

Estação de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Ministério da Agricultura

Departamento de Difusão de Tecnologia – DDT



Brasília, DF

**LEVANTAMENTO INTEGRADO PARA COLETA
DE RECURSOS GENÉTICOS NA AMAZÔNIA
COM UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM**

Brasília, DF

1984



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Vinculada ao Ministério da Agricultura

Departamento de Difusão de Tecnologia – DDT

Brasília, DF

**LEVANTAMENTO INTEGRADO PARA COLETA
DE RECURSOS GENÉTICOS NA AMAZÔNIA
COM UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM**

Salomão Schattan

Departamento de Difusão de Tecnologia

Brasília, DF

1984

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA-DDT

SCS, Quadra 8, Bloco B, n.º 60

Supercenter Venâncio 2000, 4.º andar, s/440

Telefone: (061) 225-3870

Telex: (061) 1620 ou (061) 1524

Caixa Postal 04-0315

70312 Brasília, DF

Tiragem: 1.000 exemplares

Schattan, Salomão

Levantamento integrado para coleta de recursos genéticos na Amazônia com utilização das técnicas de amostragem. Brasília, EMBRAPA-DDT, 1984.

22p. (EMBRAPA-DDT. Documentos, 11).

1. Germoplasma – Coleta – Brasil – Amazônia. 2. Planta perene – Germoplasma – Pesquisa – Brasil – Amazônia. 3. Recurso genético – Pesquisa – Brasil – Amazônia. I. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Departamento de Difusão de Tecnologia, Brasília, DF. II. Título. III. Série.

CDD 575.1

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	6
POTENCIALIDADE VEGETAL DA AMAZÔNIA - ESPÉCIES PRIORITÁRIAS PARA COLETA DE MATERIAL GENÉTICO	8
EXPEDIÇÕES PARA COLETA DE MATERIAL GENÉTICO NA AMAZÔNIA	8
VARIABILIDADE GENÉTICA - ABORDAGEM TEÓRICA	10
AMOSTRAGEM	12
Universo Estatístico	13
Estratificação do Universo Estatístico	13
Unidades Naturais	14
Estrutura da Amostra e seu Dimensionamento (Esquema teórico)	15
Levantamento Piloto	16
LEVANTAMENTO PILOTO PARA <i>HEVEA BRASILIENSIS</i>	17
Universo Estatístico e Sistema de Referência	18
Dimensionamento da Amostra	19
Unidades de Amostragem	29
Instrumentos de Coleta das Informações	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

LEVANTAMENTO INTEGRADO PARA COLETA DE RECURSOS GENÉTICOS NA AMAZÔNIA COM UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE AMOSTRAGEM

Salomão Schattan¹

RESUMO - Este trabalho, que enfatiza a importância do germoplasma vegetal disponível na Amazônia, apresenta uma crítica aos objetivos e à organização das expedições de coleta de germoplasma nessa região. Em contrapartida, propõe uma amostra probabilística que visa a eliminar os efeitos perversos provocados pelas amostras intencionais amplamente utilizadas pelos fitotecnistas e estabelecer um fio condutor para as sucessivas expedições de coleta de material genético.

Alguns aspectos teóricos dos problemas da amostragem probabilística de material genético, abordados recentemente nas revistas científicas, são discutidos.

Este é o primeiro estudo do dimensionamento de uma amostra probabilística de espécie perene na Amazônia.

Afortunadamente, a análise teórica da distribuição de alelos nos locus dos cromossomos conclui que 95% das amostras probabilísticas contendo entre 50 e 100 gametas de uma população, das espécies analisadas conterão, pelo menos, um representante de cada um dos alelos, cuja frequência na população seja igual ou superior a 5%. Estes são os alelos de importância prática para o melhorista.

Foram feitas algumas considerações teóricas sobre pontos da Teoria de Amostragem e sobre Levantamento Piloto, relevantes ao entendimento de todo processo.

É proposta a execução de um Levantamento Piloto para *Hevea Brasiliensis*, em que serão pesquisados os problemas práticos resultantes da necessidade de retirar amostra aleatória nos diversos estágios do processo de amostragem. Ela inclui detalhes de execução e se expõe à metodologia a seguir.

A análise dos dados resultantes do Levantamento Piloto, feita com o auxílio da teoria da amostragem, permitirá o delineamento e o dimensionamento de uma amostra eficiente para os objetivos propostos.

Termos para indexação: Germoplasma – Plantas perenes – Amostra probabilística.

¹ Engenheiro – Agrônomo Assessor da Presidência da EMBRAPA

SAMPLING TECHNIQUES FOR INTEGRATED GENETIC RESOURCES RECOLLECTION IN THE AMAZON REGION

ABSTRACT - This study emphasizes the importance of vegetal germplasm in the Amazon region and criticizes the objectives as well as the organization of germplasm recollection expeditions that have been conducted in the region. It proposes "random sampling" to establish a guideline for the succeeding expeditions and to avoid the effects of "purposive samples" currently utilized by plant breeders.

Some theoretical points of probability sampling for germplasm recollection, recently published in scientific reviews, are discussed here.

This is the first study that considers the random sample size determination of a perennial species in the Amazon region.

Fortunately the theoretical analysis of allele distribution in chromosome **locus** revealed that the important alleles of any population, considering the plant breeder's point of view, will almost always be captured in a relatively small random sample.

To ease the understanding of the whole process some sampling and Pilot survey basic points were described.

It is proposed a Pilot survey for *Hevea Brasiliensis* to investigate the practical problems raised by a random sample to be taken in the Amazon region. The corresponding sampling methodology as well as some practical details are suggested and analysed.

The size of an efficient sample for *Hevea Brasiliensis* will be determined by the application of the sampling theory to the data obtained on the pilot survey proposed.

Index terms: Germplasm, Perennial trees, Random sample.

INTRODUÇÃO

O aumento da população da terra é um fato que tem sido discutido amplamente, sendo que as últimas estimativas apontam para um novo patamar quando, no século XXI, a população total atingir cerca de dez bilhões de habitantes.

Para que o suprimento de alimentos e matérias-primas, **per capita**, permaneça nos níveis atuais, seria necessário que a área cultivada ou a produtividade da agricultura aumentassem mais do dobro. Na realidade, o que se espera é que tanto a área total cultivada como a produtividade aumentem simultaneamente, de tal forma que a agricultura possa atender às necessidades da humanidade.

Compreende-se que sendo maior no futuro o aumento da produtividade, melhor e mais seguro será o suprimento de produtos agrícolas.

O aumento da produtividade de uma cultura depende basicamente da conjugação de dois fatores, que são a seleção de variedades melhoradas mais produtivas e a pesquisa de técnicas de produção que permitam às plantas realizar todo seu potencial de produção.

Neste contexto, não é difícil perceber a importância de novas variedades menos susceptíveis aos problemas de cultivo, como a falta de água, temperaturas extremas, ataques de pragas e moléstias, ou então de variedades cujo produto seja de melhor qualidade, no que se refere, por exemplo, ao tipo e à quantidade de óleo por unidade do produto ou mais proteína e de melhor qualidade etc.

Estas novas variedades estão sendo continuamente pesquisadas pelos melhoristas através das técnicas de seleção e hibridação e, mais recentemente, através das técnicas da engenharia genética.

Entretanto, o melhorista não pode criar as variedades do nada, e seu trabalho só pode chegar a bom termo quando o banco de germoplasma com que trabalha contém o material genético que lhe permita criar plantas com as características desejáveis através da recombinação de gens que existem em plantas diferentes.

A floresta amazônica constitui talvez o maior repositório de material vivo ainda não explorado, o qual vem sendo percorrido por expedições científicas nacionais e estrangeiras para coleta de material genético.

A importância deste material para o futuro da humanidade já é muito grande e pode, no futuro, tornar-se fundamental.

Por isso torna-se necessário, agora, além de pesquisar novos métodos de coleta, completar as coletas feitas com objetivos fitotécnicos com outros objetivos, possibilitando o enriquecimento das coleções de germoplasma com o máximo de variabilidade genética das espécies vegetais de valor econômico e a acumulação de informações que permitirão o melhor uso daquelas coleções.

Especialmente para a agricultura é importante que sejam feitos os estudos que relacionem a riqueza vegetal da região com o meio ambiente, para melhor aproveitamento do material coletado quando levado para cultivo.

Estas diversas metas só poderão ser atingidas com expedições de coleta de objetivos múltiplos conduzidas por equipes multidisciplinares.

POTENCIALIDADE VEGETAL DA AMAZÔNIA ESPÉCIES PRIORITÁRIAS PARA COLETA DE MATERIAL GENÉTICO

Do que se conhece da região amazônica e considerando apenas as espécies que aí ocorrem com maior frequência, e sobre as quais foram publicados trabalhos, enumeramos os seguintes itens: seringueira, babaçu, caiaué, cacau, castanha-do-Brasil, pupunha, guaraná e mogno.

Sabe-se que existe na região amazônica ainda pouco explorada uma grande riqueza vegetal na área das essências florestais, dos frutos tropicais, das plantas medicinais, forrageiras e ornamentais, e das plantas produtoras de óleos essenciais, resinas, raízes, tubérculos e óleos carburantes ou comestíveis.

Embora bastante ampla, a enumeração que fizemos refere-se, provavelmente, a uma pequena parte do potencial vegetal da região.

A determinação de prioridade para a coleta de material genético terá que ser feita levando em conta a importância econômica do produto, as políticas governamentais para o setor agrícola e a urgência de preservação das espécies em face da penetração da fronteira agrícola com a conseqüente eliminação da flora na região. Levando em conta esses pontos, pode-se estabelecer como primeira prioridade para as coletas de seringueira o cacau e caiaué; e uma segunda prioridade para a castanha-do-Brasil, guaraná, pupunha, babaçu e mogno.

EXPEDIÇÕES PARA COLETA DE MATERIAL GENÉTICO NA AMAZÔNIA

A extensão territorial e a diversidade vegetal são imensas na floresta amazônica, e as condições para sua penetração são extremamente difíceis. Talvez a conjugação destes fatores tenha levado os cientistas a uma abordagem restrita e imediatista no encaminhamento de seus problemas. Desta forma, as expedições científicas na Amazônia, tanto nacionais como internacionais, têm sido conduzidas como esforços isolados sem um fio condutor capaz de unificá-las.

Quando comandadas por melhoristas, o objetivo é encontrar o "melhor" material genético, ou seja, plantas especiais de determinada espécie, supostamente capazes de resolver os problemas do momento. Se comandam botânicos, trata-se então de descrever a flora em geral e coletar a maior quantidade de material para herbário.

Atualmente, o planejamento das expedições é feito nas instituições onde trabalham esses cientistas, sem colaboração de pesquisadores e de instituições afins ou complementares. Trata-se efetivamente de uma situação confortável e talvez conveniente do ponto de vista do pesquisador isolado, mas não do ponto de vista coletivo ou social.

A opinião dos especialistas é que, formulada uma política geral de coleta de material genético, as expedições deverão recolher não só o material necessário ao fitotecnista, mas também material e informações requeridas pelo botânico e ecólogo, o que só será possível quando a responsabilidade da expedição deixar de ser de um só especialista para ficar a cargo de um grupo interdisciplinar.

No entanto, a adoção desta nova postura deverá apresentar dificuldades, pois exige uma mudança radical da visão do problema de coleta e, portanto, da forma de realização do trabalho, e os hábitos não mudam facilmente, mesmo quando se trata de uma comunidade de cientistas.

Entretanto, há razões de sobra que justificam tal mudança. Em consequência das condições em que é feita a coleta, as expedições têm custo elevadíssimo e sua eficiência (relação custo-benefício) fica reduzida ao se perseguir um único objetivo, quando se poderia obter resultados mais amplos com o mesmo dispêndio de esforços e gasto de recursos.

Além da questão da eficiência do uso dos recursos, há uma crítica fundamental à orientação técnica das expedições de coleta de material genético conduzidas por melhoristas. Trata-se de que a coleta em si vem sendo orientada no sentido de encontrar as plantas especiais, isto é, com aquelas características (principalmente produtividade) que, aparentemente, podem resolver os problemas com que os melhoristas se defrontam no momento.

Ora, está provado que esta prática reduz a variabilidade genética contida nos bancos de germoplasma constituídos com o material assim coletado e, com isso, o material genético disponível pode não conter os elementos capazes de levar à solução dos problemas que fatalmente se apresentam para as culturas, a médio e longo prazos, mesmo que a espécie em seu habitat natural contenha aqueles elementos.

O ideal seria que os bancos de germoplasma de uma espécie contivessem um conjunto de plantas que encerrassem representantes de todos alelos disponíveis na vegetação natural nos locais em que a espécie se encontra.

Para que isso ocorra, será necessário delinear e aplicar uma nova estratégia para a coleta de material genético. Só há uma forma de se garantir que as coletas trarão todo material genético desejável, qual seja, a pesquisa dos métodos de amostragem apropriadas a este problema.

Este enfoque para o problema é relativamente recente, e a maioria dos trabalhos nesta área foi feita com espécies de ciclo anual em regiões civilizadas de fácil acesso.

Para espécies perenes, os estudos têm-se limitado à análise qualitativa do problema, em que a orientação para o dimensionamento de uma amostra baseia-se nas características da fisiologia reprodutiva.

VARIABILIDADE GENÉTICA – ABORDAGEM TEÓRICA

A distribuição das populações no interior do “universo estatístico” é condicionada pela forma como se processa a reprodução. Por isso, o estudo da fisiologia da reprodução pode fornecer informações de natureza qualitativa, importantes para o delineamento da amostra.

Sabe-se que, havendo autopolinização, é provável que as populações se apresentem como linhas de indivíduos homocigotos. Por outro lado, quando predomina a polinização cruzada a população consistirá, principalmente, de indivíduos heterocigotos e, neste caso, a variação dentro das progênies constituirá a maior parte da variabilidade genética presente.

Portanto, o balanço entre o número de unidades de amostragem a retirar de cada uma das populações e o número de sementes de cada planta dependerá em grande medida da forma como se processa a reprodução e do grau de autocompatibilidade.

É preciso saber ainda se as populações são homogêneas ou heterogêneas. Esta categorização pode ser cruzada com a de homocigotos e heterocigotos, dando assim uma idéia da complexidade ou da difusão da variabilidade.

O dimensionamento de uma amostra depende da variabilidade das variáveis relevantes.

O elemento básico na transmissão dos caracteres hereditários são os alelos, sendo importante o número médio de alelos por *locus*.

Marshall & Brown (1975) apresentam distribuições teóricas de alelos, em populações de diferentes perfis genéticos. Estas distribuições mostram que em populações grandes podem ocorrer quantidades enormes de alelos (número virtualmente infinito), mas a quase totalidade desses alelos apresenta frequência muito baixas.

Do ponto de vista de praticabilidade dos trabalhos de coleta para melhora-mento, são importantes os alelos comuns, isto é, os que aparecem na população com frequência superior a 5%. As distribuições teóricas mostram que é de dois a quatro o número de alelos por *locus* com frequência superior a 5%.

Os estudos teóricos são confirmados pelas pesquisas realizadas com população de *Avena barbata*, *Drosophila willistoni* e *Homosapiens*, onde foram encontrados em média dois alelos por *locus* com frequência superior a 5%.

Do ponto de vista da distribuição dos alelos comuns, isto é, cuja frequência é superior a 5%, convém diferenciar os que são comuns em grande número ou na maioria das populações, daqueles que só são comuns em algumas populações em locais determinados. Estes últimos considerando todo “universo estatístico” não seriam comuns.

Está claro que do ponto de vista da amostragem não precisamos nos preocupar com os comuns em um grande número de populações, porque fatalmente eles

estarão representados na amostra. Entretanto, os que são comuns em poucas populações localizadas têm importância e merecem atenção especial no esquema de amostragem, já que a inclusão dos alelos comuns destas populações na amostra somente ocorre se as populações correspondentes fizerem parte da amostra.

Suponhamos uma população com dois alelos independentes por locus, sendo a frequência de um deles igual a 95% e a do outro 5%. Se admitirmos que os cruzamentos se fazem de maneira aleatória, então de cada 100 amostras de 59 gametos retirados de maneira aleatória irrestrita da população, 95 delas conterão pelo menos uma cópia de cada um dos alelos de cada locus.

Consideremos um caso limite em que fossem vinte os alelos e a frequência de cada um igual a 5%. Neste caso, amostras irrestritas aleatórias de 120 gametos teriam probabilidade igual a 95% de incluir pelo menos uma cópia de cada alelo.

Estas considerações teóricas indicam que, na maioria das populações, uma amostra irrestrita aleatória de 50 a 100 gametos seria suficiente para garantir a recuperação da riqueza genética, passível de utilização prática, existente nas populações, pois a maioria das espécies não tem em média mais que dois alelos por locus.

Trata-se, sem dúvida, de um número surpreendentemente pequeno. Nestas condições, bastaria localizar o número desejado de populações da espécie em estudo, na área previamente definida, retirando de cada uma dessas populações de 50 a 100 gametos, ao acaso, estando então garantida a recuperação de toda variabilidade genética útil.

Essas considerações sobre a variabilidade genética têm a vantagem de mostrar que é possível garantir o sucesso da coleta, isto é, garantir a coleta de toda variabilidade genética passível de utilização prática existente em uma população.

Entretanto, a aplicação prática destas conclusões teóricas não pode ser feita de maneira direta, pois a retirada de uma amostra irrestrita aleatória de uma população distribuída sobre uma área desconhecida apresenta problemas práticos de difícil solução.

Em primeiro lugar, as populações não estão distribuídas ao acaso no interior do "universo estatístico". Por outro lado, é praticamente impossível criar um sistema de referência completo e sem duplicações, para os gametos existentes em uma população grande, em dado momento, condição indispensável para a retirada de uma amostra irrestrita aleatória.

Conquanto existam, os alelos são invisíveis para o coletor de material, pois o que se vê são suas manifestações fenotípicas. Portanto, os alelos em si não podem guiar a retirada da amostra.

Será necessário então estudar os componentes da variância de características fenotípicas como substituto de características genéticas.

Aparece então outra dificuldade porque só parte do genotipo se manifesta no

tenotipo e, portanto, o estudo dos componentes da variância de variáveis fenotípicas não garante o pleno conhecimento da distribuição da variabilidade genética.

AMOSTRAGEM

Interessa ao melhorista e conservador da espécie a formação de um banco de germoplasma constituído de plantas, cuja estrutura genética seja tal que contenha o máximo de variabilidade genética disponível na natureza.

Como vimos, as expedições em que se coleta uma amostra intencional de plantas da espécie não levam à constituição de um banco de germoplasma como o acima descrito.

Por outro lado, as considerações teóricas sobre a variabilidade genética das espécies indicam claramente que uma pequena amostra irrestrita aleatória de gametas conterá toda variabilidade genética disponível da espécie.

Ora, o material genético que se destina à preservação da espécie é gerado no interior das plantas através do processo reprodutivo. Na verdade, as sementes produzidas ao longo de um ciclo vegetativo contêm a variabilidade genética da espécie na forma de alelos.

Portanto, em um dado período vegetativo, ou seja, em determinado ano, a variabilidade genética da espécie não é conhecida, mas é determinada e finita, e os alelos são os portadores da herança das características das plantas.

Assim, o problema prático da constituição de um banco de germoplasma satisfatório estará resolvido quando for solucionado o problema da retirada de uma amostra irrestrita aleatória de plantas da espécie e de uma amostra aleatória de gametas ou de sementes das plantas escolhidas.

A estatística é uma ciência exata e a aplicação da amostragem, um ramo da estatística, se faz dentro de critérios bem definidos que devem ser satisfeitos para que os resultados esperados sejam atingidos. Nestas condições, para se obter uma amostra probabilística de semente que contenha os alelos desejados, será necessário definir as condições em que elas devem ser retiradas, as quais, no momento, são desconhecidas.

Estas condições de retirada da amostra só serão conhecidas através de um trabalho de pesquisa, capaz de definir:

- a) o universo estatístico e sua estratificação;
- b) as unidades de amostragem;
- c) um esquema de amostragem apropriado; e
- d) as características das plantas e das sementes, cuja medição permitirá dimensionar a amostra.

Faremos a seguir algumas considerações sobre cada um desses itens em relação

ao problema que nos interessa.

Universo estatístico

A área da Amazônia legal é de aproximadamente 450 milhões de hectares, e nenhuma das espécies vegetais que agora nos interessa se distribui ao longo de toda essa superfície. Cada espécie ocupa seu próprio espaço no interior da floresta amazônica, em associação com outras espécies.

Se considerarmos a área geográfica no interior da qual a espécie ocorre, veremos que as populações e mesmo as plantas dentro da população não têm distribuição uniforme. A forma de reprodução da espécie, as condições de clima e solo, a concorrência das demais espécies e a capacidade de adaptação da espécie são fatores importantes para explicar a forma de ocupação do espaço pela espécie.

Entretanto, em dado momento, se pretendemos obter uma amostra que nos leve a determinado objetivo, teremos que considerar todos os fatores permanentes ou fortuitos que levaram a espécie para a atual situação como que cristalizados.

Em consequência, o processo de amostragem independe destes fatores, a menos que eles possam ser classificados, servindo então como elementos de estratificação.

A parte da superfície da Amazônia onde se localiza a espécie corresponde ao "universo estatístico". O conjunto das plantas da espécie situado no interior do "universo estatístico" é que será amostrado.

A determinação dos limites de ocorrência da espécie no interior da floresta será feita pelos especialistas (fitotecnistas, botânicos, ecólogos) que trabalham na Amazônia e terá que se basear no conhecimento desses especialistas e nas informações disponíveis. Será necessário recolher e sistematizar, para cada espécie, as informações contidas em relatórios das expedições passadas, nos herbários nacionais e estrangeiros, e nos relatórios de trabalhos do projeto RADAM em um conjunto de pontos da floresta amazônica.

Com isso, espera-se delimitar com certa precisão o perímetro dentro do qual se encontra a espécie; dividir a área de ocorrência em subáreas de ocorrência de ecotipos já conhecidos; e, finalmente, estudar a possibilidade e conveniência de proceder à estratificação segundo o tipo de solo e as condições de clima.

Em qualquer caso, as plantas formam, em geral, conglomerados menores que são as populações.

Estratificação do Universo Estatístico

Os indivíduos de uma população a estudar podem ser mais ou menos complexos, mas sempre limitamos os objetivos das pesquisas à análise de umas poucas ca-

racterísticas. É a variabilidade dessas características e o grau de precisão com que precisamos conhecê-las, que determinam o tamanho necessário da amostra. A teoria da amostragem diz que o tamanho da amostra é função da variabilidade das variáveis que desejamos estudar.

Uma forma eficiente de se reduzir a variabilidade de cálculo é dividir o "universo estatístico" em partes, ou estratos, no interior dos quais os indivíduos apresentam menos diferenças para as características em que estamos interessados, com o máximo de diferença entre as médias dessas características nos estratos.

No caso das espécies vegetais, uma vez definidos os limites geográficos (perímetro) em cujo interior a espécie se encontra, será conveniente estudar a possibilidade de estratificação.

Espera-se que fatores ecológicos tenham influência nas diferenças genéticas geradas ao longo do tempo.

O tipo de solo, o regime pluviométrico e as variações de temperatura são características ecológicas sobre as quais dispomos de informação apreciável.

Apesar da idéia generalizada de que o clima e o solo da Amazônia são mais ou menos uniformes, a fixação das espécies em áreas determinadas, e não em outras, levam a crer que a suposta uniformidade é mais aparente que real.

Assim, parece conveniente definir estratos geográficos, com base na conjugação simultânea de diferenças de solo, chuva e temperatura, a fim de se determinar **a posteriori** se efetivamente aos estratos assim definidos correspondem diferenças estatisticamente significativas de características fenotípicas e se as análises de eletroforese permitem afirmar que há entre as populações daqueles estratos diferenças genéticas.

Neste caso, havendo diferenças significativas, espera-se que a amostra estratificada seja mais eficiente do que uma amostra irrestrita aleatória do mesmo tamanho, proporcionando assim maior quantidade de informação ou, então, captando maior proporção da variabilidade genética.

De qualquer forma, os ganhos de eficiência resultante da estratificação só podem ser aferidos **a posteriori**.

Unidades Naturais

Nosso objetivo é extrair de seu **habitat** natural e implantar em um banco de germoplasma as plantas que contenham a maior quantidade possível da variabilidade genética disponível da espécie, a fim de garantir a possibilidade de aproveitar para efeito de melhoramento no sentido amplo os caracteres hereditários nela contidos.

Na base da transmissão dos caracteres hereditários estão os alelos, cuja busca

não pode ser feita de forma direta, porque nossos sentidos não os percebem. Sabemos, porém, que eles se localizam no interior dos gametos masculinos e femininos, que são as primeiras unidades naturais no processo reprodutivo passíveis de serem amostrados. A conjugação dos gametos dá origem às sementes que constituem a segunda unidade natural e que de alguma forma poderão ser amostradas. As outras unidades naturais no processo reprodutivo são o conjunto de sementes no interior de um fruto, o conjunto de frutos numa infrutescência, quando existe, e finalmente a planta com o seu conjunto de frutos ou infrutescências.

Na área de ocorrência da espécie, isto é, no interior do universo estatístico, encontramos as populações, agrupamentos de plantas da espécie as quais devem diferir geneticamente entre si em maior ou menor grau.

Assim, a variabilidade genética se distribui da seguinte forma entre suas unidades naturais: entre as populações da espécie ou subespécie (ecotipo); entre as plantas de uma mesma população; entre os frutos de uma mesma infrutescência ou simplesmente entre os frutos quando não houver infrutescência; e entre as sementes de um mesmo fruto. Poderíamos ainda amostrar o pólen de uma flor ou os ovários de um conjunto de flores para se proceder à polinização dirigida.

Enumeramos então em escala descendente as seguintes unidades naturais: população, planta, infrutescência (quando existe), fruto, semente e óvulo e pólen (gametos).

Estrutura da amostra e seu dimensionamento (esquema teórico)

A existência de unidades naturais bem definidas e em patamar sugere que se faça a identificação das unidades de amostragem com as unidades naturais. Nestas condições parece lógico adotar o esquema de estágios múltiplos em que a cada patamar da natureza possa corresponder um estágio de amostragem.

Assim, as unidades de primeiro estágio seriam as populações amostradas em cada um dos estratos e as plantas, unidades de segundo estágio, amostradas no interior da população.

Uma vez selecionada a amostra de plantas da população, pode-se adotar, conforme a espécie a trabalhar, diversos critérios, a saber: colher todos os frutos de cada planta, separando todas as suas sementes para então retirar uma amostra de sementes, caso necessário; ou, então, retirar uma amostra dos frutos e, dependendo do número de sementes por fruto, manter todas as sementes de cada fruto ou então extrair uma amostra das sementes de cada fruto.

Ao proceder desta forma teremos uma amostra probabilística das sementes da espécie, pois o “acaso” foi sendo introduzido na amostra em seus diversos estágios, garantindo assim a recuperação da variabilidade genética da espécie, disponível na natureza.

Para o dimensionamento da amostra, isto é, determinação do número de unidades de amostragem a selecionar em cada estágio, a teoria da amostragem apresenta requisito ou exige definições quanto ao grau de precisão das estimativas e ao seu nível de segurança. A seguir, é necessário conhecer os componentes de variância e os custos pertinentes ao esquema de amostragem adotado.

Levantamento Piloto

Não é possível iniciar, desde logo, o trabalho sistemático de coleta do material genético de qualquer uma das espécies prioritárias que nos interessam porque não dispomos do conhecimento para resolver na prática as questões que a análise teórica coloca como básicas e indispensáveis para a retirada de uma amostra probabilística, indispensável ao nosso objetivo.

A forma de se quebrar o círculo vicioso – o trabalho de campo não é iniciado de forma apropriada por falta daqueles conhecimentos, e não se dispõe dos conhecimentos porque não se inicia o trabalho – está na execução de um “levantamento piloto”.

O objetivo de um levantamento piloto é pesquisar as condições para a retirada de amostra aleatória, definir o esquema de amostragem a ser adotado nos levantamentos futuros e dimensionar a amostra que permitirá atingir os objetivos preestabelecidos para o levantamento.

Para atingir estes objetivos será necessário, no decurso do levantamento piloto, resolver os problemas práticos da introdução da aleatoriedade na seleção da amostra, determinar os componentes da variância daquelas variáveis consideradas relevantes e, finalmente, estimar os componentes de custo, separando aqueles que dizem respeito à expedição, como um todo, daqueles que dependem do número de unidades de amostragem coletadas.

Dois tipos de metodologia se fazem necessários

O primeiro tipo de metodologia inexistente e terá que ser desenvolvido no decurso dos trabalhos de preparação do “levantamento piloto” e de sua execução, isto é, durante os trabalhos de campo. Ela diz respeito à introdução do conceito científico de “acaso” na coleta de material genético, a fim de garantir que a amostra do material seja efetivamente representativa de determinadas características da espécie, na região pesquisada. Será necessário definir critérios de seleção das populações, de delineamento de uma população dada, de estimativa da área que ela ocupa e do cálculo da densidade da espécie nessa área; de seleção aleatória de indivíduos no interior da população; de seleção de inflorescências em uma planta e das sementes dentro de cada inflorescência.

Além do desenvolvimento desta parte da metodologia será necessário selecionar parâmetros que configurem as características ecológicas da região, onde a população se encontra, as características fenotípicas das plantas e as características genéticas a serem definidas através da eletroforese. Todas essas informações terão que ser recolhidas em questionários apropriados.

A definição das informações a coletar e a elaboração dos questionários a serem preenchidos terão que ser feitas por um grupo de cientistas que trabalham na Amazônia, devendo haver um grupo para cada espécie a ser levantada.

O segundo tipo de metodologia se refere à amostragem que será aplicada aos questionários devidamente preenchidos por ocasião do "levantamento piloto".

As estimativas dos componentes de variância e de custo obtidas através do "levantamento piloto" de cada espécie serão usadas para a escolha do esquema de amostragem mais apropriado e para dimensionar a amostra ótima.

LEVANTAMENTO PILOTO PARA *Hevea Brasiliensis*

A *Hevea brasiliensis* está, no momento, entre as espécies vegetais da Amazônia que apresentam grande importância econômica. O Governo federal tem desenvolvido programas através da SUDHEVEA (PROBOR I, II, III), com o objetivo de implantar grandes áreas de cultura da seringueira, cuja produção substituiria a borracha atualmente importada, tornando o País auto-suficiente desta matéria-prima.

Para que esta substituição de importação seja feita em condições econômicas favoráveis, é necessário que as novas plantações sejam altamente produtivas e que seu custo de produção por unidade de produto seja no máximo equivalente ao preço vigente no mercado internacional.

Esta competitividade do produto nacional dependerá evidentemente das características genéticas dos clones desenvolvidos pela pesquisa e entregues aos fazendeiros para a reprodução, o que por sua vez dependerá, em certa medida, do material genético disponível nos bancos de germoplasma.

Deve-se considerar ainda que, a médio e longo prazos, as condições de cultivo tendem a se modificar, tanto no que se refere aos problemas criados pelo meio ambiente à cultura (problema de ecologia) quanto às técnicas de cultivo propriamente ditas, apesar de se tratar de um cultivo permanente de longa duração.

A manutenção da alta produtividade e, portanto, da competitividade acima mencionada dependerá da criação de novos clones que melhor respondam às novas condições, o que estará condicionado à disponibilidade do material genético apropriado.

Universo Estatístico e Sistema de Referência

Nosso "universo estatístico" é constituído do conjunto das populações de *Hevea Brasiliensis* atualmente existentes no interior da Amazônia, e para tirar uma amostra dessas populações é preciso dispor de algum "sistema de referência" completo e sem duplicações. Infelizmente, tal sistema de referência ainda não foi constituído.

Parece que uma forma de resolver parcialmente este problema consiste na utilização das informações sobre seringais nativos em exploração. Fomos informados de que os seringalistas (donos dos seringais nativos) recorrem ao Banco da Amazônia S.A. (BASA) para financiar suas despesas de custeio. O Banco para realizar a operação exige um Projeto, que deve ser analisado e aprovado pelo agente da EMBRATER. Além dos dados sobre o financiamento, o projeto inclui informações relativas ao seringal.

Os registros administrativos do BASA e da EMBRATER deverão ser organizados para constituir o primeiro sistema de referência para a amostragem da *Hevea Brasiliensis* na Amazônia.

A qualidade deste sistema de referência poderá ser testada por ocasião do levantamento piloto mediante a enumeração dos seringais nativos existentes na região visitada e a verificação de sua inclusão na lista previamente organizada. Esta verificação permitirá estimar a proporção de seringais não incluídos, dando assim uma idéia de sua adequação ao nosso objetivo.

A exploração do seringal é organizada através das colocações. Acreditamos que, o conjunto dos seringais nativos em exploração não inclui a totalidade das populações de *Hevea Brasiliensis* da Amazônia, e acreditamos igualmente que o conjunto das colocações de um seringal pode não incluir todas populações de *Hevea Brasiliensis* existentes no seringal.

Nestas condições, a utilização deste sistema de referência para a nossa amostragem torna necessário a montagem de um esquema que permita, por ocasião do levantamento piloto e dos levantamentos futuros, estimar a densidade das populações e a densidade das plantas no interior das populações, a fim de avaliar o nível de cobertura dado pelo sistema de referência em uso e determinar a direção dos esforços para sua melhoria.

Neste ponto é importante lembrar que os objetivos básicos do levantamento piloto, a saber: a busca de soluções para o problema prático de introdução da aleatoriedade na seleção da amostra; e a conseqüente validade para a estimativa do tamanho da amostra não ficam comprometidos com os problemas possivelmente existentes no sistema de referência. Apesar das possíveis deficiências, não dispomos de nada melhor; na verdade é o único de que dispomos.

Acreditamos que a amostra extraída desse sistema de referência nos fornecerá estimativas apropriadas dos "parâmetros" que buscamos e que elas serão indicado-

ras válidas para estruturar e dimensionar uma amostra que estará certamente na região do "ótimo".

Tranquiliza-nos o fato de estarmos iniciando um processo em que as expedições sucessivas trarão informações que certamente levarão ao seu aperfeiçoamento, garantindo assim que depois de certo tempo se atinja o ponto ideal desejado.

Dimensionamento da Amostra

Em um levantamento piloto o tamanho da amostra é fixado em função dos recursos humanos e financeiros disponíveis. Os recursos é que determinam a quantidade de trabalho que se pode realizar. Por outro lado, deve-se ter em conta a necessidade de uma quantidade mínima de informações para estimar os parâmetros relevantes. Não é necessário que essas estimativas sejam feitas com elevado nível de precisão.

Em cada estrato e em cada um dos estágios sucessivos da amostra devemos ter pelo menos duas unidades de amostragem porque é o mínimo que permite o cálculo dos componentes da variância.

Está claro que não devemos aceitar simplesmente este mínimo, procurando realizar o máximo possível com os recursos disponíveis.

Estas considerações é que levarão à definição do número de seringais nativos a serem trabalhados em cada um dos Estados da Amazônia, onde existe a *Hevea Brasiliensis*.

Unidades de Amostragem

Se considerarmos os Estados como estratos naturais ou administrativos, teremos uma primeira estratificação geográfica da Amazônia. No interior de cada Estado, temos os seringais cuja lista será preparada em consulta com os Agentes de Extensão Rural e os Bancos.

Nossa amostra deverá ser constituída de pelo menos dois seringais em cada Estado.

Uma vez selecionado o seringal, far-se-á a lista das colocações existentes em cada um deles.

Será necessário selecionar no mínimo duas colocações em cada seringal, para serem trabalhadas da seguinte forma:

- a) inventário e identificação das seringueiras de cada estrada;
- b) seleção de, pelo menos, duas seringueiras em cada estrada;
- c) providenciar a coleta de todas sementes produzidas pelas plantas selecionadas. Trabalhar todas sementes coletadas ou uma sua amostra. A seleção de uma amostra de sementes dependerá da necessidade de material para as análises de laboratório e plantio.

Uma amostra de colocações no interior de seringal define com precisão um conjunto de ruas e de seringueiras, no interior das quais podemos identificar uma amostra irrestrita aleatória de plantas, com o auxílio de uma tabela de números ao acaso. Estas plantas produzem, durante um período vegetativo, determinada quantidade de sementes, da qual precisamos retirar uma amostra representativa.

Não podemos nos limitar a visitar a colocação em um dado momento para coletar as sementes disponíveis porque, então, a amostra não seria representativa da totalidade de sementes produzidas pelas plantas da amostra e, portanto, da variabilidade genética disponível. Isto porque a produção de sementes das seringueiras de uma população de *Hevea* se processa durante um período de tempo, podendo aparecer plantas precoces, normais e tardias, fenômeno controlado também por fatores genéticos.

Em conseqüência, será necessário manter um esquema de coleta das sementes durante todo o período em que elas amadurecem e caem. O poder germinativo das sementes de *Hevea* baixa rapidamente, sendo por isso necessário montar um esquema que permita a transferência rápida das sementes coletadas para os centros onde serão trabalhadas. A transferência das sementes para o laboratório tende a ser uma operação difícil na medida em que sua coleta se faz no período das águas quando as comunicações na região são mais difíceis.

Instrumentos de Coleta das Informações

As informações sobre a população com a descrição de sua situação geográfica, a forma de acesso, sua dimensão e número de plantas da espécie, as características ecológicas do local onde ela se encontra com a possível retirada de amostra de solos e descrição do tipo de associação vegetal existente, e outras características relevantes da população terão que ser registrados em um questionário especialmente elaborado.

Por outro lado, a determinação dos componentes da variância de características fenotípicas da planta é que ensejará o dimensionamento da amostra, isto é, a determinação do número de populações a incluir na amostra, o número de plantas por população e o número de sementes por planta. Mas é muito grande o número dessas características fenotípicas, tanto qualitativas como quantitativas que se pode categorizar ou medir, sendo que só algumas delas são importantes do ponto de vista da determinação da variabilidade genética.

O problema está em saber quais são estas poucas variáveis fenotípicas que são intimamente relacionadas com a constituição genética da planta.

Os cientistas se interessam, pelo relacionamento fenotipo x genotipo e a análise deste problema pode ser encontrada em estudos de diferente natureza. Uma pesquisa bibliográfica dos trabalhos publicados com "palavras chave", que se rela-

cionam de alguma forma a este problema, poderá trazer informação útil para a seleção das características fenotípicas a incluir no Questionário referente à planta e suas partes constituintes.

As seguintes expressões chave foram sugeridas pelos especialistas

Genetic variation studies
" " tests
" " research
Provenance studies
" tests
" research
Progeny studies
" tests
" research
Genetic resources
Germplasm
Germplasm collection
Center of origin
" of diversification

O grupo de especialistas em *Hevea*, trabalhando atualmente na Amazônia, reunido para assessorar e trabalhar no levantamento piloto terá que organizar os questionários bem como elaborar um manual prático de campo em que serão detalhadas instruções para o preenchimento dos questionários e a descrição das técnicas de medição da população, das medições daquelas características a serem feitas nas plantas e da forma de manipular o material, tanto no campo como no laboratório.

Este manual detalhado tornará possível a uniformização das práticas do campo e das medições requeridas, minimizando assim as diferenças introduzidas nas medições pelos pesquisadores e pelas equipes.

Finalmente será necessário introduzir nos questionários tanto da população como das plantas itens que permitam avaliar os diferentes custos físicos envolvidos no acesso à população, preenchimento dos questionários e manipulação do material no campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOGYO, T.P. et alii. Analysis of sampling strategies for collecting genetic material. *Econ. Bot.*, New York, 34(2):160-74, 1980.

- BRADSHAW, A.D. Population structure and the effects of isolation and selection. In: FRANKEL, O.H. & HAWKES, J.G. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. s.l., Cambridge Univ. 1975. v.2, p.37-51.
- FRANKEL, O.H. & HAWKES, J.E. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. s.l., Cambridge Univ., 1975. v.2.
- JAIN, S.K. Population structure and the effects of breeding system. In: FRANKEL, O.H. & HAWKES, J.G. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. Cambridge Univ., 1975. v.2., p.15-36.
- MARSHALL, D.R. & BROWN, A.H. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: FRANKEL, O.H. & HAWKES, J.G. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. s.l., Cambridge Univ., 1975. v.2, p.53-80.
- OOI, S.C. & RAJANAIDU, N. Establishment of oil palm genetic resources theoretical and practical considerations. **Malays. Appl. Bio.**, 8(1):15-28, 1979.
- QUALSET, C.O. Sampling germplasm in a center of diversity; an example of disease resistance in Ethiopian barley. In: FRANKEL, O.H. & HAWKES, J.G. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. s.l., Cambridge Univ., 1975. v.2, p.81-96.