

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

Fragmentação do hábitat e dispersão dos Anfíbios Anuros: influência da qualidade da matriz sobre a estrutura genética populacional de quatro espécies em uma complexa paisagem no sul da Bahia

Orientador/e-mail: Mirco Solé/mksole@uesc.br

Nome do Candidato/e-mail: Amanda Gomes dos Anjos/amandaanjos09@gmail.com

Nível/Ano de ingresso: Doutorado/2017

Ilhéus, 25/10/2016

RESUMO

Os elementos resultantes do processo de fragmentação do hábitat, como o número, tamanho, forma, isolamento das manchas de hábitat remanescentes, assim como a matriz circundante provocam distintos efeitos nos atributos das espécies (Fahrig, 2003). Particularmente a matriz pode representar uma barreira não permeável que bloqueia a dispersão dos organismos numa paisagem. Em contra partida a matriz também funciona como hábitat alternativo para as espécies, desde que possua características que permitam a sobrevivência das mesmas.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é investigar como a qualidade da matriz influencia a ocorrência e dispersão de quatro espécies de anuros (*Aplastodiscus ibirapitanga*, *Stereocyclops incrassatus*, *Hypsiboas albomarginatus* e *Leptodactylus latrans*) nas paisagens ao entorno da Reserva Ecológica da Michelin. Adotaremos uma abordagem no nível de mancha e de paisagem para compreendermos o efeito das características destes elementos na dispersão das populações. No nível de mancha, consideraremos os fragmentos nos quais as populações serão coletadas. Estes fragmentos serão caracterizados quanto ao tamanho, forma e isolamento entre os demais fragmentos no raio considerado. Por meio de análises genéticas estimaremos o fluxo gênico entre as populações calculado a partir de marcadores microssatélites. Para cada espécie construiremos modelos mistos lineares generalizados (GLMM) para testar como as medidas genéticas das populações variam em função das características dos fragmentos e das paisagens. O Critério de Informação de Akaike (AIC) será utilizado para classificar os modelos e indicar o modelo que melhor explica a variação na estrutura genética das populações. Conduziremos estas análises no ambiente computacional R.

INTRODUÇÃO

A modificação da paisagem e a fragmentação do hábitat ocasionada principalmente pelo avanço da urbanização e agricultura têm sido consideradas como as mais graves ameaças à biodiversidade (Fahrig, 2003; Fischer & Lindenmayer, 2007). A fragmentação do habitat é um processo no qual, um hábitat anteriormente grande e contínuo é

transformado em diversas pequenas manchas isoladas umas das outras por uma matriz de hábitat distinta da original (Wilcove et al., 1986). Os elementos resultantes da fragmentação, como o número, tamanho, forma, isolamento das manchas de hábitat remanescentes, assim como a matriz que as circundam provocam distintos efeitos nos atributos das espécies (e.g. fisiologia, comportamento e estrutura genética) (Fahrig, 2003).

A matriz, definida como a porção de habitat que rodeia os remanescentes de hábitat original, pode influenciar na ocorrência e distribuição dos organismos em uma paisagem fragmentada (Umetsu et al., 2008), influência esta dependente das características apresentadas pela matriz (Ricketts, 2001). Uma matriz com condições e qualidade de hábitat semelhante aos remanescentes naturais pode fazer com que as espécies consigam sobreviver e utilizar a matriz como hábitat alternativo. Dessa forma, a matriz pode funcionar como um condutor, permitindo o movimento dos indivíduos na paisagem; como uma fonte, dando origem a indivíduos que se moverão para as manchas de habitat original remanescentes; ou como dreno, recebendo indivíduos de manchas de habitat original, mas que não deixarão a matriz (Kupfer et al., 2006).

Em contrapartida, uma matriz com características e condições bastante diferenciadas dos remanescentes originais pode funcionar como uma barreira não permeável bloqueando a dispersão dos organismos em toda paisagem, limitando assim seu movimento ao interior de um único fragmento (Kupfer et al., 2006). Esta concepção de matriz como habitat inóspito foi inicialmente concebida pelas teorias de biogeografia e de metapopulação (Vandermeer & Carvajal 2001; Haila, 2001) e atualmente é a definição mais utilizada pelos ecólogos da paisagem. Entretanto, alguns estudos demonstram que a matriz pode ser como um mosaico de unidades com diferentes níveis de adequabilidade para ocorrência de espécies e dispersão de indivíduos (Umetsu & Pardini, 2007; Zeller, MacGarigal & Whitneley, 2012). E que a reposta dos organismos às diferentes qualidades de matrizes varia não somente entre grupos taxonômicos, mas também entre guildas (Antongiovanni & Metzger 2005) e entre espécies relativamente aparentadas (Ricketts, 2001).

Em relação aos anfíbios anuros, a maioria das espécies depende de dois tipos de hábitat: áreas úmidas para reprodução e áreas florestais para forrageamento, hibernação e dispersão (Zug 1993; Stebbins & Cohen 1995). Tendo em vista que as espécies são

pequenas e possuem uma limitada capacidade de dispersão, a proximidade de áreas para reprodução e para as demais atividades é fundamental para determinar a ocupação destes organismos nas manchas de hábitat (Guerry & Hunter, 2002). Devido a estas características, os anuros podem responder rapidamente aos elementos decorrentes da fragmentação do hábitat, como a conectividade entre os remanescentes de hábitat original (Murphy et al., 2010; Safner et al., 2011) e a qualidade da matriz (Carr & Fahrig 2001; Joly et al., 2001; Van Buskirk 2005).

OBJETIVOS

Para fins didáticos e visando a melhor compreensão, a tese foi dividida em dois capítulos, com objetivos gerais e específicos a cada um deles:

Capítulo 1. Permeabilidade da matriz e dispersão de Anfíbios Anuros: Uma Revisão

Objetivo geral

- Proporcionar uma revisão dos trabalhos que testaram como a qualidade da matriz afeta a ocorrência e dispersão das espécies de anuros em paisagens fragmentadas.

Objetivo específico

- Identificar quais foram as métricas utilizadas para classificar a qualidade das matrizes na paisagem.

Capítulo 2. Influência da qualidade da matriz sobre a estrutura genética populacional de quatro espécies na paisagem da Michelin, Sul da Bahia

Objetivo geral

- Avaliar a influência das diferentes matrizes nas paisagens da Michelin sobre a dispersão de quatro espécies de anuros, utilizando parâmetros da estrutura genética populacional.

Hipótese 1: Matrizes com condições e qualidade de hábitat semelhantes aos remanescentes florestais possibilitam o deslocamento dos indivíduos entre os fragmentos da paisagem e facilitam o intercruzamento, promovendo assim, maior fluxo gênico entre as populações.

Predição 1: As populações de *Aplastodiscus ibirapitanga*, *Stereocyclops incrassatus*, *Hypsiboas albomarginatus* e *Leptodactylus latrans* inseridas nas paisagens compostas por este tipo de matriz apresentarão uma baixa diferenciação genética devido ao elevado fluxo gênico entre elas.

Hipótese 2: Matrizes com características e condições bastante diferenciadas dos remanescentes florestais atuam como uma barreira não permeável contra a dispersão dos indivíduos por toda paisagem, tornando as populações geograficamente isoladas e com poucas oportunidades para intercruzamento.

Predição 2: As populações de *Aplastodiscus ibirapitanga*, *Stereocyclops incrassatus*, *Hypsiboas albomarginatus* e *Leptodactylus latras* inseridas nas paisagens compostas por este tipo de matriz apresentarão elevada diferenciação genética devido a baixa troca de material genético entre elas.

JUSTIFICATIVAS

A Mata Atlântica é historicamente marcada pela degradação e fragmentação de sua vegetação natural. As florestas foram substituídas pelas plantações, pastagens e áreas urbanizadas (MMA, 2015). Hoje, remanescentes da Mata Atlântica cobrem menos de 8% de sua vegetação original e apenas 2% destes remanescentes estão sobre proteção por meio de Unidades de Conservação (Myers et al., 2000). Na região Sul da Bahia, uma boa parte das florestas originais foi substituída por sistemas agroflorestais que são um consórcio entre árvores nativas e culturas agrícolas (referencia). A paisagem que circunda a Reserva Ecológica da Michelin é um exemplo desta realidade, na qual os fragmentos de Mata Atlântica estão embutidos em um mosaico de plantações de borracha e cacau sob diferentes manejos intercalados por manchas de vegetação secundária (Heer et al., 2015).

Estudos realizados na região Sul da Bahia indicam que a contribuição efetiva destes sistemas agroflorestais para a conservação da biodiversidade está relacionada à estrutura, composição e manejo das plantações, à quantidade e qualidade dos remanescentes florestais nativos, à localização dos diferentes tipos de habitats na paisagem, variando também de

acordo com o grupo taxonômico considerado (Faria et al., 2007; Pardini et al., 2009). Pois a forma com que os organismos percebem uma paisagem depende de suas capacidades de dispersão e de suas preferências de hábitat (Fahrig, 2003).

Diversos estudos apontam como a transformação da paisagem afeta a riqueza e abundância das espécies (Pimm & Raven, 2000). Também é notório o aumento de pesquisas que integram a abordagem demográfica e a genética de populações para compreender como o processo de fragmentação altera a dispersão, diversidade genética e o fluxo gênico entre as populações (Rilley et al., 2006; Stevens et al., 2006; Gauffre et al., 2008; Purrenhage et al., 2009). No entanto, em muitos estudos não se considera a qualidade da matriz como filtro para o movimento dos organismos pela paisagem (Jules & Shahani, 2003; Bender & Fahrig, 2005). Diferenças na capacidade de dispersão, nos processos de forrageamento e reprodução levam as espécies a responderem de forma variável às alterações da paisagem (Steffan-Dewenter et al., 2003; Bender et al., 2005). Portanto, incorporar a qualidade da matriz e considerar guildas como objeto de estudo se faz necessário em pesquisas de ecologia da paisagem.

A partir dos resultados gerados neste estudo esperamos compreender como a qualidade das matrizes influencia o deslocamento das espécies de anuros nas paisagens. Dessa forma elucidando se sistemas agroflorestais, como Cabruças e Seringais constituem habitats alternativos para as espécies, contribuindo assim, com a manutenção da diversidade de anuros da região.

METODOLOGIA

Capítulo 1. Permeabilidade da matriz e dispersão de Anfíbios Anuros: Uma Revisão

Realizaremos uma revisão da literatura dos artigos que abordaram este tema, publicados até o ano de 2016. As buscas serão conduzidas nas bases de dados Periódicos CAPES/MEC, ISI Web of Science e Google Scholar, procurando no título, resumo ou palavras-chave, os termos “Permeability of the matrix and anurans”, “Effects of land use of amphibians” e “connectivity among anurans populations”. Construiremos uma tabela com as seguintes considerações:

- a. As espécies abordadas pelo estudo
- b. Que atributos das espécies foram mensurados (e.g. abundância, comportamento, genótipo)
- c. As hipóteses científicas elaboradas para explicar como a qualidade da matriz afeta o movimento dos organismos
- d. O número de paisagens avaliadas
- e. Quais elementos da paisagem foram ponderados
- f. As métricas espaciais selecionadas
- g. Quais análises foram utilizadas para avaliar a relação entre a qualidade da matriz e o movimento dos indivíduos na paisagem

Capítulo 2. . Influência da qualidade da matriz sobre a estrutura genética populacional de quatro espécies de anuros em uma complexa paisagem no Sul da Bahia

1. Área de Estudo

O estudo será conduzido ao entorno da Reserva Ecológica da Michelin que se localiza entre os municípios de Grapiúna e Ituberá no estado da Bahia ($13^{\circ} 50' S$ e $39^{\circ} 10' W$, entre 90 e 383 m acima do nível do mar). A área de estudo é uma paisagem altamente complexa, composta por uma grande variedade de uso e cobertura da terra. A paisagem abrange fragmentos de Mata Atlântica embutidos em um mosaico de plantações de borracha sob diferentes manejos intercalados por manchas de vegetação secundária, representadas principalmente por florestas ripárias ao longo de pequenos rios e riachos (Figura 1) (Heer et al., 2015).

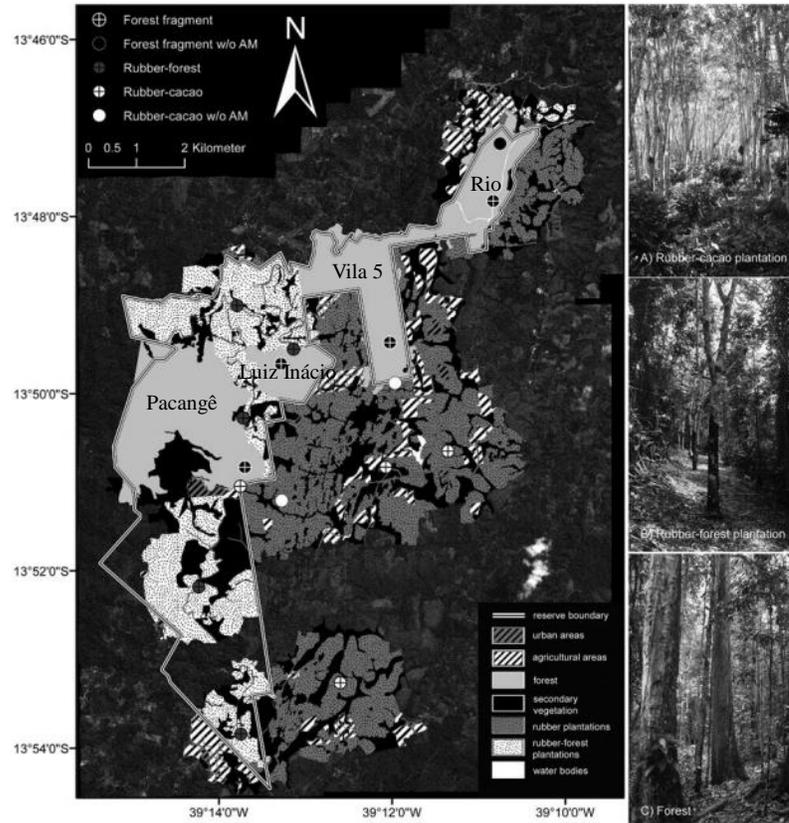


Figura 1. Adaptada de Heer et al., 2015. Imagem de satélite da área de estudo. A legenda no canto superior esquerdo refere-se aos sítios amostrados pelo pesquisador. A legenda no canto inferior direito apresenta os tipos de uso da terra.

Segundo Heer e colaboradores (2015), a maior parte da floresta original foi explorada durante o estabelecimento da primeira plantação de borracha em 1953. O restante dos fragmentos florestais (Pacangê, Luiz Inácio, Vila 5 e Rio) foram explorados de forma seletiva e passaram por uma intensa pressão de caça até meados da década de 1990, período de mudanças na política ambiental da empresa Michelin. As plantações de borracha dentro da reserva e as vegetações naturais entre fileiras de Seringueiras não passaram por cortes desde a criação da reserva em 2005 (Plantações de borracha e floresta demonstradas na figura acima) e em algumas áreas foram plantadas mudas florestais para promover a regeneração da floresta. Áreas na porção Sul da reserva da Michelin são dominadas por plantações de borracha intensivamente utilizadas. Quando plantações de Cacao são instaladas entre as Seringueiras são fortemente tratadas com pesticidas, eliminando outras vegetações de sub-bosque.

2. Seleção das espécies e Amostragem

Os anfíbios anuros são apropriados para estudos de paisagem porque muitas espécies dependem da conectividade entre habitats aquáticos e terrestres. Especialmente, os juvenis que se deslocam da poça natal para ambientes terrestres logo após completarem sua metamorfose e em período de reprodução alguns se deslocam para novas poças (Dispersão) e outros retornam à poça natal (Filopatria) (Cline & Hunter, 2014). De toda forma, a filopatria e dispersão dos juvenis faz com que eles necessitem transitar entre habitats de condições diferenciadas.

Bender e colaboradores (2003) demonstraram que as diferenças na capacidade de dispersão, nos processos de forrageamento e reprodução levam as espécies a responderem de forma variável às alterações da paisagem. Sendo assim, iremos trabalhar com quatro espécies de anuros, abundantes, com desenvolvimento indireto, mas que diferem em seus requerimentos ambientais, representando guildas ecológicas distintas (Tabela 1).

Tabela 1. Características das espécies em relação ao tipo de habitat, hábito de vida.

Habitat	Hábito	Espécies
Área Florestal	Arborícola	<i>Aplastodiscus ibirapitanga</i>
Área Florestal	Terrícola	<i>Stereocyclops incrassatus</i>
Área Aberta	Arborícola	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>
Área Aberta	Terrícola	<i>Leptodactylus latrans</i>

Os sítios reprodutivos dos anuros (e.g. poças, lagos e riachos) são muitas vezes próximos localmente, permitindo o deslocamento dos indivíduos entre os sítios vizinhos. Isto levanta uma questão fundamental sobre qual seria a unidade funcional básica para definir as subpopulações, se é o conjunto de indivíduos da mesma espécie de um sítio ou o conjunto de indivíduos da mesma espécie de vários sítios localmente próximos (Petranka et al., 2004). Marsh e Trenham (2001) em sua revisão sobre dinâmica de metapopulações

consideram os sítios de reprodução dos anuros como equivalentes a subpopulações. Entretanto, os movimentos dos organismos entre os sítios sugerem que o conjunto de sítios localmente próximos é uma medida de subpopulação mais apropriada do que sítios únicos. Indivíduos em sítios que estão a menos de 100 metros de distância um dos outros não são demograficamente independentes e por isso apenas sítios de reprodução com no mínimo 100 metros devem ser tratados como subpopulações para amostragem e monitoramento (Petranka et al., 2004; Petranka, 2007).

Amostraremos sítios de reprodução distribuídos ao longo de toda paisagem da Michelin, considerando a heterogeneidade do uso da terra. Os sítios terão no mínimo 100 metros de distância uns dos outros para garantir a independência geográfica das populações. Nestes sítios reprodutivos, sempre que possível, coletaremos aproximadamente 25 ovos fertilizados de diferentes ninhadas (para reduzir o efeito do parentesco) de cada espécie. Os ovos serão mantidos no laboratório até a eclosão dos girinos que serão armazenados em álcool 90%. Havendo necessidade, casais em amplexo também poderão ser coletados e mantidos em aquários até o momento de liberação das desovas. Posteriormente serão devolvidos ao ambiente de origem.

3. Extração, Amplificação e Sequenciamento de DNA

Realizaremos a extração do DNA dos girinos com auxílio do Kit DneasyTM Tissue sob as condições padronizadas do fabricante (QUIAGEN). Posteriormente, lócus microsatélites serão amplificados utilizando iniciadores e condições de reação (Reações em cadeia da Polimerase – PCRs) previamente descritas (Arruda et al., 2010; Faggione et al., 2014). A maior parte dos estudos de genética da paisagem utilizam marcadores microsatélites para estimar o fluxo gênico entre as populações (Storfer et al., 2010). Estes marcadores apresentam numerosas vantagens quando comparados aos demais tipos de marcadores moleculares. São altamente polimórficos e informativos, ocorrem abundantemente em genomas eucariotos tanto em regiões codificadoras quanto não codificadoras, necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por PCR e os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas (Buso et al., 2003).

Todos os lócus amplificados serão sequenciados e os programas SeqScape v. 2.1 (da ABI) e BioEdit 5.09 (Hall, 1999) serão utilizados para análise dos cromatogramas e edição das sequências para a obtenção da fita consenso. Por fim as sequências geradas serão alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 1997).

4. Análises da Estrutura Genética Populacional

Utilizaremos o programa Arlequin v. 3.0 (Excoffier et al., 2005) para calcular os seguintes índices de diversidade genética para cada população: número de alelos, heterozigosidade esperada e observada. A diferenciação genética entre as populações será estimada através dos coeficientes de endogamia F_{is} para cada população e F_{st} entre os pares de populações. Estes coeficientes são mais apropriados para este estudo porque indiretamente refletem as taxas de migração ao longo prazo entre pares de populações, sob o pressuposto de que a divergência genética observada é mais fortemente influenciada pelos processos deriva e fluxo gênico do que pela seleção natural e mutação (Slatkin, 1991; Epperson, 2005; Whitlock, 2011).

5. Medidas da Paisagem

Neste estudo, adotaremos uma abordagem no nível de mancha e de paisagem para compreendermos o efeito das características destes elementos na dispersão das populações de interesse. No nível de mancha, consideraremos os fragmentos nos quais as populações serão coletadas. Estes fragmentos serão caracterizados quanto ao tamanho, forma e isolamento entre os demais fragmentos no raio considerado.

Na perspectiva de paisagem testaremos *buffers* de 1 a 5 km a partir das bordas de cada fragmento. A abrangência da paisagem será testada porque não é bem definido na literatura o grau de percepção da paisagem pelas espécies de anuros. No entanto, alguns trabalhos demonstram que a maior parte das espécies são filopátricas e que as demais geralmente dispersam por centenas de metros entre a fase larval e o primeiro período reprodutivo, raramente cobrindo quilômetros de distância (Smith & Gree, 2005). Nas paisagens iremos mensurar o número de fragmentos e os tipos de matrizes que a compõe. Fotografias aéreas serão utilizadas para identificar o uso da terra nas paisagens da Michelin

além de visitas ao campo. A empresa cujas fotografias serão adquiridas ainda será definida. A caracterização dos fragmentos e das paisagens será realizada por meio dos programas Fragstats© v. 3.3 (McGarigal et al., 2012) e ArcView© v. 3.2 (ESRI, 2000).

6. Análises Estatísticas

Para cada espécie construiremos modelos mistos lineares generalizados (GLMM) para testar como as medidas genéticas das populações variam em função das características dos fragmentos e das paisagens. O Critério de Informação de Akaik (AIC) será utilizado para classificar os modelos e indicar o modelo que melhor explica a variação na estrutura genética das populações. As análises serão realizadas no ambiente computacional R.

FINANCIAMENTOS

Todas as etapas a serem desenvolvidas pelo presente estudo (e.g. viagens e materiais para coleta de campo, procedimentos laboratoriais, aquisição de imagens de satélite) serão financiadas pelas seguintes fontes:

- CNPq - Processo 449930/2014-9 - Modalidade: Universal, edital 14/2014 - intitulado "Diversidade e estrutura genética dos anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica do Sul da Bahia".
- Fapesb - Projeto PTX0002/2016 - Modalidade: PROTAX - intitulado "Desvendando a diversidade de anfíbios das áreas de altitude da Mata Atlântica do sul da Bahia com ferramentas de taxonomia integrativa".
- Fapesb - Projeto APP0062/2016 - Modalidade: Universal, edital 005/2015 - intitulado "Impacto das mudanças climáticas sobre os anfíbios das florestas montanas do corredor central da Mata Atlântica".
- Fapesb - Projeto INT0013/2016 - Modalidade: Ações de Cooperação Internacional, edital 004/2015 - intitulado "Integração de dados ecofisiológicos em modelos de distribuição de espécies para avaliação do efeito das mudanças climáticas sobre os anfíbios".

REFERÊNCIAS

Antongiovanni M. & Metzger J. P. 2005. Influence of the matrix habitats on the occurrence of insectivorous bird species in Amazonian forest fragments. *Biological*

Conservation 122: 441–451.

Arruda M. P., Gonçalves E. C., Silva A., Schneider M. P. C. & Morielle-Versute E. 2010. Development of eleven polymorphic microsatellite markers for the Chaco Treefrog, *Hypsiboas raniceps*. *Conservation Genetic Resources* 2: 93–96.

Bender D.J. & Fahrig L. 2005. Matrix structure obscures the relationship between interpatch movement and patch size and isolation. *Ecology* 86: 1023–1033.

Carr L. W. & Fahrig L. 2001. Effect of road traffic on two amphibian species of differing vagility. *Conservation Biology* 15: 1071–1078.

Cline B. B. & Hunter M. L. 2014. Different open-canopy vegetation types affect matrix permeability for a dispersing forest amphibian. *Journal of Applied Ecology* 51: 319–329.

Epperson B. K. 2005. Mutation at high rates reduces spatial structure within populations. *Molecular Ecology* 14: 703–710.

Faggioni G. P., Zamudio K. R., Souza F. L. & Prado C. P. A. 2014. Isolation and characterization of microsatellites markers for two South American frogs (*Leptodactylus bufonius* and *L. chaquensis*) using next generation sequencing. *Amphibia-Reptilia* 35: 405–412.

Fahrig L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 34: 487–515.

Faria D., Paciencia M. L. B., Dixo M., Laps R. R. & Baumgarten, J. 2007. Ferns, frogs, lizards, birds and bats in forest fragments and shade cacao plantations of two contrasting landscapes in the Atlantic forest, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16: 2335–2357.

Fischer J. & Lindenmayer D. B. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Global Ecology and Biogeography* 16: 265–280.

Gauffre B., Estoup A., Bretagnolle V. & Cosson J. F. 2008. Spatial genetic structure of a small rodent in a heterogeneous landscape. *Molecular Ecology* 17: 4619–4629.

Guerry A. D. & Hunter Jr M. L. 2002. Amphibian Distributions in a Landscape of Forests and Agriculture: An Examination of Landscape Composition and Configuration. *Conservation Biology* 16 (3): 745-754.

Haila Y. 2002. A conceptual genealogy of fragmentation research: from island biogeography to landscape ecology. *Ecological Applications* 12(2): 321–334.

Heer K., Helbig-Bonitz M., Fernandes R. G., Mello M. A. R. & Kalko E. K. V. 2015. Effects of land use on bat diversity in a complex plantation-forest landscape in northeastern Brazil. *Journal of Mammalogy* Advance Access, on-line only: 1 – 12.

Joly P., Miaud C., Lehmann A. & Grolet O. 2001. Habitat matrix effects on pond occupancy in newts. *Conservation Biology* 15: 239–248.

Jules E. S. & Shahani P. 2003. A broader ecological context to habitat fragmentation: Why matrix habitat is more important than we thought. *Journal of Vegetation Science* 14: 459–464.

Kupfer J. A., Malanson G. P. & Franklin S. B. 2006. Not seeing the ocean for the islands: the mediating influence of matrix-based processes on forest fragmentation effects. *Global Ecology and Biogeography* 15: 8–20.

Marsh P. & Trenham P. 2001. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology* 15: 40–49.

Murphy M. A., Evans J. S. & Storfer A. 2010. Quantifying *Bufo boreas* connectivity in Yellowstone National Park with landscape genetics. *Ecology* 91: 252–261.

Pardini R., Faria D., Accacio G. M., Laps R.R., Mariano-Neto E., Paciencia M. L. B., Dixo M. & Baumgarten J. 2009. The challenge of maintaining Atlantic forest biodiversity: A multi-taxa conservation assessment of specialist and generalist species in an agro-forestry mosaic in southern Bahia. *Biological Conservation* 142: 1178-1190

Petranka J. 2007. Evolution of complex life cycles of amphibians: bridging the gap between metapopulation dynamics and life history evolution. *Evolutionary Ecology* 21: 751–764.

Petranka J., Smith C. & Scott A. 2004. Identifying the minimal demographic unit for monitoring pond-breeding amphibians. *Ecological Applications* 14: 1065–1078.

Pimm S.L., Raven P., 2000. Extinction by numbers. *Nature* 403: 843–845.

Purrenhage J. L., Niewiarowski P. H. & Moore F. B. G. 2009. Population structure of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) in a fragmented landscape. *Molecular Ecology* 18: 235–247.

Ricketts, T. H. 2001. The Matrix Matters: Effective Isolation in Fragmented Landscapes. *The American Naturalist* 158(1): 250 - 259.

Riley S. P. D., Pollinger J. P. & Sauvajot R. M. 2006. A Southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* 15:1733–1741.

Safner T., Miaud C., Gaggiotti O., Decout S., Rioux D. & Zundel S. 2011. Combining demography and genetic analysis to assess the population structure of an amphibian in a human-dominated landscape. *Conservation Genetics* 12: 161–173.

Slatkin M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetic Resources* 58: 167–175.

Smith M. A. & Green D. M. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28: 110–128.

Stebbins R. C. & Cohen N. W. 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. Pp. 336.

Steffan-Dewenter I. 2003. Importance of habitat area and landscape context for species richness of bees and wasps in fragmented orchard meadows. *Conservation Biology* 17(4): 1036–1044.

Stevens V., Verkenne C., Vandewoestijne S., Wesselingh R. A. & Baguette M. 2006. Gene flow and functional connectivity in the Natterjack toad. *Molecular Ecology* 15: 2333–2344.

Umetsu F. & Pardini R. 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. *Landscape Ecology* 22: 517-530.

Umetsu F., Metzger J. P. & Pardini R. 2008. Importance of estimating matrix quality for modeling species distribution in complex tropical landscapes: a test with Atlantic forest small mammals. *Ecography* 31: 359 – 370.

Van Buskirk J. 2005. Local and landscape influence on amphibian occurrence and abundance. *Ecology* 86:1936–1947.

Vandermeer J. H. & Carvajal R. 2001. Metapopulation dynamics and the quality of the matrix. *The American Naturalist* 158: 211–220.

Whitlock M. C. 2011. $G'ST$ and D not replace FST . *Molecular Ecology* 20:1083–1091.

Wilcove D. S., McLellan C. H. & Dobson A. P. 1986. Habitat fragmentation in the temperate zone. In Soulé M. E. (ed.). *Conservation Biology*. Sunderland, MA. Pp. 237–256.

Zeller K. A., McGarigal K. & Whiteley A. R. 2012. Estimating landscape resistance to movement: a review. *Landscape Ecology* 27: 777-797.

Zug G.R. 1993. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press, San Diego. Pp. 630.

