais associadas por região geográfica.

Amostras	0 vírus	(%)	1 vírus	(%)	2 vírus	(%)	3 vírus	(%)	4 vírus	(%)	5 vírus	(%)	6 vírus	(%)	7 vírus	(%)	8 vírus	(%)	9 vírus	(%)	10 vírus	(%)
Sul	9	8,82	25	24,51	24	23,53	14	13,73	8	7,84	4	3,92	12	11,76	5	4,90	0	0,00	0	0,00	1	0,98
Sudeste	5	16,13	4	12,90	7	22,58	5	16,13	4	12,90	3	9,68	2	6,45	1	3,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Centro-Oeste	1	2,17	10	21,74	6	13,04	11	23,91	12	26,09	3	6,52	2	4,35	1	2,17	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Nordeste	10	11,63	11	12,79	10	11,63	22	25,58	14	16,28	10	11,63	6	6,98	1	1,16	2	2,33	0	0,00	0	0,00
Norte	5	10,87	7	15,22	5	10,87	7	15,22	8	17,39	12	26,09	2	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Exterior	1	33,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	33,33	1	33,33	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
Não identificado	8	6,72	18	15,13	25	21,01	27	22,69	10	8,40	12	10,08	9	7,56	6	5,04	3	2,52	1	0,84	0	0,00
Total	39	9,01	75	17,32	77	17,78	86	19,86	57	13,16	45	10,39	33	7,62	14	3,23	5	1,15	1	0,23	1	0,23

2

3 **Tabela 2.** Distribuição das amostras de batata-doce analisadas quanto às espécies virais associadas por região geográfica.

Amostras	SPFMV	(%)	SPLV	(%)	SPMSV	(%)	SPVG	(%)	SPMMV	(%)	SPCFV	(%)	C-6	(%)	SPCSV	(%)	SPCV	(%)	CMV	(%)
Sul	88	86,27	20	19,61	41	40,20	39	38,24	24	23,53	22	21,57	4	3,92	19	18,63	21	20,59	6	5,88
Sudeste	15	48,39	1	3,23	22	70,97	12	38,71	11	35,48	3	9,68	0	0,00	9	29,03	10	32,26	0	0,00
Centro-Oeste	25	54,35	6	13,04	20	43,48	26	56,52	11	23,91	7	15,22	0	0,00	24	52,17	16	34,78	2	4,35
Nordeste	50	58,14	12	13,95	56	65,12	40	46,51	25	29,07	15	17,44	0	0,00	15	17,44	32	37,21	17	19,77
Norte	19	41,30	5	10,87	23	50,00	27	58,70	12	26,09	5	10,87	0	0,00	26	56,52	25	54,35	0	0,00
Exterior	2	66,67	0	0,00	1	33,33	2	66,67	2	66,67	0	0,00	0	0,00	2	66,67	0	0,00	0	0,00
Não identificado	96	80,67	15	12,61	62	52,10	52	43,70	47	39,50	24	20,17	2	1,68	27	22,69	41	34,45	12	10,08
Total	295	68,13	59	13,63	225	51,96	198	45,73	132	30,48	76	17,55	6	1,39	122	28,18	145	33,49	37	8,55

4