Boletim

TÉCNICO SIF

Número 05 - Volume 01 Julho 2021

Conservação genética de espécies florestais nativas: número de progênies e indivíduos a conservar para garantir a perpetuação da espécie no ambiente

Andrei Caíque Pires Nunes et al.



CONSERVAÇÃO GENÉTICA DE ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS: NÚMERO DE PROGÊNIES E INDIVÍDUOS A CONSERVAR PARA GARANTIR A PERPETUAÇÃO DA ESPÉCIE NO AMBIENTE

Andrei Caíque Pires Nunes^{2*}, Marcos Deon Vilela de Resende³, Glêison Augusto dos Santos⁴ e Alex Ferreira de Freitas⁵

RESUMO – Com a mudança de paradigmas estratégicos no mundo corporativo e com o surgimento do conceito de gestão ESG (Environmental, social and Governance), amplo foco legislativo e gerencial tem sido dado à conservação de germoplasma florestal. Tendo em vista a necessidade de conservação dos recursos genéticos em projetos de restauração de áreas degradas e conservação de germoplasma, o presente boletim aborda estratégias para estruturação da diversidade genética de germoplasma florestal. A representatividade genética de uma população depende do número de matrizes amostradas (Nf) e do número de indivíduos amostrados por matriz (kf). Esta representatividade pode ser avaliada via tamanho efetivo populacional (Ne) e frequência mínima dos alelos retidos (FAR). De posse do valor de Ne, é possível inferir sobre a frequência de alelos na população original que foi capturada pela amostra via cálculo da FAR referente a cada Ne. Com um Ne de 175 a 200 é possível capturar alelos com frequência de 2%, valor este indicado para conservação de germoplasma **ex situ**. Para espécies alógamas monóicas, com um Ne em torno de 200, Nf de 50 e kf de 100 a endogamia potencial (F = 1/2Ne) é de 0,26%. Para a conservação ex situ um Ne em torno de 150 a 200 é recomendado e para conservação in situ, Ne variando de 500 a 5000 deve ser adotado. Além disso é preciso trabalhar com no mínimo cinco populações diferentes. A amostragem de 60 matrizes e plantio de 20 indivíduos provenientes de cada matriz gerando uma população com tamanho total de 1200 indivíduos possibilita uma amostragem geneticamente correta (Ne em torno de 200) para conservação ex situ de populações alógamas. Para a conservação genética de populações de sistema reprodutivo misto, é preciso considerar uma taxa S de autofecundação e número de indivíduos amostrados por matriz. Uma amostragem geneticamente adequada (Ne em torno de 200) para conservação ex situ em uma população com sistema reprodutivo misto e taxa de autofecundação de 10%, envolve a coleta de sementes em 70 matrizes e plantio de 20 indivíduos por matriz, totalizando 1400 indivíduos na população. Para espécies autógamas, a amostragem de 400 matrizes e um indivíduo por matriz, consegue-se Ne igual a 200. Nesse sentido, a conservação da diversidade genética em populações naturais alógamas deve ser feita com a coleta de sementes em pelo menos 60 matrizes, em populações mistas com taxa de autofecundação de 10%, 70 matrizes e autógamas 400 matrizes.

Palavras-Chave: Tamanho efetivo populacional; Genética de populações; Endogamia; Frequência alélica.



² Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Ciências Agroflorestais, Itabuna, BA - Brasil. E-mail: <andrei.nunes@gfe.ufsb.edu.br>.

³ Embrapa Café, Brasília, DF - Brasil. E-mail: <marcos.deon@gmail.com>.

⁴ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <gleison@ufv.br>.

⁵ Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Viçosa, MG - Brasil E-mail: <alex.freitas@ufv.br>.

^{*}Corresponding author.

Nunes ACP et al.

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria dos reflorestamentos e/ ou projetos de restauração, bem como projetos de conservação de germoplasma tem sido feita de forma a não considerar a genética de populações das espécies. Usualmente, se coletam sementes de uma ou poucas árvores/matrizes e se procedem ao plantio na área a ser restaurada ou a ser conservada, sem quantificar os impactos genéticos dessas ações. No longo prazo, estas ações podem levar ao estreitamento da base genética destas populações, ocasionando à deriva genética e consequente extinção das espécies envolvidas nestes projetos (Arantes et al. 2010, Sonstebo et al. 2018). Para mitigar estes problemas, é necessário estruturar adequadamente a diversidade genética esperada nas populações de conservação de germoplasma florestal.

O passivo ambiental do país e o mercado de mudas seminíferas de espécies florestais nativas voltadas a restauração de paisagens florestais e conservação genética, desenvolveu-se juntamente com o arcabouço da legislação ambiental. Concomitante a isso, a busca da sustentabilidade do agronegócio no Brasil e preservação do patrimônio ambiental, por meio da conservação genética das espécies florestais nativas do país, tem aumentado nos últimos anos. A evolução desta tecnologia e a legislação ambiental caminharam juntas, agregando valor as espécies florestais nativas por meio da prestação do serviço ambientais, uma vez que se tornou obrigação da empresa reparar externalidades negativas ocasionadas pela implantação de seus projetos, por meio de plantios das mesmas espécies suprimidas. Outro fator ainda mais relevante é a mudança de paradigmas estratégicos no mundo corporativo com o surgimento do conceito de gestão ESG - "Environmental, social and Governance" onde práticas empresariais e de investimento que se preocupam com critérios de sustentabilidade - e não apenas com o lucro.

Este novo conceito de gestão lança um olhar mais profundo no contexto da conservação genética da população florestal suprimida com o empreendimento, principalmente com a sustentabilidade/ longevidade da floresta que será implantada para com medida compensatória e ou reparatória. No Brasil, as grandes empresas de capital aberto, esta realidade vem sendo construída desde 2005 com a criação do Índice de Sustentabilidade Empresarial (ISE),

que permite ao investidor direcionar seus recursos às empresas que se encontram em boa posição na avaliação ou, alternativamente, procurar um fundo de investimentos que tenha esta orientação (Freitas 2020). As empresas que se preocupam com sustentabilidade possuem desempenho superior na capitação de fundos para investimentos, melhora de reputação, maior lucratividade e até um aumento do seu valor a longo prazo. Porém é importante ressaltar que as empresas têm a necessidade de externalizar suas ações conectadas a sustentabilidade ecológica, social e econômica, para além da legislação vigente (Gregory, Tharyan, Whittaker (2014); Garcia, Orsato, Mendes-Da-Silva (2017); Giese et al. 2019).

Apesar do arcabouço legal brasileiro no contexto ambiental ser um dos mais bem estruturados do planeta ele não acompanhou a evolução científica no contexto de conservação genética das populações e espécies e precisa ser revisitado para trazer normas que estejam em conformidade com os conhecimentos científicos existentes. Nesse contexto, o presente boletim aborda estratégias para estruturação da diversidade genética de germoplasma florestal.

2. METODOLOGIA

Foram simuladas diferentes estratégias de conservação in situ e ex situ para espécies vegetais alógamas, de sistema reprodutivo misto e autógamas, visando a amostragem de germoplasma e manutenção da diversidade genética a partir de matrizes amostradas em uma população ou várias subpopulações. A representatividade genética de uma população depende do número de matrizes amostradas (Nf) e do número de indivíduos amostrados por matriz (kf). Esta representatividade pode ser avaliada via tamanho efetivo populacional (Ne) e frequência mínima dos alelos retidos (FAR) (Resende e Vencovsky, 1990; Resende 2002). Nesse sentido, para a simulação de amostragem em populações alógamas monóicas, foram calculados Ne, FAR e endogamia potencial média (F) para valores de Nf e kf. No caso de amostragem em subpopulações provenientes de uma população base, reunindo R amostras independentes e iguais em quantidades de propágulos ou indivíduos, cada uma com tamanhos efetivos diferentes Ne1, Ne2,...NeR, foi calculado o tamanho efetivo da amostra composta (Net) reportado por Resende (2002) e o valor de F. Simulou-se também a amostragem em populações com

SOF

sistema reprodutivo misto. Neste caso, o cálculo do Ne, com uma taxa S de autofecundação, considerando igual número de indivíduos amostrados por matriz foi considerado. Para proceder a conservação do germoplasma é preciso ter conhecimento prévio sobre a taxa de autofecundação (S) da população. Para este estudo, foi adotada uma taxa S = 10%. Os valores de Ne e F foram calculados para o caso de amostragem em populações autógamas. Para todos os cenários simulados, foi calculada eficiência da conservação, adotando-se como valor de referência Ne igual a 200 para conservação ex situ e 500 para in situ. Todos os cálculos foram feitos utilizando-se o programa ConservaGen (Nunes, 2021, programa disponível em https://gpfsb.webnode.com/materiais/) e o gráfico no programa R (R Core Team 2021).

3. RESULTADOS

A partir do cálculo de valores de frequência mínima dos alelos retidos (FAR) para diferentes tamanhos efetivos, constata-se que com um Ne de 175 ou 200 é possível capturar alelos com frequência de 2%, valor este indicado para conservação de germoplasma (Figura 1).

Com um Ne entorno de 200, Nf de 50 e kf de 100 a endogamia potencial (F = 1/2Ne) é de 0,26% (Tabela 1).

De acordo com Resende (2002), para conservação ex situ Ne em torno de 150 a 200 é recomendado. Além disso, é preciso trabalhar populações diferentes. É possível obter Ne igual a 200 utilizando diferentes estratégias, de modo a otimizar o número total de

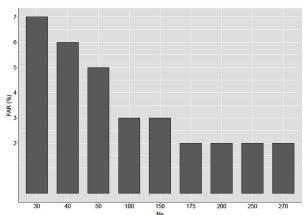


Figura 1 – Valores de frequência mínima dos alelos retidos (FAR) para diferentes tamanhos efetivos (Ne).

Tabela 1 – Número matrizes amostradas (Nf), número de indivíduos amostrados por matriz igual a 100 (kf = 100), número total de indivíduos na população a ser estabelecida (N), tamanho efetivo populacional (Ne), endogamia potencial (F = 1/2Ne) para espécies alógamas monóicas e eficiência da conservação (Ff)

Nf	N	Ne	F	Efi.
			-	Lill.
10	1000	39	1,28%	20%
20	2000	78	0,64%	39%
30	3000	117	0,43%	58%
40	4000	155	0,32%	78%
50	5000	194	0,26%	97%
60	6000	233	0,21%	117%
70	7000	272	0,18%	136%
80	8000	311	0,16%	156%
90	9000	350	0,14%	175%
100	10000	388	0,13%	194%

Efi.: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200).

indivíduos na população a ser estabelecida para conservação (Tabela 2).

Dessa maneira, a amostragem de 60 matrizes e plantio de 20 indivíduos provenientes de cada matriz gerando uma população com tamanho total de 1200 indivíduos possibilita uma amostragem geneticamente correta (Ne em torno de 200) para conservação *ex situ*.

Para o caso de coleta de matrizes em subpopulações diferentes, ao amostrar 4 populações, com Ne igual a 58 (Nf = 15 e kf = 100), obtém-se um tamanho efetivo do composto de 233 (Tabela 3). Com este tamanho efetivo é possível amostrar a população base de uma espécie corretamente.

Considerando espécies com sistema reprodutivo misto, uma população com S = 10% obtém-se um Ne próximo a 200 via amostragem de 70 matrizes e 100 indivíduos por matriz (Tabela 4).

Tabela 2 – Diferentes formas de conseguir tamanho efetivo (Ne) entorno de 200 via variação do número de matrizes amostradas (Nf), número de indivíduos plantados por matriz (kf), otimização do número total de indivíduos (N) e eficiência da conservação (Ffi)

(IV) e ejiciencia da conservação (Eji.).						
N	Nf	kf	Ne	F	Efi	
5000	50	100	194	0,26%	97%	
4000	50	80	193	0,26%	96%	
3000	60	50	226	0,22%	113%	
2400	60	40	223	0,22%	112%	
1800	60	30	218	0,23%	109%	
1200	60	20	209	0,24%	104%	
700	70	10	215	0,23%	108%	
400	80	5	200	0,25%	100%	
240	120	2	192	0,26%	96%	
200	200	1	200	0,25%	100%	

F: endogamia potencial; Ef: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200).

Nunes ACP et al.

Tabela 3 – Número de amostras (Nj), número de famílias coletadas por amostra (Nfj), número de indivíduos por família por amostra (kfj), número total de famílias (Nft), número total de indivíduos na população a ser formada (N), tamanho efetivo de cada amostra (Nej), tamanho efetivo total do composto (Net) e eficiência da conservação (Ffi.).

	(E	Π.).					
Nj	Nfj	kfj	Nft	N	Nej	Net	Efi.
2	5	100	10	1000	19	39	20%
2	10	100	20	2000	39	78	39%
2	15	100	30	3000	58	117	58%
2	20	100	40	4000	78	155	78%
2	25	100	50	5000	97	194	97%
2	30	100	60	6000	117	233	117%
3	5	100	15	1500	19	58	29%
3	10	100	30	3000	39	117	58%
3	15	100	45	4500	58	175	87%
3	20	100	60	6000	78	233	117%
4	5	100	20	2000	19	78	39%
4	10	100	40	4000	39	155	78%
4	15	100	60	6000	58	233	117%
4	20	100	80	8000	78	311	155%
5	5	100	25	2500	19	97	49%
5	10	100	50	5000	39	194	97%
5	15	100	75	7500	58	291	146%

Efi.: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200).

Considerando uma taxa de autofecundação de 10%, é possível obter Ne igual a 200 utilizando diferentes estratégias de amostragem (Tabela 5).

Uma amostragem geneticamente adequada (Ne em torno de 200) para conservação *ex situ* em uma população com sistema reprodutivo misto e taxa de autofecundação de 10%, envolve a coleta de sementes em 70 matrizes e plantio de 20 indivíduos por matriz totalizando 1400 indivíduos na população. Para taxas

Tabela 4 — Número de matrizes amostradas (Nf), número de indivíduos amostrados por matriz igual a 100 (kf = 100), número total de indivíduos na população a ser estabelecida (N), eficiência da conservação (Efi), tamanho efetivo populacional (Ne) e endogamia potencial (F = 1/2Ne) para espécies com sistema reprodutivo misto e taxa de autofecundação de 10%.

Nf	N	Ne	F	Efi.
10	1000	31	1,63%	16%
20	2000	61	0,81%	31%
30	3000	92	0,54%	46%
40	4000	123	0,41%	61%
50	5000	153	0,33%	77%
60	6000	184	0,27%	92%
70	7000	215	0,23%	107%
80	8000	246	0,20%	123%
90	9000	276	0,18%	138%
100	10000	307	0,16%	153%

Efi.: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200).

Tabela 5 – Diferentes formas de conseguir tamanho efetivo (Ne) em torno de 200 via variação do número de matrizes amostradas (Nf), eficiência da conservação (Efi.), número de indivíduos amostrados por matriz (kf) e otimização do número total de indivíduos (N) para população com sistema reprodutivo misto.

população com sistema reprodutivo misto.						
N	Nf	kf	Ne	F	Efi.	
7000	70	100	215	0,23%	107%	
5600	70	80	213	0,23%	106%	
3500	70	50	210	0,24%	105%	
2800	70	40	207	0,24%	104%	
2100	70	30	204	0,24%	102%	
1400	70	20	197	0,25%	98%	
800	80	10	204	0,24%	102%	
450	90	5	193	0,26%	97%	
280	140	2	204	0,24%	102%	
210	210	1	199	0,25%	100%	

F: endogamia potencial; Efi.: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200).

de autofecundação diferentes de 10%, é necessário adequar os cálculos de Ne.

Para espécies autógamas, com a amostragem de 400 linhagens matrizes distintas e um indivíduo por matriz, consegue-se Ne igual a 200 (Tabela 6). O número de indivíduos por matriz não interfere no Ne dado que se trata de espécies autógamas.

Uma pergunta frequentemente realizada é: "qual é o tamanho efetivo de um indivíduo conservado?" Para 1 indivíduo amostrado em uma população alógama tem-se que: (a) indivíduo amostrado via clonagem: Ne = 1; (b) individuo amostrado via alogamia: Ne = 1; (c) individuo amostrado via autofecundação (por exemplo, em coleta em arvore isolada): Ne = 0,67.

Tabela 6 – Número de matrizes amostradas (Nf), número total de indivíduos na população a ser estabelecida (N), eficiência da conservação (Efi.), tamanho efetivo populacional (Ne) e endogamia potencial (F = 1/2Ne) para espécies autógamas.

Nf N Ne F Eft. 10 10 5 10,00% 2% 40 40 20 2,50% 10% 70 70 35 1,43% 18% 100 100 50 1,00% 25% 130 130 65 0,77% 33% 160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75% 400 400 200 0,25% 100%					
40 40 20 2,50% 10% 70 70 35 1,43% 18% 100 100 50 1,00% 25% 130 130 65 0,77% 33% 160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	Nf	N	Ne	F	Efi.
70 70 35 1,43% 18% 100 100 50 1,00% 25% 130 130 65 0,77% 33% 160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	10	10	5	10,00%	2%
100 100 50 1,00% 25% 130 130 65 0,77% 33% 160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	40	40	20	2,50%	10%
130 130 65 0,77% 33% 160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	70	70	35	1,43%	18%
160 160 80 0,63% 40% 190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	100	100	50	1,00%	25%
190 190 95 0,53% 48% 120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	130	130	65	0,77%	33%
120 120 60 0,83% 30% 150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	160	160	80	0,63%	40%
150 150 75 0,67% 38% 250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	190	190	95	0,53%	48%
250 250 125 0,40% 63% 300 300 150 0,33% 75%	120	120	60	0,83%	30%
300 300 150 0,33% 75%	150	150	75	0,67%	38%
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	250	250	125	0,40%	63%
<u>400</u> 400 200 0,25% 100%	300	300	150	0,33%	75%
	400	400	200	0,25%	100%

Efi.: eficiência da conservação, ou seja, proporção do tamanho efetivo calculado em relação ao tamanho efetivo desejado (200). Para 1 indivíduo amostrado em uma população autógama tem-se que: Ne = 0,50.

Os Ne de cada família são dados por (Resende e Barbosa, 2006; Rios et al., 2021): (a) família de meios irmãos: Ne = [4n/(n+3)]; (b) família de irmãos completos: Ne = [2n/(n+1)]; (c) família de irmãos autofecundados (S1): Ne = [n/(n+1/2)]; (d) família de irmãos clonados: Ne = 1; (e) família de irmãos autógamos: Ne = 0,5.

Assim, os tamanhos máximos de família são 4, 2, e 0,67, para meios irmãos, irmãos completos e irmãos autofecundados (S1), respectivamente. Dessa forma, não se justifica tomar grande quantidade de sementes de uma só árvore, por exemplo, no caso de se tomar 50 ou milhares de sementes por uma única matriz, conduz ao mesmo tamanho efetivo, igual a 4 por cada matriz amostrada.

4. CONCLUSÕES

Com a correta amostragem do número de populações e indivíduos amostrados por espécie, é possível garantir a conservação genética das espécies florestais nativas ao longo do tempo.

Para espécies alógamas (condição da maioria das espécies arbóreas) a amostragem de quatro populações distintas para cada espécie, sendo selecionados 15 indivíduos (matrizes) em cada população, somandose 60 indivíduos no total, garante a conservação da variabilidade dessas espécies.

As 15 matrizes a serem selecionadas de cada população, devem estar distantes entre elas para diminuir a possibilidade de essas matrizes serem aparentadas. Recomenda-se pelo menos 500 metros de raio de distância entre cada matriz a ser incluída dentro de uma mesma população.

Para o plantio em campo, recomenda-se que sejam plantadas 20 mudas de cada uma das 60 matrizes que serão utilizadas para conservação genética da espécie, que será alvo do programa de conservação.

Essa nova abordagem prática e estatística sobre conservação genética, que deixa claro o número de genótipos que devem ser trabalhados para garantir a conservação do DNA das espécies ao longo do tempo, pode subsidiar novas políticas públicas e legislações federais e estaduais sobre o tema.

5. REFERÊNCIAS

Arantes FC, Gonçalves PDS, Scaloppi Junior EJ, Moraes MLTD, Resende MDVD (2010) Ganho genético com base no tamanho efetivo populacional de progênies de seringueira. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 1419-1424.

Freitas VP (2020) The new role of companies in the environmental protection; Revista Direitos Democráticos & Estado Moderno | Faculdade de Direito da PUC-SP https://revistas.pucsp.br/index.php/DDEM | N°. 01 | p.02-16.

Garcia AS, Orsato R, Mendes-da-Silva, W (2017) O desempenho ESGEnvironmental, Social and Governanceem diferentes ambientes institucionais. In: 6th International Workshop | Advances in Cleaner Production – Academic Work, 2017, São Paulo. Anais... São Paulo: EAESP-FGV, May.

Giese G. et al. (2019) Foundations of ESG Investing: How ESG Affects Equity Valuation, Risk, and Performance. The Journal of Portfolio Management, v. 45, n. 5, p. 69-83.

Gregory A, Tharyan R, Whittaker J (2014) Corporate Social Responsibility and Firm Value: Disaggregating the Effects on Cash Flow, Risk and Growth. Journal of Business Ethics, v. 124, p 633-657.

Nunes ACP (2021) Programa ConservaGen disponível em https://gpfsb.webnode.com/materiais/. Acesso em: 14 de julho de 2021.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Resende MDV (2002) Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes. Brasília: Embrapa informações tecnológicas, 975p.

Resende MDV, Barbosa, MHP (2005) Melhoramento Genético de Plantas de Propagação Assexuada. Colombo: Embrapa Florestas, v. 1. 130p.

Resende MDV, Vencovsky R (1990) Condução e utilização de bancos de conservação genética de

SØF

Nunes ACP et al.

espécies de *Eucalyptus*. Silvicultura (Sociedade Brasileira de Silvicultura), v. 42, p. 435-439.

Rios EF, Andrade MHML, Resende MFR, Jr, Kirst M, Resende MDV, Filho JEA, Gezan SA, Munoz P (2021) Genomic Prediction in Family Bulks Using Different Traits and Cross-Validations in Pine, G3 Genes|Genomes|Genetics, jkab249, https://doi.

org/10.1093/g3journal/jkab249

Sonstebo JH, Tollefsrud MM, Myking T, Steffenrem A, Nilsen AE, Edvardsen OM, El-Kassaby YA (2018) Genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seed orchard crops: Effects of number of parents, seed year, and pollen contamination. Forest Ecology and Management 411: 132-141.