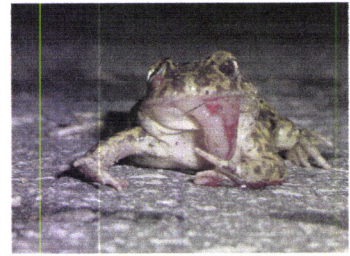


MORTALIDADE DE ANFÍBIOS POR ATROPELAMENTO:

ANÁLISE DE PONTOS NEGROS

E

LOCALIZAÇÃO DE PASSAGENS INFERIORES UTILIZANDO O ÍNDICE DE GORELICK



Nuno Baptista

Orientador: Prof. Doutor Paulo Sá-Sousa

Évora, Novembro de 2006

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Biologia da Conservação pela Universidade de Évora

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.”

MORTALIDADE DE ANFÍBIOS POR ATROPELAMENTO:

ANÁLISE DE PONTOS NEGROS

E

LOCALIZAÇÃO DE PASSAGENS INFERIORES UTILIZANDO O ÍNDICE DE GORELICK

AMPHIBIAN ROADKILLS:

HOTSPOT ANALYSIS

AND

LOCATIONS OF AMPHIBIAN UNDERPASSES USING GORELICK'S INDEX

Nuno Baptista



Orientador: Prof. Doutor Paulo Sá-Sousa

Évora, Novembro de 2006

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Biologia da Conservação pela Universidade de Évora

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri.”

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract.....	2
Introdução	3
Contextualização histórica.....	3
Ecologia de Estradas.....	4
Os anfíbios e as estradas	13
Artigos científicos.....	17
AMPHIBIAN ROADKILLS HOTSPOTS ANALYSIS.....	18
ASSESSMENT OF LOCATIONS OF AMPHIBIAN UNDERPASSES USING GORELICK'S MODIFICATION OF SHANNON INDEX.....	33
Considerações Finais	42
Agradecimentos	47
Bibliografia	48

**MORTALIDADE DE ANFÍBIOS POR ATROPELAMENTO: ANÁLISE DE PONTOS
NEGROS E LOCALIZAÇÃO DE PASSAGENS INFERIORES UTILIZANDO O
ÍNDICE DE GORELICK**

RESUMO

As populações de anfíbios encontram-se seriamente ameaçadas pela mortalidade provocada pelo atropelamento rodoviário pelo que é pertinente a colocação de medidas mitigadoras em locais de elevada mortalidade. Os pontos negros de anfíbios foram identificados com recurso ao método de Malo e a composição específica destes analisadas com testes G e análises de aglomeramentos. Foram formados dois grupos de espécies cujos pontos negros foram detectados separadamente e comparados entre si com testes de independência que revelaram que estes são independentes entre si mas associados aos pontos negros baseados em todas as espécies, o que sugere que poderá haver diferentes tipos de pontos negros segregados espacialmente que deverão ser tidos em conta aquando do delineamento da localização de passagens inferiores. Propomos igualmente que o índice de diversidade de Shannon modificado por Gorelick seja utilizado na avaliação das melhores selecções de locais na estrada a modificar, pois este combina abundâncias e riquezas específicas entre locais num único índice.

**AMPHIBIAN ROADKILLS: HOTSPOT ANALYSIS AND LOCATIONS OF
AMPHIBIAN UNDERPASSES USING GORELICK'S INDEX**

ABSTRACT

The amphibian populations are seriously threatened by roadkills and so it is evident the need to deploy mitigation measures in places of high roadkill rate. Amphibian hotspots were identified using Malo's method and its specific composition was analysed with G-tests and cluster analysis. Two clusters were formed and its hotspots detected independently and compared between them with tests of independence which revealed that these clusters' hotspots are independent between them and associated to the hotspots based in all species, suggesting the existence of different types of blackspots segregated spatially which should be taken in account while delineating the best locations of underpasses. We propose also the use of Gorelick's modified Shannon index for the evaluation of the best selection of sites for road upgrading as it combines species richness and abundances among patches in a single index.

INTRODUÇÃO

Contextualização histórica

No início do século XIX, o engenheiro escocês John McAdam revolucionou a construção de estradas com dois tratados de engenharia de estradas (*Remarks on the Present System of Road-Making* e *Practical Essay on the Scientific Repair and Preservation of Roads*) nos quais instituiu que o pavimento deveria ser duro, a estrada levemente elevada em relação ao solo, com perfil convexo e valas de escorrência. A expressão “estrada de macadame”, utilizada até há bem pouco tempo para estrada pavimentada, é assim uma homenagem a este grande engenheiro. No final do século XIX, Karl Benz inventou na Alemanha o primeiro automóvel moderno com motor a gasolina, porém até Henry Ford utilizar o sistema de linhas de montagem no início do século XX, os automóveis eram escassos e reservados às classes superiores. Com a conjugação de melhores estradas e automóveis acessíveis à classe média, deu-se uma explosão na utilização das estradas, o que viria a revolucionar o urbanismo e os mecanismos de produção. Em 2005, 97 anos após a produção dos primeiros automóveis, estimava-se em 600.000.000 o número de veículos em circulação em todo o mundo.

Os impactos dos veículos na vida selvagem tornaram-se rapidamente evidentes: ainda em 1925, Stoner, publicou aquele que foi provavelmente o primeiro artigo referente à mortalidade de aves por colisão com automóveis (Erritzoe *et al.*, 2003). No entanto, os impactos das infraestruturas lineares, sob a forma de mortalidade por atropelamento, já tinham sido referenciados no final do século XIX por Barbour, o qual publicou as suas observações de uma mortalidade elevada de aves junto às linhas de comboios (Puky e Vogel, 2003).

Em Portugal, nas últimas três décadas, a rede rodoviária triplicou em extensão e o número de veículos registados quintuplicou, em resultado do aumento da qualidade de vida e da aplicação dos fundos estruturais comunitários para renovação da rede rodoviária (Malkmus, 2004). Naturalmente, os efeitos sobre os habitats e populações também se multiplicaram, contudo os estudos nacionais conhecidos publicados em revistas internacionais resumem-se a dois trabalhos: Brito e Álvares (2004) e Petronilho e Dias (2005).

Ecologia de Estradas

A ecologia de estradas (*road ecology*) é uma disciplina emergente, que surgiu no final do século XX nos países mais desenvolvidos, onde ainda hoje são feitos a maioria dos estudos (Puky, 2006). Há apenas 8 anos, Forman e Alexander (1998) reconheciam que, apesar da sua importância comprovada como fonte de mortalidade e de efeito de barreira, poluição física e química, via de propagação de doenças e espécies exóticas, causadora de alterações hidrológicas e de aumento de erosão, a ecologia de estradas ainda não tinha recebido a atenção de não mais que alguns ecologistas das populações e da paisagem. Apesar deste cenário, compreender as consequências ecológicas das estradas e desenvolver modos de mitigar os seus efeitos foi-se tornando num importante campo de investigação da biologia da conservação (Forman e Alexander, 1998; Trombulak e Frissel, 2000; Aresco, 2003).

Os efeitos das estradas sobre a vida selvagem têm vindo a ser organizados em cinco a dez categorias, dependendo do autor (Puky, 2006). Fazendo uma síntese das categorias geralmente utilizadas (conf. Forman e Alexander, 1998; Jackson, 2000; Trombulak e Frissel, 2000; Seiler, 2003; Puky, 2006) podemos dividir, grosseiramente, os efeitos das estradas em danos sobre as populações e impactos sobre os habitats/biótopos. Os efeitos sobre as populações abrangem:

- Perturbação e mortalidade devido à construção;
- Mortalidade por colisão com veículos;
- Alterações do comportamento e evitamento da estrada;
- Disseminação de espécies exóticas, pragas, doenças e predadores;
- Disrupção da estrutura etária e do rácio de sexos (*sex-ratio*);
- Efeito de barreira acompanhado da fragmentação das populações e metapopulações e, conseqüentemente, o isolamento genético e a diminuição da heterozigotia.

Os efeitos sobre os habitats/biótopos compreendem:

- Perda e degradação de habitats/biótopos, fragmentação e efeito de orla;
- Alteração do ambiente físico (ruído, erosão, alterações hidrológicas) e químico (poluição química, e.g. chumbo, óxidos nitrosos e sulfurosos, óleos e combustíveis, azoto troposférico, metais pesados);
- Aumento da acessibilidade aos humanos, acompanhado de alterações nos usos do solo e de uma maior exploração dos habitats/biótopos e populações.

Estas categorias são difíceis de definir na medida em que interagem entre si afectando-se mutuamente, como podemos visualizar no esquema esboçado na Figura 1.

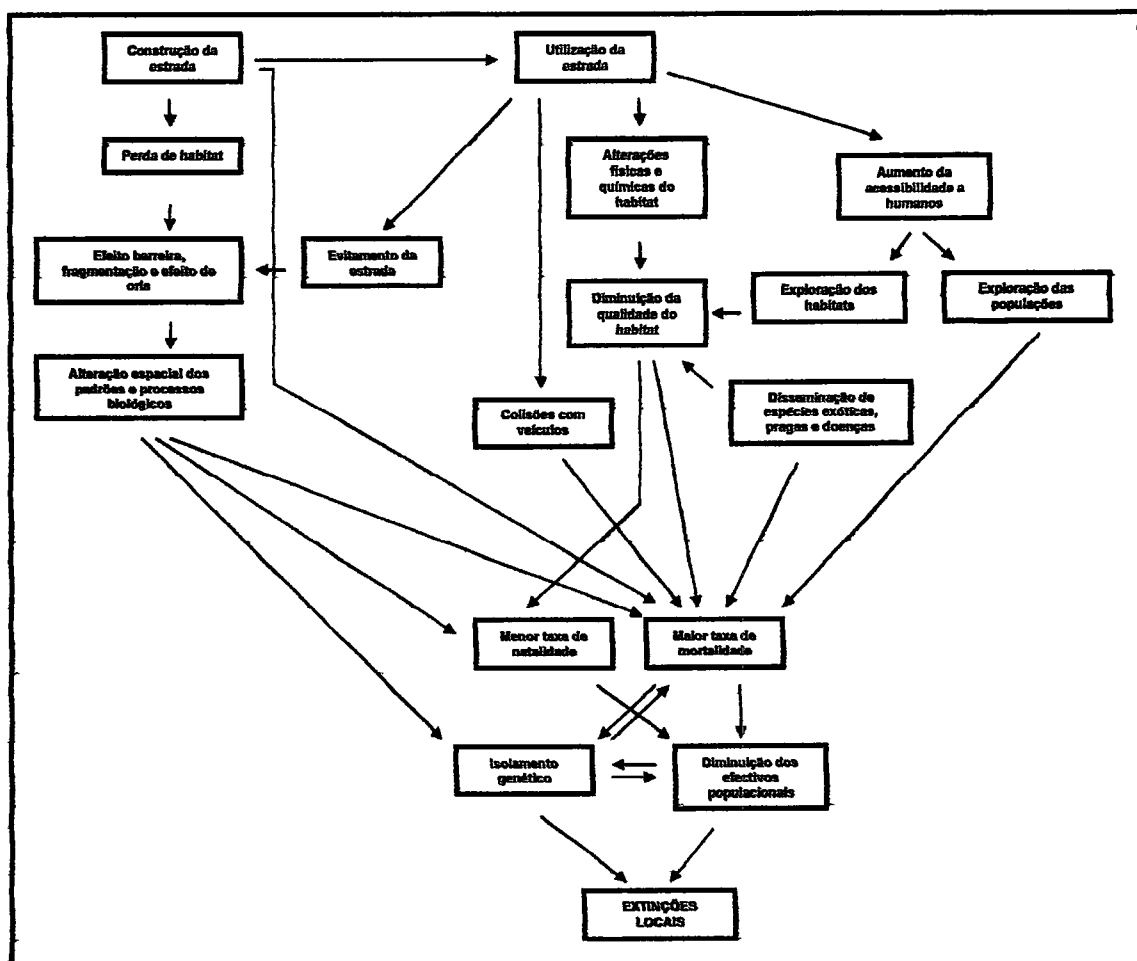


Figura 1. Esquema do conjunto de efeitos nas populações e habitats decorrentes da construção e utilização da estrada.

Efeitos sobre as populações

Perturbação e mortalidade devido à construção

Aquando da construção de uma estrada assiste-se ao corte e derrube de árvores, à desmatação, efectuam-se escavações e a mobilização geral do solo, aumenta o ruído e a perturbação ambiental, dá-se a emissão de substâncias tóxicas, de tal modo que ocorre extensa destruição de habitats, que causam mortalidade directa de indivíduos muito lentos, hibernantes ou de posturas.

Mortalidade por colisão

A mortalidade por atropelamento é o aspecto mais visível dos efeitos deletérios das estradas e pode, nalgumas espécies, causar acentuadas depressões demográficas. Por exemplo, no Texas oriental, as populações da cascavel-da-madeira (*Crotalus horridus*) encontravam-se reduzidas em pelo menos 50% devido à mortalidade rodoviária, sendo os efeitos particularmente sentidos até aos primeiros 450 m na vizinhança marginal da estrada em que esta serpente apresentam populações pelo menos 50% menores que as encontradas a maiores distâncias (Rudolph *et al.*, 1999). Concomitantemente, Fahrig *et al.* (1995) detectaram que quanto maior o tráfico rodoviário, menores as abundâncias relativas das populações de anuros nas proximidades das estradas.

Hels e Buchwald (2001) calcularam a probabilidade de um anfíbio, ou de outro animal, sobreviver ao atravessamento de uma estrada:

$$P(\text{sobreviver}) = \frac{1}{\pi} \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} e^{-\frac{Na}{v \cdot \cos \alpha}} d\alpha, \text{ na qual } N \text{ é número de carros que passam por}$$

unidade de tempo, a é a largura mortal do veículo, v representa a velocidade do animal e α é o ângulo de atravessamento. Nesta equação a probabilidade de sobrevivência decresce exponencialmente com maiores intensidades de tráfego (N) e cresce exponencialmente com maiores velocidades do animal (v). A probabilidade será máxima, para um dado N e v , quando o atravessamento for realizado perpendicularmente à estrada ($\alpha=0$). A largura mortal (a), pode ser calculada multiplicando a largura do pneu pelo comprimento do animal e multiplicando este valor por quatro.

Gibbs e Shriver (2002) adaptaram esta fórmula para calcular a probabilidade de uma tartaruga terrestre morrer numa única tentativa de atravessamento da autoestrada que atravessa o lago Jackson na Florida e obtiveram um valor de 98%!

Há três factores que influenciam grandemente a vulnerabilidade de uma espécie à mortalidade rodoviária: a velocidade de locomoção da espécie, os padrões circadianos de deslocação dos indivíduos e o volume de tráfego rodoviário (Hels e Buchwald, 2001). Assim sendo, a vulnerabilidade é maior em espécies lentas e mais activas de dia, quando há maiores volumes de tráfego. Além destes factores, o comportamento deveria ser tido em conta.

Além destes factores, comportamento deveria ser tido em conta. Os indivíduos de algumas espécies de anfíbios e de serpentes ao sentirem a aproximação de um veículo tendem a imobilizarem-se aumentando grandemente o risco de atropelamento (Andrews e Gibbons, 2005; Mazerolle *et al.*, 2005). O perigo de morte por atropelamento em estradas é um evento bastante recente na história evolutiva dos vertebrados, quando comparadas com outras pressões evolutivas, como o risco de predação por outros animais, pelo que nem todos os animais exibem evitamento de estradas e assim ficam mais sujeitos à colisão com veículos (St. Clair, 2003). Algumas espécies sentem-se inclusivamente atraídas pelas estradas como, por exemplo, o rato canguru (*Dipodomys stephensi*) que utiliza estradas de terra batida como vias migratórias (Brock e Kelt, 2004), ou as serpentes que frequentemente efectuam a termorregulação em estradas.

As agregações de mortalidade de vertebrados em estradas não ocorrem aleatoriamente mas antes surgem espacialmente aglomeradas (Clevenger *et al.*, 2003). Os padrões espaciais da paisagem têm um papel importante na localização dos locais críticos de atropelamentos pois os animais tendem a estar associados a um conjunto de habitats específicos (Forman e Alexander, 1998).

Além da mortalidade por colisão, as estradas podem incrementar a mortalidade por predação. No Deserto de Mojave, California, verificou-se que os corvos (*Corvus corax*) eram mais abundantes junto às estradas, pelo que representavam um risco adicional para os juvenis da tartaruga do deserto (*Gopherus agassizii*) em dispersão, já de si tão afectados pela mortalidade rodoviária (Boarman *et al.*, 1997).

Alterações do comportamento

Muitos animais exibem comportamentos de evitamento da estrada devido ao ruído e às actividades humanas associadas às estradas (Jackson, 2000). Estas alterações comportamentais apenas foram registadas em mamíferos e aves. O reflexo de evitamento da estrada é uma componente do efeito de barreira, o qual deste modo conduz a um maior grau de fragmentação populacional, ao risco de isolamento genético e aumenta a susceptibilidade à extinção local por fenómenos estocásticos.

Disseminação de espécies exóticas, pragas e doenças;

A vegetação herbácea associada às bermas das estradas e auto-estradas, representam descontinuidades paisagísticas que podem servir de vias de propagação de plantas e animais indesejáveis. Adicionalmente, pequenos animais, e propágulos (esporos e sementes) podem apanhar boleia de veículos e serem transportados ao longo de centenas ou milhares de quilómetros. Contudo, este efeito de disseminação ao longo de estradas não é universal, pois por vezes estas funcionam, ao invés, como barreiras contra a disseminação de doenças, quer afectando os vectores quer os hospedeiros, como no caso da bactéria *Yersinia pestis* que infecta os cães da pradaria (*Cynomys ludovicianus*) (Collinge *et al.*, 2005).

Disrupção da estrutura populacional

A mortalidade diferencial pode causar profundas alterações na estrutura populacional dos animais. Aresco (2003) observou que os rácios entre sexos de três espécies de tartarugas encontravam-se desviados no sentido de haver mais machos que o espectável devido à mortalidade de fêmeas que erravam em busca de locais para oviposição. Reijnen *et al.* (1995), constataram que o ruído do tráfego altera as comunidades da avifauna tanto em biótopos florestais como em prados.

Efeito de barreira

Ao se interporem como barreiras face aos normais movimentos das populações animais, as estradas subdividem-nas podendo ocorrer extinções locais devido a fenómenos estocásticos genéticos e demográficos, variabilidade ambiental e catástrofes naturais. O efeito de barreira pode também originar graves perturbações nas comunidades animais: interrupção dos fluxos migratórios (e genéticos), redução da diversidade faunística e

disrupção dos mecanismos de recrutamento e recolonização (após extinções locais) característicos das estruturas metapopulacionais (Boarman *et al.*, 1997; Forman e Alexander, 1998; Alexander e Waters, 2000; Jackson, 2000). O efeito de barreira manifesta-se quer directamente através da mortalidade por atropelamento, quer indirectamente através dos efeitos psicológicos que induzem ao evitamento da estrada (Forman e Alexander, 1998), devendo ser tido em conta aquando da colocação de estruturas mitigadoras (Alexander e Waters, 2000).

O efeito de barreira reduz o acesso às áreas vitais para diversas espécies e, em conjugação com o evitamento da estrada, origina menores populações nas imediações de estradas (Brotons e Herrando, 2001). A redução da conectividade pode afectar também, por exemplo, a dispersão de sementes por micromamíferos (Conrey e Mills, 2001).

Entretanto Lesbarrères *et al.* (2003) verificaram que as populações da rã-ágil (*Rana dalmantina*) que ocupavam charcas mais próximas de estradas (*ca.* 93m) apresentavam níveis de heterozigotia bastante inferiores aos das populações que habitavam zonas mais afastadas (*ca.* 2100 m). Os problemas de consanguinidade são exacerbados pelas estradas de duas maneiras: ao diminuir as populações junto às estradas devido à mortalidade por colisão e ao dificultar as migrações, impedindo a chegada de novos alelos.

Efeitos sobre os habitats/biótopos

Degradação e fragmentação dos habitats

A proliferação de estradas e auto-estradas resultou numa notável fragmentação dos habitats, populações e metapopulações nas zonas mais desenvolvidas. As bermas e o separador central, no caso das auto-estradas, são activamente geridos, gerando habitats de menor qualidade ao longo de muitos quilómetros, e assim originando descontinuidades que provocam fragmentação dos habitats originais. A extensão e magnitude dos impactos da fragmentação dos habitats são influenciadas pelo tamanho, conectividade, forma, contexto e heterogeneidade dos fragmentos remanescentes (Collinge, 1996).

Seguindo a teoria da biogeografia insular, a riqueza específica é função do tamanho do fragmento e do grau de isolamento, com fragmentos menores e mais isolados contendo menos espécies e, adicionalmente, menores fragmentos deverão também conter populações menores, maior grau de deriva genética e menos imigrantes (Debinski e Holt, 2000).

Outra consequência da fragmentação dos habitats é o chamado efeito de orla, *i.e.*, as alterações abióticas e bióticas que ocorrem nas zonas de fronteira dos fragmentos, que diminuem a qualidade do habitat e criam condições à penetração de espécies invasoras. Por exemplo, para muitas aves canoras neotropicais, as orlas dos fragmentos associadas a estradas são uma fonte de predadores de ninhos e de parasitas da prole (Jackson, 2000).

A fragmentação dos habitats cria igualmente o efeito de barreira, discutido anteriormente, e modifica profundamente os padrões e processos espaciais das diferentes espécies, causando alterações ao nível das populações e comunidades. Uma resposta típica seria, nos fragmentos menores, uma diminuição das áreas vitais (*home ranges*) e uma maior sobreposição entre estes. Porém, a reacção à fragmentação dos habitats apresentada por diferentes espécies e, inclusivamente, por sexos e classes etárias, varia grandemente, pelo que nalguns estudos ter-se-á verificado aumentos na riqueza específica, diversidade, área vital e fidelidade ao local em fragmentos menores (Debinski e Holt, 2000).

Alteração do ambiente físico e químico

A presença de uma estrada provoca profundas alterações hidrológicas como sejam as alterações dos padrões de drenagem, o aumento do escoamento e da erosão e diminuição da qualidade da água (Forman e Alexander, 1998). A drenagem das águas do pavimento é dirigida directamente para os habitats envolventes, sendo assim arrastados óleos, metais pesados e outros poluentes para a rede hidrológica contígua.

Assiste-se igualmente a um aumento da emissão de poluentes atmosféricos como gases de estufa, óxidos de azoto, ozono, metais pesados e fuligens.

Aumento da acessibilidade a humanos

As estradas facilitam grandemente a acessibilidade aos humanos e, conseqüentemente, aumenta a intensidade da caça e das actividades recolectoras, assiste-se ao surgimento

de novas áreas urbanas, a exploração agrícola e florestal é intensificada, há maior risco de disseminação de espécies exóticas e aumenta o escoamento de águas. Todas estas actividades podem reduzir as populações da fauna e são potenciadoras do efeito de barreira (Jackson, 2000; Barros Ferraz *et al.*, 2005).

Na Figura 2 podemos ver uma ilustração do padrão de alterações dos usos do solo na Rondónia (bacia hidrográfica do Amazonas), ao longo de 22 anos, decorrentes da presença de uma estrada. O padrão é bastante comum: a partir de uma estrada principal irradiam estradas secundárias e destas ainda umas terciárias e, adjacentes a todas elas, assiste-se à substituição de floresta madura por floresta secundária e pastagens. Com o passar dos anos, apenas alguns fragmentos da floresta inicial ficaram dispersos pela área de estudo.

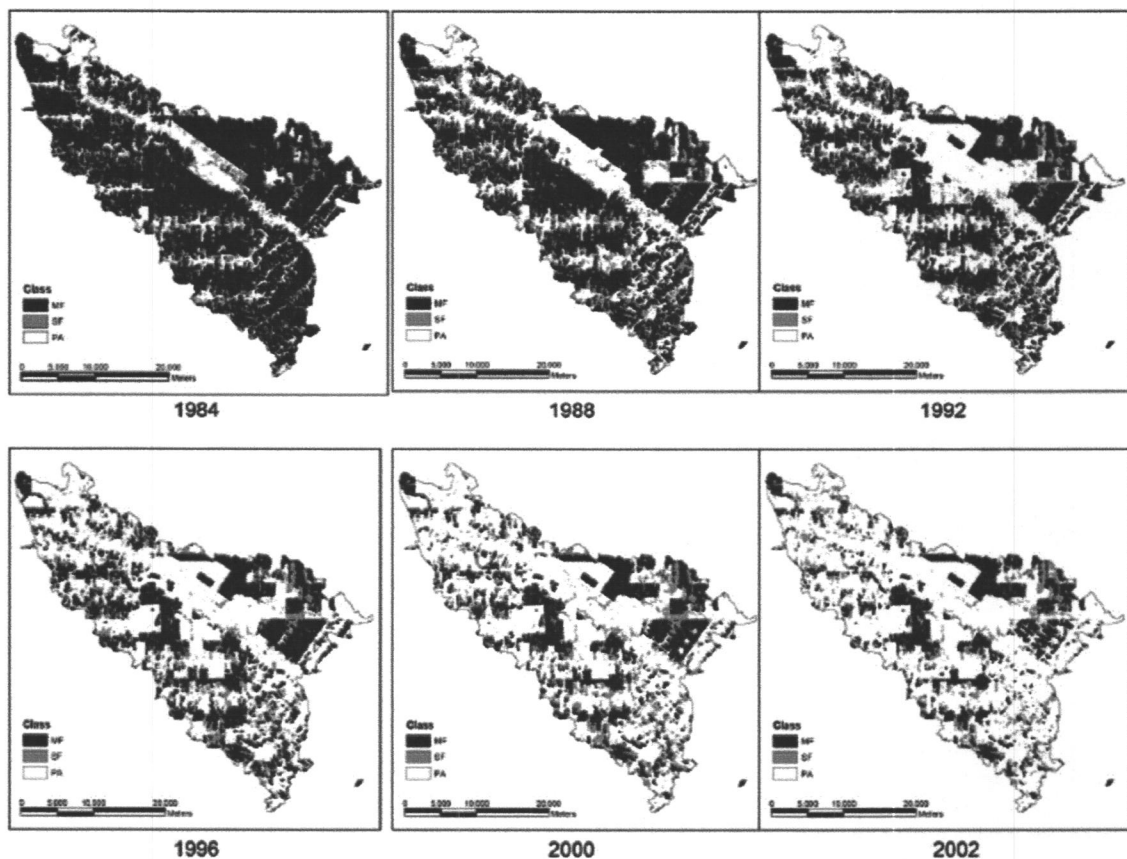


Figura 2. Sequência temporal da alteração dos usos do solo na Rondónia 1984-2002 (extraído de Barros Ferraz *et al.*, 2005). MF, floresta madura; SF, floresta secundária, PA, pastagens.

Além do comportamento de evitamento da estrada, a presença de actividade humana altera os padrões comportamentais: no lince-ruivo (*Lynx rufus*) tornou-se claro que as

áreas vitais dos indivíduos que viviam próximos de povoados eram maiores e que a actividade destes era mais nocturna que a dos animais em zonas inteiramente selvagens (Riley *et al.*, 2003).

Mitigação

A minimização dos efeitos negativos de uma estrada sobre as populações e habitats inicia-se com a escolha do traçado da mesma. Na escolha dos corredores possíveis deverão ser tidos em conta os impactos arqueológicos, culturais, sociais, ambientais bem como os custos e dificuldades técnicas associados a cada corredor. Assim, uma abordagem holística que permita ter em conta os pontos de vista de todos os actores deverá ser utilizada no processo de tomada de decisão. Nestes casos as multimetodologias de apoio à decisão, como o *MACBETH*, ao utilizarem modelos aditivos nos quais apenas são requeridos julgamentos qualitativos, podem revela-ser inestimáveis na tomada de decisões (Bana e Costa *et al.*, 2003).

As passagens de fauna são estruturas desenhadas para aumentar a permeabilidade e conectividade entre os habitats através de uma estrada (Clevenger e Waltho, 2000). O desenho e construção destas passagens de fauna representam um enorme desafio tanto para engenheiros como para ecologistas, pelo que, idealmente, deveriam ser delineadas para minimizar a mortalidade e a fragmentação dos habitats para toda a fauna e não apenas para uma espécie ou grupo taxonómico (Aresco, 2003). No entanto, como salientam Clevenger *et al.* (2003), a minimização da mortalidade é feita reduzindo acesso dos indivíduos à estrada, pelo que assim se aumentam os problemas de conectividade ao restringir os movimentos das populações. Ao invés, dever-se-ia privilegiar um amplo acesso a passagens inferiores. Alguns factores que têm sido considerados relevantes para a utilização de passagens de fauna inferiores são: localização, substrato, vegetação na entrada, utilização de vedações, índice de abertura, actividade humana nas imediações (Alexander e Waters, 2000; Austin e Garland, 2001; Clevenger e Waltho, 2000; Cain *et al.*, 2003; Clevenger e Waltho, 2005). Dado que por vezes diferentes espécies respondem de diferente maneira aos diferentes factores (*e.g.* distância à vegetação), é importante que, aquando do delineamento das passagens a empregar, incluir estruturas variadas em tamanho e características físicas (Clevenger e Waltho, 2005).

Algumas medidas podem ser bastante eficazes para alguns grupos faunísticos: a mortalidade de tartarugas numa estrada da Florida foi reduzida em 99% após a instalação de redes e passagens inferiores (Aresco, 2003). Sempre que medidas mitigadoras não possam ser aplicadas ou se revelem insuficientes, é desejável que se tomem medidas compensatórias como a reposição dos habitats ou melhoramento dos habitats marginais (van Bohemen, 1998).

A monitorização pós-construção deve ser também delineada *a priori* e, dado que é difícil para as promotores responsáveis pela construção conduzi-las, devem ser criadas parcerias com grupos de investigação das universidades e/ou organizações ambientais (Nelson *et al.*, 2006). A falta de manutenção pós-construção deve ser assegurada igualmente, pois, com o tempo, as passagens inferiores ficam assoreadas com o passar do tempo e cheias de detritos, ficando inutilizáveis pelas espécies-alvo (Cain *et al.*, 2003; Puky e Vogel, 2003).

Os anfíbios e as estradas

Problemas identificados

Os anfíbios encontram-se entre a fauna mais afectada pelo mau planeamento rodoviário associados a zonas húmidas, causando mortalidades muito elevadas, criando barreiras às migrações sazonais ou em consequência de secas e aos movimentos de dispersão e dentro da área vital (*home range*) (Forman e Alexander, 1998; Trombulak e Frissell, 2000; Aresco, 2003; Gibbs e Shriver, 2005). Estima-se que a mortalidade de anfíbios corresponde a cerca de 70 a 88% da mortalidade total dos vertebrados em estradas na Europa Central (Puky, 2003).

Em áreas onde estradas separam charcas de reprodução dos habitats terrestres, a mortalidade de anfíbios por atropelamento pode ameaçar seriamente as populações de anfíbios. A mortalidade não afecta somente aqueles poucos indivíduos errantes que atravessam a estrada ou aqueles indivíduos com áreas vitais interceptados pela mesma, mas populações inteiras que são forçadas a atravessar a estrada aquando das migrações sazonais. O ciclo biológico anual de algumas espécies requer distintos habitats de

reprodução, de hibernação e de estivação, devendo a conectividade entre estes locais ser assegurada (Lesbarrères *et al.*, 2003). Num único período de migração, mais de 100000 (!) sapos-verdes (*Bufo viridis*) terão sido atropelados numa estrada quase sem tráfego (5 veículos/hora) ao abandonarem o local de reprodução no Parque Nacional Duna-Dráva, na Hungria (Puky, 2000).

Os anfíbios executam quatro tipos de deslocamentos:

1. Área vital (*Home range*) – movimentos regulares dentro de uma área fixa,
2. Migratórios – movimentos sazonais para reprodução,
3. Dispersão – movimento de afastamento dos juvenis do local de nascimento,
4. Deslocamentos geográficos – movimento a longo prazo de populações em função de alterações ambientais.

Os anfíbios não percebem os riscos associados ao atravessamento de uma estrada (Gibbs e Shriver, 2005), sendo as espécies que se movimentam mais (*higher vagility*) aquelas que se encontram mais ameaçadas, pois atravessam estradas mais frequentemente do que as espécies mais sedentárias (Carr e Fahrig, 2001). No entanto, e há sempre um “no entanto”, maior capacidade dispersora pode ser uma vantagem para a colonização bem sucedida de um fragmento num contexto de habitats fragmentados, seja por estradas, seja por alterações do uso do solo (Ficetola e De Bernardi, 2004).

Gibbs e Shriver (2005) calcularam, com base em modelos matemáticos, que a mortalidade de mais de 10% da população de adultos da salamandra-maculada (*Ambystoma maculatum*) em migração durante o período da reprodução, seria suficiente para causar a extinção local. Hels e Buchwald (2001) ao estudarem a mortalidade de seis espécies de anfíbios chegaram a valores, para a fracção da população que perecia nas estradas, que iam de 7 a 25%.

Assim, à mortalidade rodoviária, que acresce às causas de mortalidade naturais, como eventos de extinção local durante períodos de tempo excepcionalmente secos, a dificuldade das populações em realizarem as suas migrações de e para os locais de reprodução, a destruição de habitats, populações menores e o risco de extinções locais, em conjunto, fazem perigar enormemente as populações de anfíbios em todo o mundo. Os efeitos das estradas têm sido apontados como um dos factores responsáveis pelo declínio mundial das populações de anfíbios (Blaustein e Wake, 1990). A diminuição

das populações de anfíbios, bem como de répteis e pequenos mamíferos, poderá levar a uma quebra na cadeia alimentar e dramaticamente reduzir a abundância e diversidade da fauna nesses locais (Jackson, 1996).

Mitigação

Algumas mudanças positivas têm sido registadas na abordagem dos construtores de estradas quanto à mitigação dos seus efeitos sobre a fauna, e em particular sobre os anfíbios: nos anos 90 a questão era se seriam necessários túneis enquanto que na entrada do século XX a questão é em que número e com que características (Puky e Vogel, 2003). A mortalidade de anfíbios pode ser mitigada de diversas maneiras: aquando da construção evitando locais de reprodução ou rotas migratórias, fechando troços de estrada em determinadas alturas do ano ou aplicando medidas de minimização da mortalidade como passagens inferiores vedadas.

O primeiro túnel para salamandras nos EUA foi construído em 1987 em Amherst, Massachussetts. Este túnel, experimental, foi monitorizado subsequentemente tendo-se concluído que 76% das salamandras-maculadas (*Ambystoma maculatum*) conseguiram caminhar ao longo das vedações, detectar a entrada do túnel, atravessá-lo e sair no outro extremo (Jackson, 1996). Um dos factores que neste estudo pareceu afectar a probabilidade de passagem das salamandras-maculadas foi a iluminação dos túneis, com estas a preferirem atravessar túneis com alguma iluminação, sendo mesmo sugerida a instalação de luz artificial ou clarabóias que permitam a entrada de alguma luz.

Entretanto, as passagens de fauna construídas para grandes mamíferos geralmente são colocadas sobre linhas de água e, eventualmente, poderiam ser adaptadas com a colocação de rochas aplanadas que permitissem a passagem a anfíbios, no entanto, muitos anfíbios não migram ao longo de linhas de água (Jackson, 1996). Houve alguns autores que propuseram inclusivamente que as passagens de fauna poderiam servir como armadilhas para mamíferos predadores, porém, Little *et al.* (2002), descartaram esta hipótese numa revisão bibliográfica.

A pele nua dos anfíbios sujeita-os a taxas de evaporação mais elevadas que os verificados noutros vertebrados terrestres, pelo que estes preferem migrar ao longo de zonas com elevado teor de humidade devendo assim as passagens para anfíbios ser

desenhadas em função deste constrangimento fisiológico. As barreiras que impedem os animais de alcançar a estrada deverão encontrar-se enterradas no solo e ser regularmente monitorizadas para garantir que não existem aberturas por baixo, resultantes da erosão ou escavação por animais, e a vegetação junto às barreiras deverá também ser controlada para evitar que os animais possam trepar e alcançar o pavimento (Dodd *et al.*, 2004).

Medidas compensatória deverão ser tomadas sempre que hajam habitats destruídos, tornados menos acessíveis ou cuja qualidade tenha sido degradada de alguma forma. No caso particular dos anfíbios, uma possibilidade é a criação de novas zonas húmidas que compensem a degradação sofrida pelas zonas húmidas que tenham sido degradadas pela presença de uma estrada próxima. Aquando da construção de um troço da estrada Bayview Avenue (Ontário, Canadá), que implicava a destruição de cerca de 1,5 ha de zonas húmidas, foram criadas três novas zonas húmidas como medida compensatória: uma em que apenas foi desenhada a topografia e deixada em evolução (*Do-nothing cell*), noutra foram utilizados os materiais (substrato, matéria orgânica e plantas) salvados da área destruída e noutra foi realizada a plantação com sementes de vegetação aquática (Gartshore e Rook, 2006). Este delineamento permite avaliar o desempenho das três soluções para futuras acções compensatórias semelhantes.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Amphibian roadkills hotspots analysis

ANÁLISE DOS PONTOS NEGROS DE ANFÍBIOS

As populações de anfíbios encontram-se entre as mais ameaçadas pelos efeitos das estradas, quer por atropelamento quer por efeitos indirectos. O uso de medidas mitigadoras da mortalidade é urgente em locais de elevada mortalidade (pontos negros), particularmente passagens inferiores vedadas que servem a maioria das espécies. A composição específica dos pontos negros foi estudada numa estrada de 7,3 km no Alentejo (Portugal) de dados colectados em 41 sessões de amostragem realizadas entre Setembro de 2003 e Dezembro de 2005. Registámos 1440 indivíduos das 12 espécies ocorrentes na área de estudo e identificámos, com recurso ao método de Malo, 17 pontos negros que são secções com uma taxa de mortalidade superior ao esperado para uma dada média sob a distribuição de Poisson. As espécies presentes nestes pontos negros foram separadas em dois grupos através de uma análise de agrupamento de k médias que colocou num grupo *B. calamita*, *D. galganoi*, *P. cultripes* e *S. salamandra* as restantes 8 num segundo grupo. Pontos negros foram detectados para cada um destes grupos e sujeitados a um teste G de independência que mostrou que estes pontos negros dos grupos são independentes entre eles mas associados aos pontos negros baseados em todas as espécies, o que sugere que poderá haver diferentes tipos de pontos negros segregados espacialmente. Assim, recomenda-se a análise da composição específica dos pontos negros aquando do delineamento da localização das passagens inferiores.

Palavras-chave: anfíbios, atropelamento, pontos negros, distribuição de Poisson, composição específica, análise de aglomeramento

Assessment of locations of amphibian underpasses using Gorelick's modification of Shannon index

AVALIAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DE PASSAGENS INFERIORES PARA ANFÍBIOS USANDO O ÍNDICE DE SHANNON MODIFICADO POR GORELICK

Estudámos sete critérios para a selecção de localizações de sete passagens inferiores para mitigação da mortalidade rodoviária de anfíbios. Os critérios a maximizar foram: número total de indivíduos, frequência relativa das espécies, riqueza específica, índice de diversidade de Shannon, índice de equitabilidade, pontos negros específicos e pontos negros específicos ponderados. Um conjunto de sete secções foi escolhido para cada critério. Estes conjuntos foram comparados entre eles e com conjuntos aleatórios de acordo com o seu desempenho em cada critério e com o índice de biodiversidade de Shannon modificado por Gorelick (GBI_H). O GBI_H está firmemente apoiado na teoria da informação e tem em conta simultaneamente as riquezas específicas e abundâncias relativas em diversos fragmentos. Os resultados mostram que os conjuntos que maximizavam o índice de diversidade de Shannon, índice de equitabilidade e pontos negros específicos obtiveram maiores valores de GBI_H mas um teste de Kruskal-Wallis indicou não haver diferenças entre os conjuntos seleccionados em nenhum dos critérios considerados. No entanto, os conjuntos seleccionados tiveram um melhor desempenho que conjuntos aleatórios em todos os critérios. Assim, propomos que o GBI_H deverá ser um parâmetro a ter em conta na avaliação dos melhores locais para o emprego de medidas de mitigação da mortalidade rodoviária de anfíbios.

Palavras-chave: anfíbios, mitigação, mortalidade rodoviária, selecção de locais, teoria da informação

AMPHIBIAN ROADKILLS HOTSPOTS ANALYSIS

Baptista, N.^{1,2} & Sá-Sousa, P.¹

¹Unidade de Biologia da Conservação, Departamento de Biologia, Herdade da Mitra, 7002-544 Évora, Portugal

²Corresponding author: baptista.n@gmail.com

Abstract

Amphibian populations are amongst the most threatened by the road effects either by roadkills or indirect affects. The use of mitigation measures is urgent in places with high roadkills rate (hotspots), particularly fenced underpasses which serve most of the amphibian species. The species composition of hotspots was studied in a 7.3 km road in Alentejo (Portugal) from data collected in 41 sampling nights conducted between September 2003 and December 2005. We've recorded 1440 individuals from the 12 species present in the study area and identified with Malo's method 17 hotspots, which are sections with a roadkill rate higher than expected for a given mean under the Poisson distribution. The species present in hotspots were separated in two clusters by a k-means clustering which divided *B. calamita*, *D. galganoi*, *P. cultripes* and *S. salamandra* for one cluster and the remaining 8 for a second cluster. Hotspots were identified for each of these clusters and were subjected to G-test of independence which shown that these clusters' hotspots are independent between them and associated to the hotspots based in all species which suggests the existence of different types of blackspots segregated spatially. Thus, we recommend some attention on the specific composition of blackspots when delineating the best locations for amphibian underpasses.

Keywords: amphibian, roadkills, hotspots, Poisson distribution, specific composition, clustering analysis.

Introduction

As the road effect zone is growing and occupying all wildlife's suitable habitats, the amphibians appear amongst the most threatened species. Amphibians are the vertebrate group most road-killed (Puky, 2003) and the more road-affected due to their activity patterns, population structure and preferred habitats (Hels & Buchwald, 2001). Moreover many amphibian species use more than one habitat to satisfy their needs (e.g. reproduction, over-wintering, aestivation) and for such they seasonally migrate between habitat patches, and when these movements pass over roads mortality can be substantial (Fahrig *et al.*, 1995). Besides massive mortality, several other road effects on amphibian populations are already established: reduced population size near roads particularly those with high traffic, habitat fragmentation, reduced probability of occupation of ponds, pond contamination, genetic isolation and inbreeding (Fahrig *et al.*, 1995; Vos & Chardon, 1998; Hels & Buchwald, 2001; Joly *et al.*, 2003; Lesbarrères *et al.*, 2003; Carr & Fahrig, 2004; Gibbs & Shriver, 2005; Sanzo & Hecnar, 2006; Orłowski, in press). No

surprisingly, the increasing road density has been pointed out as one of the possible causes for the global declining of amphibian populations documented all over the world (Blaustein & Wake, 1990; Houlihan *et al.*, 2000).

The metapopulation structure of amphibian populations makes them quite vulnerable to road mortality. Breeding ponds lacking connectivity to suitable terrestrial habitats may act as population sinks due to high juvenile mortality during dispersal movements (Rothermel, 2004). Particularly in the Mediterranean region the amphibian ponds are subjected to episodic droughts that may provoke local extinctions of tadpoles and so they are highly dependent of an effective capacity of recolonization (Grillas *et al.* 2004). Gibbs and Shriver (2005) verified that an annual mortality of 10% of the adult population of *Ambystoma maculatum* would be enough to cause a local extinction, while Hels and Buchwald (2001) have estimated, while studying six amphibian species, an annual mortality of 7 to 25% of population killed on the road. Together these figures illustrate the level of threat experienced by amphibian populations.

Amphibians have trait that affects the likelihood of getting killed on the road is the vagility of the species; the more vagile the species the more likely is to encounter a road a get over-run behavioural trait that makes them even more jeopardised like long periods of inactivity on the road. For example many amphibian species are seen stopped on the road and when a car approaches the typical reaction is to remain immobile (Mazerolle, 2005), which grants crypsis in the wild but it makes more likely the over-run on the road. Other behavioural trait that affects the likelihood of getting killed on the road is the vagility of the species; the more vagile the species the more likely is to encounter a road a get over-run (Carr & Fahrig, 2001). However, a greater vagility it is an advantage for the successful recolonization of a patch in a context highly fragmented landscape due to roads and land use modifications (Ficetola & De Bernardi, 2004).

The use of mitigation measures is urgent in places with high roadkills, particularly fenced underpasses which serve most of the species and provide a safe connectivity in the divided landscape reducing barrier effect. The fences typically used are very effective in diverting amphibian species into underpasses and preventing amphibian roadkills (93.5%), except for hylid treefrogs that are able to climb and trespass them (Dodd Jr. *et al.*, 2004). Thus, the location of these structures should be chosen to cover most of the biodiversity present in the road to be upgraded.

There are a few methods to identify hotspots (sites of roadkills aggregation) such as neighbour k statistics (Clevenger *et al.*, 2003), kernel density function (Ramp *et al.*,

2005), nearest neighbour hierarchical clustering (Levine, 2004) or Malo's method (Malo, 2004). In a comparative study of techniques to identify hotspots Gomes and colleagues (submitted) concluded that Malo's method should be preferred in hotspot identification. The Malo's method is based on the Poisson distribution, the distribution expected to be followed by roadkills in each road segment, and involves the identification of road segments with a roadkill rate higher than expected by chance under this distribution. The Poisson distribution is a discrete frequency distribution of the number of times a rare event occurs, and to calculate the relative expected frequencies of a Poisson distribution we only need to know the mean of the events (Sokal & Rohlf, 1998). For larger means, the density curve of a Poisson distribution becomes similar to a Gaussian density curve, with a bigger width and symmetrical, reflecting the larger variance (Zuur *at al.*, in press).

In this study our goal was to detect agglomerations in the amphibian roadkills and further analyze these agglomerations (hotspots) in terms of species associations. To achieve this goal, we (i) applied spatial autocorrelation indexes to detect evidence of clustering; (ii) used the Malo's method to detect sections with significantly high roadkills rate; (iii) employed clustering techniques on species present in hotspots to identify similar patterns. Finally, hotspots were identified separately on these clusters and compared with the original hotspots obtained with all data.

Methods

The EM-1078 is a 7.3 km rural road located in Alentejo Central near Évora, Portugal, begins in Valverde and crosses a small village (Giesteira) before reaching the N-114. It's surrounded by chaparral of cork oak (*Quercus suber*) and Holm oak (*Quercus rotundifolia*), pastures in lowlands and some small olive yards and agricultural fields near the settlements. This road accompanies closely a river (Ribeira de Guadalupe) and has many cattle pools and small drainages in the proximities.

The road is paved and the maximum velocity allowed is 90 km/h except for the urban area (<50 km/h), the average traffic volume diminishes from 100 vehicles per hour at the period 5-6pm till 30 vehicles per hour at 11-12pm, and is greatest in the segment Guadalupe-N114 than in the Valverde-Guadalupe (Soares, *pess. com.*).

In the study area there are 12 amphibian species according to Malkmus (2004) which IUCN and ICN conservation status, as well as the acronym that will be used throughout the text may be observed in Table 1.

Table 1. Species present in the study area and respective acronym and IUCN and ICN conservation status.

Species	Common Name	Acronym	IUCN	ICN
Urodela				
<i>Lissotriton (=Triturus) boscai</i>	Bosca's newt	TB	LC	LC
<i>Pleurodeles waltl</i>	Sharp-ribbed salamander	PW	NT	LC
<i>Salamandra salamandra</i>	Common fire salamander	SS	LC	LC
<i>Triturus pygmaeus</i>	Southern marbled newt	TP	NT	LC
Anura				
<i>Alytes cisternasii</i>	Iberian midwife toad	AC	NT	LC
<i>Bufo bufo</i>	Common toad	BB	LC	LC
<i>Bufo calamita</i>	Waterjack toad	BC	LC	LC
<i>Discoglossus galganoi</i>	Iberian painted frog	DG	LC	NT
<i>Hyla arborea</i>	European common tree frog	HA	LC	LC
<i>Hyla meridionalis</i>	Mediterranean tree frog	HM	LC	LC
<i>Pelobates cultripes</i>	Western spadefoot	PC	NT	LC
<i>Rana perezi</i>	Iberian waterfrog	RP	LC	LC

Between September 2003 and December 2005, 41 samplings were conducted on nights favourable to the occurrence of amphibians. The sampling sessions started in the first hour after sunset and all the length of the road was covered by car at very low speeds (<20 km/h), and each amphibian, dead or alive, was identified till the species and its position recorded, being released in the roadside afterwards.

The spatial autocorrelation was assessed with the Moran's I, Geary's C and Neumann's serial autocorrelation statistics to test whether the roadkills appear clustered or randomly distributed. The Moran's I typically range between -1 and +1, where 0 means no correlation and -1 and +1 represents negative and positive autocorrelation, respectively. The Geary's C range between 0 and -2, although this is not a strict upper limit, values greater than 1 indicate negative autocorrelation, less than 1 denote positive spatial autocorrelation while 1 indicates no spatial correlation. The Geary's C statistics is more sensitive to differences at small neighbourhoods as it is a distance-type function which emphasizes the differences between pairs of observations whereas Moran's I analyses the covariance between pairs of observations behaving like a global indicator (Legendre & Legendre, 1998; McCune & Mefford, 1999). These indexes were calculated in CrimeStat 2.0 (Levine, 2002).

The serial autocorrelation was assessed with the normal approximation for $n > 25$ of the

formula proposed by von Neumann: $t_s = \frac{|1 - \eta / 2|}{\sqrt{(n - 2) / (n^2 - 1)}}$, where η is the ratio

between the sum of squared observations and the sum of squared differences between consecutive observations (Sokal & Rohlf, 1995).

The hotspots were located using Malo's method, in which hotspots are all those sections of arbitrary length which have a roadkill rate higher than expected by chance under a Poisson distribution for a given mean of roadkills/section (λ) (Malo *et al.*, 2004). Thus,

the probability associated to a section with x roadkills is: $p(x) = \frac{\lambda^x}{(x!e^\lambda)}$. Any section

with x roadkills for a given λ will be considered a hotspot if the probability of getting an

equal or greater x is lower than $P(x) < 0.05$, where $P(x) = 1 - \sum_{x=0}^{x-1} p(x)$.

Clustering methods - hierarchical cluster analysis and k-means clustering - were used to agglomerate species with similar responses in hotspots to separate them in clusters. New hotspots were identified for these two groups with Malo's method and these types of hotspots were compared with G-test of independence: the absence of association would be an evidence of the existence of different types of hotspots. The G-test of independence is a test of independence specially suited for 2x2 tables of Model I (totals not fixed) (Sokal & Rohlf, 1998). This test is based on the multinomial distribution, which is a discrete probability distribution that correspond to a generalization of the binomial distribution and tests whether two properties (criteria) are manifested independently and not if a property occurs at a given proportion as the G-test. The null hypothesis assumes that there is independency between criteria.

Results

In the Table 2 may be observed the results of the 41 sampling sessions undertaken in 2003-2005, comprising 1440 animal detected (dead and alive), identified and removed from the pavement. All the 12 species present in the study area were found on the road. One third of the species - western spadefoot (*Pelobates cultripes*), naterjack toad (*Bufo calamita*), common fire salamander (*Salamandra salamandra*) and Iberian painted frog (*Discoglossus galganoi*) - constitute two thirds of all records. The average of dead individuals is 37% but the lowest value is obtained by *Triturus pygmaeus* (21%) and the highest by *Discoglossus galganoi* (44%).

Table 2. Frequency of animals detected on the road.

Species	Alive	Dead	Total
LB	15	4	19
SS	134	89	223
TP	38	14	52
PW	61	41	102
AC	25	9	34
BB	34	24	58
BC	185	93	278
DG	88	69	157
HA	3	1	4
HM	44	24	68
PC	211	136	347
RP	64	34	98
TOTAL	902	538	1440

Apparently, the smaller the species, the smaller its proportion of dead individuals and this relationship it's more apparent if we plot separately anurans and urodels's scatterplot of length/proportion of dead as it may be observed in Fig. 2. The typical body length of each species was obtained from the Portuguese herpetological guide (Almeida *et al.*, 2001).

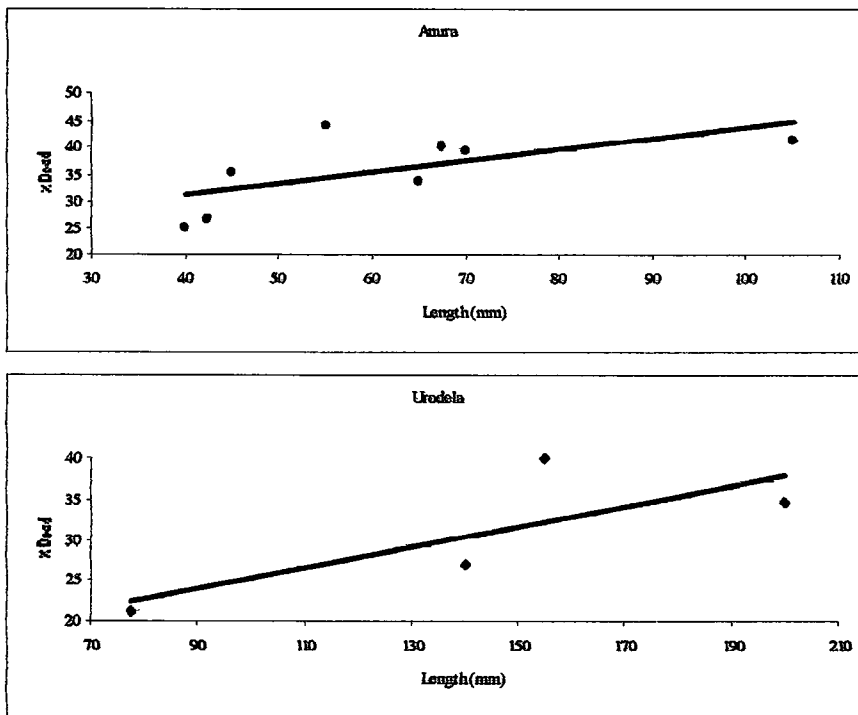


Fig. 1. Scatterplot of the proportion of dead and typical length of each species.

The 73 section yielded an average of 19.7 individuals/section but in two sections (1 and 43) no animal was recorded presumably because these sections are located within small villages of Valverde and Guadalupe, respectively.

The spatial autocorrelation indexes Moran's I and Geary's C were calculated for all data resulting in a non significant Moran's I ($I=0.223; Z=6.744; P=1.000$) and a significant Geary's C ($C=0.729; Z=-7.560; P=0.000$). The significant Geary's C emphasizes the existence of similarity at small scale whereas the non significant Moran's I highlights the inexistence of autocorrelation at a broader scale. As the Geary's C is lower than 1 this indicates positive spatial autocorrelation, *i.e.* sections close together have more similar values than when compared with sections further apart. This last result is strengthened by a significant test for serial autocorrelation ($\eta=0.186; T_s=7.053; P=0.000$) which reinforces the self-similarity of adjacent values.

The hotspots were detected as sections that presented a value significantly higher than what would be expected by chance under the Poisson distribution for the average observed globally: 19.7 ind/hm. In Fig. 2 it may be observed that this procedure detected 13 sections with values equal or higher than 28 ($P<0.046$) some of which side by side, originating 8 contiguous hotspots zones. The majority of hotspots are located or in the beginning of the road (sections 4-14) or in the sixth kilometre (sections 61-69). These 13 hotspots represent 17.8% of the total length of the road but comprise 33.5% of all animals detected.

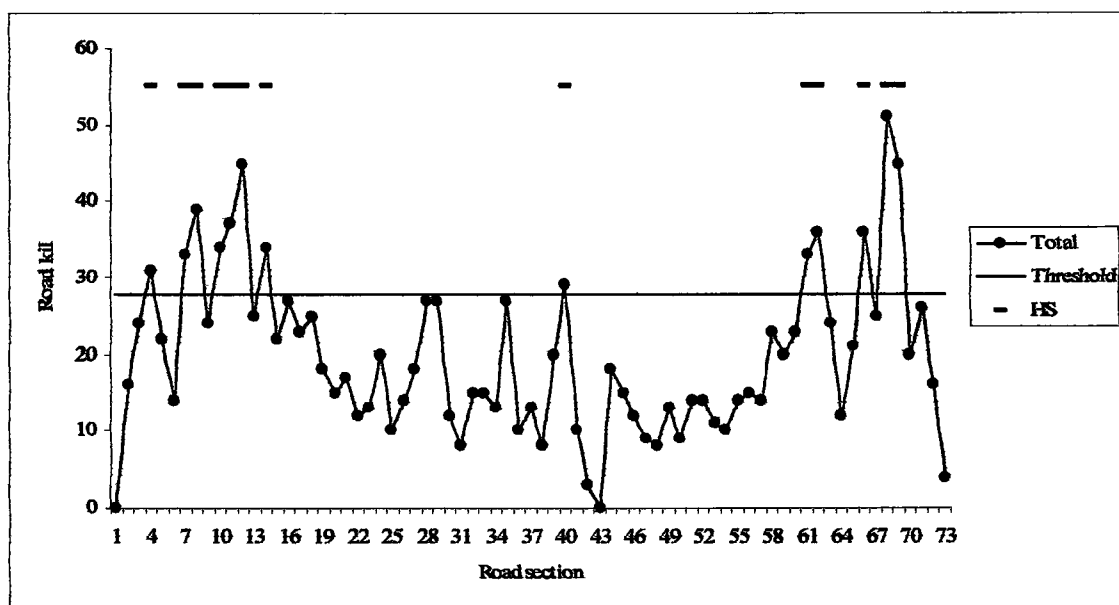


Fig. 2. Total of individuals detected in each road section. The horizontal line represents the critical value for a section be considered a hotspot (28 individuals). The small dashes at the top indicate hotspots.

In order to analyze whether the species composition of hotspots (P IN) was similar to that observed out of hotspots (P OUT) and with all sections (P TOTAL), a G-test for

goodness of fit was carried out for the three possible combinations. In Table 3 it may be observed that there are differences in the species composition of hotspots when compared to that observed out of hotspots and for all data but show no differences between the species composition out of hotspots and the global composition.

Table 3. Results of the G-test for goodness of fit for the proportion of species in and out of hotspots. P IN = P OUT, expected proportion in hotspots equal to the observed out; P IN = P TOTAL, expected proportion in hotspots equal to the observed in all sections; P OUT = P TOTAL, expected proportion out of hotspots equal to the observed in all sections.

COMPARISON	G	P
P IN = P OUT	72.294	0.000
P IN = P TOTAL	23.129	0.017
P OUT = P TOTAL	17.498	0.094

Table 4. Results of the G-test for goodness of fit for the proportion of each species in and out of hotspots. P IN = P OUT, expected proportion in hotspots equal to the observed out; P IN = P TOTAL, expected proportion in hotspots equal to the observed in all sections; P OUT = P TOTAL, expected proportion out of hotspots equal to the observed in all sections.

Species	P IN = P OUT			P IN = P TOTAL			P OUT = P TOTAL		
	G	P	TREND	G	P	TREND	G	P	TREND
LB	2.856	0.091		1.165	0.28		0.656	0.418	
PW	0.735	0.391		0.247	0.619		0.179	0.672	
SS	1.572	0.21		0.561	0.454		0.378	0.539	
TP	0.25	0.617		0.089	0.765		0.06	0.806	
AC	8.43	0.004	MORE	2.37	0.124		2.085	0.149	
BB	11.826	0.001	LESS	4.914	0.027	LESS	2.694	0.101	
BC	4.531	0.033	LESS	1.634	0.201		1.086	0.297	
DG	29.644	0.000	MORE	8.796	0.003	MORE	7.311	0.007	LESS
HA	4.166	0.041	MORE	0.904	0.342		1.003	0.317	
HM	9.479	0.002	MORE	2.832	0.092		2.34	0.126	
PC	4.755	0.029	LESS	1.702	0.192		1.142	0.285	
RP	0.598	0.439		0.202	0.653		0.146	0.703	

These results were further analyzed to identify which species were responsible for the differences detected in the previous comparisons. For such, a G-test for goodness of fit was applied for each species for each comparison (P IN = P OUT; P IN = P TOTAL; P OUT = P TOTAL) (Table 4). The Iberian midwife toad, the Iberian painted frog and the Mediterranean tree frog had a proportion in hotspots higher than if the expected proportion was that observed out of hotspots while the common toad, the waterjack toad and the western spadefoot were underrepresented. The comparison with the overall proportion revealed that the proportion of Iberian painted frog in hotspots was higher than expected, while for the common toad was lower. Although the species composition of out of BS did not differ from the total proportion, the Iberian painted frog was found out of hotspots with a proportion significantly lower. Thus, Iberian painted frog appears



as pivotal species in these comparisons as it appears massively in hotspots and seems to avoid non hotspots areas.

Species in hotspots were separated in two groups with a k-means clustering which have putted together naterkack toad, Iberian painted frog, western spadefoot and common fire salamander in one cluster and the remaining species in the second cluster. This separation is illustrated by the tree resultant of the hierarchical cluster analysis with Jaccard's coefficient and complete algorithm of agglomeration performed on species in hotspots (Fig 3.).

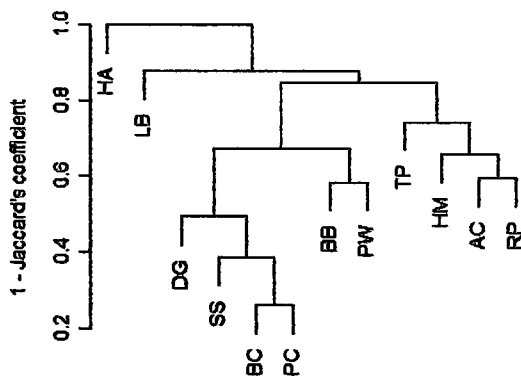


Fig. 3. Hierarchical cluster analysis of species on hotspots. Measure of similarity: Jaccard's coefficient; agglomeration method: complete.

The first and second clusters comprised 1005 and 435 individuals, respectively, yielding an average of 13.8 and 6.0 ind/hm. This two data sets were treated separately to detect hotspots in cluster 1 (type-1 hotspots) and in cluster 2 (type-2 hotspots) under the Poisson distribution. Any section with 21 or more individuals from cluster 1 ($P < 0.043$) and 11 or more from cluster 2 ($P < 0.043$) was considered a hotspot of type 1 (HS 1) and 2 (HS 2), respectively. This procedure generated 12 type-1 hotspots and 11 type-2 hotspots of which 1 is a common section (Fig. 4), thus, the total number of sections selected as hotspots of either type is 22 (HS 1/2).

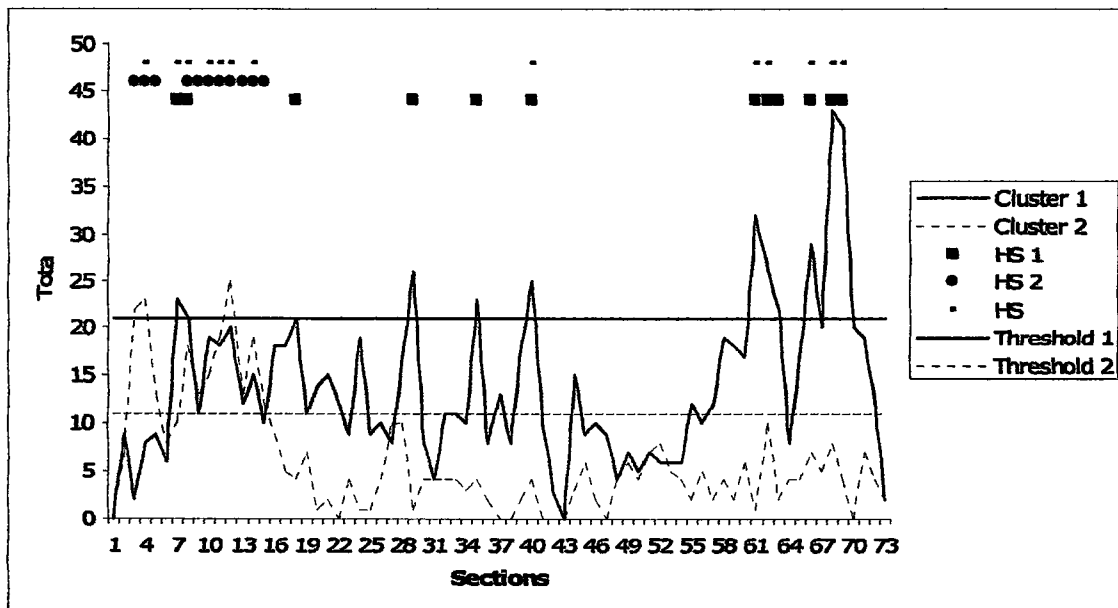


Fig. 4. Total of individuals detected in each road section for each cluster. The hotspots based on totals (HS) and of type 1 and 2 (HS 1 and HS 2) and are shown as squares, circles and triangles, respectively. The threshold for hotspots type 1 and 2 are shown as full and dashed line, respectively, 21 and 11 individuals.

These three types of hotspots were subjected to G-test of independence in order to analyze whether there were an association between this types of hotspots. The results in Table IV show that type-1 hotspots and type-2 hotspots are independent but hotspots based in the total are not independent of hotspots of either type (HS 1, HS 2). The sensitivity (correct hotspots identified) and specificity (correct non hotspots sections identified) of HS 1, HS 2 and HS 1/2 are shown in Table V. Type-1 hotspots had better accuracy in identifying hotspots (66.7%) while hotspots of type 1 or 2 (HS 1/2) identified correctly all non hotspots and presented a better overall performance 79.6%.

Table 5. Results of the G-test of independence. a, HS common for both criteria; b, HS exclusive of the first criteria; c, HS exclusive of the second criteria; d, non HS in both criteria. HS, hotspots for all data; HS 1, hotspots for cluster 1; HS 2, hotspots for cluster 2.

Comparisons	a	b	c	d	Total HS	Common HS	G	William's	G _{adj}	P
HS 1 X HS	8	4	5	56	17	0.471	18.528	1.084	17.098	0.000
HS 2 X HS	6	5	7	55	18	0.333	9.524	1.091	8.731	0.003
HS 1 X HS 2	1	11	10	51	22	0.045	0.576	1.098	0.525	0.469
HS 1/2 X HS	13	9	0	51	22	0.591	38.630	1.050	36.793	0.000

Table 6. Sensitivity and specificity of the three hotspot types. The mean correct hotspots or non hotspots identified are also shown. HS, hotspots for all data; HS 1, hotspots for cluster 1; HS 2, hotspots for cluster 2.

Comparisons	Sensitivity	Specificity	Mean
HS 1 X HS	0.667	0.918	0.793
HS 2 X HS	0.545	0.887	0.716
HS 1/2 X HS	0.591	1	0.796

Discussion

All amphibian species present in the study area were recorded on the road, what suggests that the roads affect all species and that the road cruises are possibly one of the best methods to assess the species richness of an area with low effort. The frequency of dead individuals (37.4%) it's very low when compared with the 75.6% dead individuals in a near road (Ascensão, in prep.), this difference must arise from the slightly superior road traffic (personal observation). The observed 4.8 ind/km/sampling it is very similar to that 5.5 ind/km/sampling found by Ascensão *et al.* (in prep.), and for other studies with similar methodologies (e.g. Fahrig *et al.*, 1995, 4.8 ind/km/sampling; Mazzerolle, 2004, 6.3 ind/km/sampling). In the present study the species composition is unbalanced as the eight less abundant species correspond to 30.2% of the total number of individuals while *P. cultripes* alone constitutes 24.1%. However this asymmetry must arise from the degree of abundance of the species in the study area and not from a phenomenon of differential detection (conspicuous species over-represented) or highly differentiated retention times (time a dead individual endures on a road). The common toad it's one of the most conspicuous species and more lasting on the pavement but constitutes just 4% of the total.

However smaller species yielded lowest proportion of dead individuals which seem to be a function of one of two things: a) lowest time of persistence of carcasses/detectability, a small and delicate species is easily destroyed by passing vehicles and become rapidly undetectable; b) lowest probability of being killed. This last point was recognized by Hels and Buchwald (2001) which incorporated the length of the species in their equation for the probability of survival one road crossing in the coefficient a ($a = \text{killing width of car} = \text{twice the width of the tyre plus twice the body length of the species in question}$). Thus, for the same animal's velocity a common fire salamander with 20 cm is more likely to get over-run by a passing vehicle than a Mediterranean tree frog with four centimetres.

The autocorrelation results indicate the existence of a positive autocorrelation at small scale which probably is due to a patchy distribution of suitable habitats for amphibian populations where they appear in high number and its abundance decreases smoothly with distance. One possible cause may be near ponds used for reproduction. Ascensão *et*

al. (in prep.) detected that the presence of ponds closer than 200 m from the road was the main factor affecting the presence of amphibian hotspots.

The method of Malo is a simple approach for the identification of hotspots, *i.e.* roadkills agglomerations. We did not differentiate between alive and dead individuals for the identification of hotspots to avoid biasing the species composition that could happen if we had used only dead individuals, due to different carcasses endurance, killing and detection probabilities among species. The hotspots were rigorously defined as sections which have a probability of showing an equal or greater number of individuals lesser than 0.05 under the distribution of Poisson. The same was done by Malo *et al.* (2004) too but so explicitly defined. This technique permitted the identification of 13 hotspots which comprised more than one third of individuals in just 17.3% of the road. The identification of hotspots may be a preliminary step for the delineation of the locations of amphibian underpasses in roads already built.

The G-tests for goodness of fit revealed differences in the frequencies of species in the hotspots and those observed out of hotspots and in the total and these differences are due to a higher frequency of the Iberian midwife toad, the Iberian painted frog and the Mediterranean tree frog and lesser frequencies of the common toad, the waterjack toad and the western spadefoot. The case of Iberian painted frog it's more curious as it is the only species that seems to avoid non hotspots area and appears preferably in hotspots. This situation it's most distressing as the Iberian painted frog presents the highest conservation status among the species occurring in the study area, it's listed in the appendix II of the Berne convention, II and IV Habitats Directive (directive 92/43/EEC) and is Near Threatened in the Portuguese Red Data Book (Cabral *et al.*, 2005). Portuguese road planning authorities should take in account this situation and apply appropriated mitigation measures.

The cluster analysis enabled the distinction of two groups by the pattern of mortality in hotspots. The hotspots of these groups (type 1 and 2 hotspots) are spatially segregated, given they have just one common hotspot in 22 detected conjointly (HS 1/2). The hotspots of the first cluster are mostly located in a block in the sixth kilometre, while the hotspots of the second cluster are centred in the beginning of the road, which corresponds roughly to the two blocks of hotspots observed for all data.

The low sensitivity was caused by the high number of hotspots generated independently for both clusters (22) when compared with the fairly lower number of hotspots for the totals (13). The type-1 hotspots correctly identified two third of the hotspots while type-

2 identified just 54.5%. This was expectable since the first cluster comprised four species which accounted for 69.8% of the data. This technique of separation in groups originated more hotspots particularly of the type 2 because significant fluctuations within this group were hidden by the high mean imposed by the species of the first group. Notwithstanding, these two types of hotspots (HS 1/2) correctly identified all non hotspots and 59.1% of the hotspots.

The tests of independence revealed an association between hotspots and type-1 hotspots, type-2 hotspots and hotspots of type 1 or 2, what in conjunction with the the independence between type-1 hotspots and type-2 hotspots suggests that these are different components of the original hotspots based in totals. This suggestion was emphasised by the inexistence of Spearman correlation for type-1 hotspots and type-2 hotspots ($r_s=0.103$; $P=0.384$), an increase in the number of individuals of one group is not accompanied by the other group.

These groups have an operative character more than reflect the natural agglomeration of species because these populations thrive near the road and so they may exhibit the characteristic deficiencies shown by populations within the road-effect zone as low biological diversity (Forman & Deblinger, 2000). The long term differential mortality may originate new specific compositions which may be stable at long term but different from that expected in the absence of the road. The road despite the low traffic it's very old and has a regular traffic due to regular work-driven movements to and from Évora. Another factor which may be conditioning the formation of these groups is the dispersal capacity. The amphibians have low dispersal abilities due to their physiological constraints, particularly the resistance to desiccation (Weyrauch & Grubb Jr., 2004). This constraint is particularly forcing in the study area (Alentejo, south Portugal), where the Mediterranean climate is much stressing. The species of the first group may be those that are more able to thrive in the xeric conditions found in the area or more vagile (*sensu* Carr & Fahrig, 2004) and as such are more likely to encounter roads in their way. If hotspots are used for the identification of the best locations for amphibian underpasses the agglomeration of species in different hotspots segregated spatially should be considered. As amphibian underpasses are highly effective for most of the amphibian species (Dodd Jr. *et al.*, 2004), the location of these structures should be such that maximizes not only the number of animals, but also the maximum biodiversity possible. Thus, we propose that assemblages of species should be taken in account in the study of amphibian hotspots.

References

- Blaustein A, Wake D (1990) Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trend Ecol Evol* 5: 203-204
- Cabral M, Almeida J, Almeida P, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira M, Palmeirim J, Queiroz A, Rogado L, Santos-Reis M (2005) Livro vermelho dos vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa
- Carr L, Fahrig L (2004) Effect of road traffic on two amphibian species of differing vagility. *Cons Biol* 15: 1071-1078
- Clevenger A, Chruszcz B, Gunson K (2003) Spatial patterns influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biol Cons* 109: 15-26
- Dodd Jr C, Barichivich W, Smith L (2004) Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily travelled highway in Florida. *Biol Cons* 118: 619-631
- Fahrig L, Pedlar J, Pope S, Taylor P, Wegner J (1995) Effect of road traffic on amphibian density. *Biol Cons* 75: 177-182
- Ficetola G, De Bernardi F (2004) Amphibians in a human dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biol Cons* 119: 219-230
- Forman RTT (2000) Estimate of the area affected ecologically by the road system in the United States. *Cons Biol* 14(1): 31-35
- Gibbs JP, Shriver WG (2005) Can road mortality limit populations of pond-breeding amphibians? *Wet Ecol Manag* 13: 281-289
- Grillas P, Gauthier P, Yavercovski N, Perennou C (2004) Mediterranean temporary ponds. Volume 1 – Issues relating to conservation, functioning and management. Station Biologique de la Tour du Valat, Arles.
- Hels T, Buchwald E (2001) The effect of road kills on amphibian populations. *Biol Cons* 99: 331-340
- Houlahan J, Findlay C, Schmidt B, Meyer A, Kuzmin S (2000) Quantitative evidence for global amphibian populations declines. *Nat* 404: 752-755
- Joly P, Morand C, Cohas A (2003) Habitat fragmentation and amphibian conservation: building a tool for assessing landscape matrix connectivity. *Compt Rend Biol* 326: 132-139
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical ecology, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam
- Lesbarrères D, Pagano A, Lodé T (2003) Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. *Compt Rend Biol* 326: S68-S72
- Levine N (2002) CrimeStat 2.0. A spatial statistics program of crime incident locations. The National Institute of Justice, Washington DC
- Malkmus R (2004) Amphibians and reptiles of Portugal, Madeira and the Azores-archipelago. ARG Gantner Verlag KG, Germany
- Malo J, Suarez F, Diez A (2004) Can we mitigate animal-vehicle accidents using predictive models? *J Appl Ecol* 41: 701-710
- McCune B, Mefford M J (1999) PC-ORD Multivariate Analysis of Ecological Data Version 4.3.8 MjM Software, Oregon
- Puky M (2003) Amphibian mitigation measures in Central-Europe. In: Irwin C, Garrett P, McDermott K (eds) Proceedings of the 2003 International Conference on Ecology and Transportation. Center for Transportation and the Environment, Raleigh, pp 413-429
- Rothermel B (2004) Migratory success of juveniles: a potential constraint on connectivity for pond-breeding amphibians. *Ecol Appl* 14(5): 1535-1546

- Sanzo D, Hecnar S (2006) Effects of road de-icing salt (NaCl) on larval wood frogs (*Rana sylvatica*). *Env Poll* 140: 247-256**
- Sokal RR, Rohlf FJ (1998) *Biometry*. WH Freeman and Company, New York**
- Vos C, Chardon J (1998) Effects of habitat fragmentation and road density on the distribution pattern of the moor frog *Rana arvalis*. *J Appl Ecol* 35: 44-56**
- Weyrauch S, Grubb Jr T (2004) Patch and landscape characteristics associated with the distribution of woodland amphibians in an agricultural fragmented landscape: an information-theoretic approach. *Biol Cons* 115: 443-450**

A set of seven sections that would maximize each criterion was selected out of 73 total sections. These sets based on different criteria (selected sets) were compared to random sets and evaluated using the novel Gorelick's modified Shannon diversity index, an information-theoretical approach for the evaluation of diversity amongst patches.

The Gorelick's modified Shannon index (GBI_H , hereafter) was proposed to simultaneously account for species richness and relative abundance over multiple sections (patches, *sensu* Gorelick) combining them into a single scalar number ranging between 0 and 1 (Gorelick, 2006). GBI_H enables the evaluation of the diversity amongst multiple patches, as it examines the relative abundance of each species in each section

(p_{ij}). This index departs from the ratio $\frac{I(i, j)}{H(i)}$, where $I(i, j) = \sum_{i=1}^{m,n} p_{ij} \cdot \log\left(\frac{p_{ij}}{p_i \cdot p_j}\right)$ is the

mutual entropy (mutual information or or transinformation), and

$H(i) = -\sum_{i=1}^m p_i \cdot \log(p_i)$ is the marginal entropy of patches, where $p_i = \sum_{j=1}^m p_{ij}$. The

mutual entropy emerges from the information theory and is a special case of Kullback-

Leibler information (Gorelick, 2006). The ratio $\frac{I(i, j)}{H(i)}$ is inversely proportional to

biodiversity; equivalently the Gorelick's biodiversity index - $GBI_H = 1 - \frac{I(i, j)}{H(i)}$ - is

directly proportional to biodiversity. Let $i|j$ be the conditional probability of i given j , then mutual entropy can also be written as $I(i, j) = H(i) - H(i|j) = H(j) - H(j|i)$, where $H(i|j)$ and $H(j|i)$ are called conditional entropy (Cover and Thomas, 1991). The Gorelick's index was used as diversity index for the evaluation of different selections of seven sections for future upgrading.

Results

A total of 1440 amphibians from all the 12 species present in the studied area were recorded in the 41 sampling sessions. For each species, Table 1 shows the total and average number of amphibians recorded. Specific hotspots were identified with Malo's method for each average number of individuals per section ($n=73$) (Table 1).

Table 1. Total and average number of amphibians recorded. The threshold to be considered a specific hotspot, total number of specific hotspots and percentage on specific hotspots are also shown.

Species ^a	Total	Average (λ)	Threshold	HS _s	% in HS _s
Caudata					
<i>Lissotriton (=Triturus) boscai</i>	19	0.260	1	11	1.000
<i>Pleurodeles waltl</i>	102	1.397	4	14	0.637
<i>Salamandra salamandra</i>	223	3.055	6	16	0.507
<i>Triturus pygmaeus</i>	52	0.712	2	16	0.827
Anura					
<i>Alytes cisternasii</i>	34	0.466	2	10	0.882
<i>Bufo bufo</i>	58	0.795	2	20	0.897
<i>Bufo calamita</i>	278	3.808	7	14	0.486
<i>Discoglossus galganoi</i>	157	2.151	5	12	0.592
<i>Hyla arborea</i>	4	0.055	1	2	1.000
<i>Hyla meridionalis</i>	68	0.932	3	9	0.603
<i>Pelobates cultripes</i>	347	4.753	9	12	0.464
<i>Rana perezi</i>	98	1.342	3	12	0.806

^a Species nomenclature according to Comisión de Taxonomía de la Asociación Herpeológica Española (2005)

Table 2. Values received by selected sections in the criteria used. In bold sections selected accordingly to the respective criterion. N, Total Number of Individuals; SRF, sum of Species Relative Frequency; S, Species Richness; H, Shannon's Diversity Index; E, Equitability Index; HS_s, total Specific Hotspots; HS_{s-w}, sum of Weighted Specific Hotspots.

Section	N	SRF	S	H	E	HS _s	HS _{s-w}
7	33	0.233	8	1.873	0.754	5	0.410
8	39	0.356	7	1.751	0.705	5	0.389
9	24	0.288	8	1.911	0.769	2	0.211
10	34	0.330	9	1.991	0.801	6	0.491
11	37	1.058	11	2.272	0.914	4	0.733
12	45	0.509	11	2.248	0.905	8	0.632
13	25	0.298	9	2.121	0.853	4	0.275
14	34	0.390	9	2.052	0.826	5	0.408
16	27	0.295	10	2.044	0.823	2	0.191
28	27	0.235	7	1.723	0.693	5	0.359
62	36	0.266	8	1.763	0.710	4	0.366
66	36	0.210	8	1.522	0.612	2	0.133
67	25	0.385	7	1.531	0.616	3	0.633
68	51	0.303	6	1.482	0.596	3	0.257
69	45	0.241	6	1.540	0.620	3	0.196
70	20	0.085	3	1.030	0.414	1	0.083
71	26	0.212	7	1.842	0.741	2	0.113

The number of specific hotspots ranged from 2 to 20, which corresponded to the weighted specific hotspots of 0.500 and 0.050, respectively for *Hyla arborea* and *Bufo bufo*. The observed mean was found negatively correlated with the percentage of individuals in hotspots ($r_s = -0.956$; $P < 0.05$) but uncorrelated with the number of specific hotspots ($r_s = 0.421$; $P = 0.165$). For *L. boscai* and *H. arborea* any section with one or more individuals was considered a hotspot. Under the Poisson distribution any section with one individual will be considered a hotspot ($P < 0.05$) if the average (λ) is lower than 0.355. Sets of seven sections (selected sets) were constituted to maximise each of the seven criteria (Table 2). For simplification purposes, only sections that were

selected by any criteria are shown. The sets based on higher diversity and equitability indices have the same seven sections, and two sections (11, 12) are present in all selections.

Table 3. Mean values received by the different sets in the criteria considered and values of mutual entropy (I), marginal entropy of patches (H) and Gorelick's biodiversity index (GBI_H). The criteria are shown in descending order of GBI_H. N, Total Number of Individuals; SRF, sum of Species Relative Frequency; S, Species Richness; H, Shannon's Diversity Index; E, Equitability Index; HS_s, total Specific Hotspots; HS_{s_w}, sum of Weighted Specific Hotspots; RS, random sets.

Criteria	N	SRF	S	H	E	HS _s	HS _{s_w}	I	H	GBI _H
H/E	32.286	0.453	9.571	2.091	0.842	4.429	0.420	0.314	3.358	0.906
HS _s	35.571	0.444	8.857	1.987	0.800	5.429	0.489	0.351	3.244	0.892
S	32.286	0.453	9.571	2.091	0.842	4.429	0.420	0.387	3.331	0.884
HS _{s_w}	35.286	0.466	8.857	1.960	0.789	5.143	0.528	0.392	3.260	0.880
N	41.286	0.421	8.143	1.797	0.723	4.143	0.386	0.432	3.012	0.856
SRF	35.000	0.479	8.714	1.907	0.767	4.714	0.490	0.489	3.292	0.851
RS 4	19.143	0.267	5.571	1.396	0.562	1.714	0.244	0.696	2.838	0.755
RS 2	15.286	0.105	4.286	1.238	0.498	1.429	0.110	0.604	2.374	0.746
RS 10	15.143	0.105	4.429	1.312	0.528	1.429	0.107	0.671	2.404	0.721
RS 6	22.143	0.192	6.143	1.430	0.576	2.286	0.177	0.933	3.128	0.702
RS 7	17.714	0.134	4.857	1.382	0.556	1.714	0.127	0.854	2.742	0.688
RS 8	21.429	0.165	5.429	1.406	0.566	2.000	0.165	0.962	3.006	0.680
RS 9	18.857	0.178	5.000	1.348	0.543	1.571	0.173	1.044	2.813	0.629
RS 1	20.857	0.163	4.571	1.239	0.498	2.000	0.159	1.117	3.004	0.628
RS 5	22.143	0.160	4.714	1.223	0.492	1.714	0.132	1.095	2.932	0.627
RS 3	17.143	0.138	4.571	1.241	0.499	1.571	0.110	1.145	2.631	0.565

Ten random sets of seven sections were also extracted from the main matrix (random sets). Table 3 shows, for all 17 sets, the mean performance in the seven criteria and the Gorelick's diversity index. To test if the use of criteria would provide better sets than random sets we performed a Mann-Whitney test for every criterion between selected and random sets (Table 4).

Table 4. Results of the Mann-Whitney rank sum test between sets based on criteria and random sets for each criterion. N, Total Number of Individuals; SRF, sum of Species Relative Frequency; S, Species Richness; H, Shannon's Diversity Index; E, Equitability Index; HS_s, total Specific Hotspots; HS_{s_w}, sum of Weighted Specific Hotspots.

Test		N	SRF	S	H/E	HS _s	HS _{s_w}	I	H	GBI _H
Mann-Whitney	T	4349.5	4360.0	4401.0	4356.0	4308.0	4289.0	21.0	80.0	81.0
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.002	0.001

Not surprisingly, the results clearly show that selected sets are better than random sets in all of the criteria considered. The performance of the selected sets in the criteria considered is very similar, which was confirmed by the Kruskal-Wallis analysis of variance applied to the seven selected sets (Table 5) for each criterion, which failed to detect differences among selected sets.

Table 5. Results of Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks of selected sets for each criterion. N, Total Number of Individuals; SRF, sum of Species Relative Frequency; S, Species Richness; H, Shannon's Diversity Index; E, Equitability Index; HS_s, total Specific Hotspots; HS_{s_w}, sum of Weighted Specific Hotspots.

Test		N	SRF	S	H / E	HS _s	HS _{s_w}
Kruskal-Wallis	H	8.869	2.08	5.044	5.607	3.818	3.881
	P	0.181	0.912	0.538	0.469	0.701	0.693

Discussion

The inclusion of as much biodiversity as possible should be one of the goals to be taken into account in the selection of locations for structures of amphibian crossing. In general, the installation of these structures do not occur in a contiguous way, so only some patches will be fenced to divert amphibians into culverts or underpasses. Thus, the choice of passages should account for the diversity amongst patches, as Gorelick's index (GBI_H) does in a single scalar number. In the current study, having fewer patches ($m=7$) than species ($n=12$) results in a GBI_H index ranging from 0 to 1. However if there were more patches than species, then the maximum the ratio mutual to marginal entropy could attain would be the logarithm of the ratio of species to patches and therefore GBI_H index could be negative (Gorelick, 2006).

This information-theoretical approach provides several parameters that are useful for the evaluation of the species-patches relationship, such as mutual entropy ($I(i,j)$), marginal entropy of patches ($H(i)$) and conditional entropy ($H(i|j)$ and $H(j|i)$). The mutual entropy (or transinformation) measures the amount of joint entropy between species and patches, the marginal entropy of patches it's analogue of the usual Shannon's

biodiversity index, and the conditional entropy of a given b (a.k.a. equivocation of a about b , $H(a|b)$) is the probability of knowing a if b is known.

Higher GBI_H values do not mean *per se* a better choice, and other criteria should be taken into account (e.g. total number of individuals, species richness or proportion of rarer species). If we had just a few highly specialised species endemic to specific patches we'd prefer lower GBI_H values (Gorelick, 2006). By using the conditional entropy is easily shown that $GBI_H = \frac{H(i|j)}{H(i)}$, so higher GBI_H values denote a stronger

bidirectional transmission of information between patches and species, *i.e.* for each patch we know which species are likely to be present. Symmetrically, lower $H(i|j)$ mean that less information is transmitted between patches and species, and therefore knowing which patch do not tell much about the species we would expect to encounter as they have more similar probabilities of occurrence. The selection of the sets of sections with higher GBI_H intended to maximise the biodiversity present in those sets.

The use of criteria other than the number of amphibians caught per section is absolutely essential. The four most common species in this road (*S. salamandra*, *B. calamita*, *D. galganoi* and *P. cultripes*) were responsible for 69% of amphibians recorded. Therefore, the selection of sections just based on the highest number of individuals would be biased for the distribution of those four species out of 12. The presence of the *D. galganoi* as one of the most abundant species on the road is most problematic since this species has a higher conservation status – Near Threatened – in the Portuguese Red Data Book (Cabral *et al.*, 2005).

The criteria used for the selection - Total Number of Individuals, Species' Relative Frequency, Species Richness, Shannon Diversity Index, Equitability Index, Specific Hotspots and Weighted Specific Hotspots – gathered sections from different locations on the road. The Total Number of Individuals and Species' Relative Frequency enclose more sections from the sixth kilometre (section 62 and subsequent) than the remaining criteria which are composed essentially by sections from a stretch of 900 m in the beginning of the road (sections 7 through 16). These results are in accordance with the observed presence of two clusters of species with roadkills' hotspots spatially segregated. The first cluster has its hotspots centred on the sixth kilometre and comprises the four more abundant species. The second cluster encloses the remaining

species and its hotspots are located in the beginning of the road (Baptista & Sá-Sousa, submitted).

As expected, the different sets considered gathered higher values in the criteria than the random sets. However no differences were found between the selected sets for any criteria, which denounces some homogeneity between sets. The feasibility of using Gorelick's modified Shannon's index for evaluation of patches of a road for upgrading is strengthened by the significant differences encountered between selected and random sets for mutual information ($I(i,j)$), marginal entropy of patches ($H(i)$) and Gorelick's index (GBI_H). The selected sets presented an average GBI_H that were 30% higher than the random sets (0.878 and 0.674, respectively), which together with the better performances of the selected sets in the criteria, emphasize the usefulness of the GBI_H index in evaluating the selection of locales for the maximisation of the overall biodiversity.

In conclusion, we propose that the analysis of Gorelick's index should always be carried out as a measure of the biodiversity amongst sections of a road for future upgrading for mitigation of amphibian mortality.

Aknowledgements

We are gratefully indebted to D. Jacinto, D. Viana, R. Alpizar Jara and S. Correia for their valuable comments on the draft

References

- Baptista, N., Sá-Sousa, P. (submitted): Amphibian roadkills blackspot analysis.
- Cabral, M. (Coord.), Almeida, J., Almeida, P., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M., Palmeirim, J., Queiroz, A., Rogado, L., Santos-Reis, M. (Eds.). (2005): Livro vermelho dos vertebrados de Portugal. Lisboa, Instituto da Conservação da Natureza.
- Clevenger, A., Waltho, N. (2005): Performance indices to identify attributes of highway crossing structures facilitating movement of large mammals.. *Biol. Cons.* 121: 453-464.
- Comisión de Taxonomía de la Asociación Herpetológica Española. (2005): Lista patrón actualizada de la herpetofauna española: Conclusiones de nomenclatura y taxonomía para las especies de anfibios y reptiles de España. Barcelona, AHE.
- Cover, T., Thomas, J. (1991): *Elements of information theory*. New York, Wiley.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos das estradas sobre as populações de anfíbios parecem intensos e não se prevê que possam diminuir num futuro próximo. Enquanto o número de veículos cresce e a rede viária estende-se por novas áreas, a pressão sobre as populações de anfíbios aumenta inexoravelmente. Todo este processo é agravado por não ser acompanhado de estudos que permitam caracterizar os impactos rodoviários sobre as populações afectadas e auxiliar na tomada de medidas que permitam mitigar os efeitos das estradas. Neste enquadramento resolvemos estudar a mortalidade de anfíbios por atropelamento, numa estrada rural, designadamente a composição específica dos pontos negros (*hotspots*) e a possibilidade de usar o índice de diversidade de Gorelick como ferramentas úteis na avaliação dos melhores locais onde colocar passagens inferiores. Em ambos os artigos o propósito último foi que na selecção dos eventuais locais a proteger, estes abarquem simultaneamente o máximo de indivíduos e o máximo de diversidade batracofaunística.

Para o efeito, os pontos negros foram detectados com recurso ao teste de Malo. Este envolve a identificação dos locais com uma abundância superior ao esperado, sob a distribuição de Poisson, para uma determinada média global (λ). Para o cálculo das abundâncias usámos o total de indivíduos vivos e mortos para evitar desvios devido a diferenças inter-específicas nos tempos de retenção ou devido a fenómenos de detectabilidade ou mortalidade diferencial. Tanto as zonas de acumulação de mortos como de vivos indicam o mesmo fenómeno: zonas de atravessamento de anfíbios nas quais estes podem, potencialmente (vivos) ou efectivamente (mortos), ser atropelados.

Os pontos negros foram claramente definidos como secções, de tamanho arbitrário, cuja probabilidade de apresentar um valor igual ou superior do número de indivíduos (ou cadáveres, se for o objecto de estudo) é inferior a 5% sob a distribuição de Poisson, para a média observada (λ , indivíduos/secção). Esta probabilidade pode ser reescrita como:

$$P(x) = 1 - \sum_{x=0}^{x-1} p(x), \text{ sendo } p(x) = \frac{\lambda^x}{(x! e^\lambda)}, \text{ na qual } x \text{ é o número de indivíduos}$$

observados. Esta clarificação é necessária pois não é absolutamente clara no texto original de Malo *et al.* (2004), embora estes tenham seguido a mesma regra.

Outro problema advém do pressuposto, indispensável, de considerar que a taxa mortalidade (mortos/km) segue uma distribuição de Poisson. Este pressuposto é exclusivamente teórico, embora seja crível que esta seja a distribuição esperada pois: a) a distribuição de Poisson é adequada a eventos pouco frequentes; b) trata-se de uma distribuição discreta, e; c) a curva tem a forma esperada teoricamente para a taxa de mortalidade com uma longa cauda à direita. Este pressuposto não foi testado nem por Malo *et al.* (2004) nem no presente artigo. Testes feitos posteriormente revelaram que os dados não seguem uma distribuição de Poisson embora tal se deva, provavelmente, apenas a uma insuficiência de dados pois a curva tem forma da de Poisson mas apresenta lacunas. O teste de Poisson é adequado para eventos raros no entanto quando a média amostral é demasiado baixa ($\lambda < 0,355$) toda e qualquer secção onde ocorra um único evento será considerado um ponto negro pois a sua probabilidade é inferior a 5%. Nestes casos recomenda-se imensa cautela na interpretação dos dados

O C de Geary e a autocorrelação serial de von Neumann indicou a existência de autocorrelação positiva a pequena escala, o que é consistente com o esperado em função das preferências de habitat, distâncias de migração e tamanho de secções usadas. Ascensão *et al.* (*in prep.*) detectaram que a presença de massa de água a menos de 200 m da estrada seria o principal factor responsável pelo surgimento de pontos negros de anfíbios numa estrada próxima (EN370). Assim, dado que as distâncias de migração típicas se situam na ordem das centenas de metros e o tamanho das secções é de 100 m, seria expectável que nas secções mais próximas de habitats adequados para reprodução (origem ou destino de migrações) se encontrassem muitos indivíduos e que este número descesse gradualmente com o afastamento destas.

A análise da composição específica dos pontos negros revelou que existem diferenças significativas na proporção das diferentes espécies nos pontos negros face ao observado globalmente ($G=23,129$; $P<0.005$). O caso do *Discoglossus galganoi* é particularmente interessante, pois a observação desta espécie na estrada coincidiu em maior frequência nos pontos negros detectados e em menor frequência nas áreas que não são pontos negros, como se esta espécie fosse um indicador de áreas de passagem de anfíbios, na estrada estudada. Este problema é agravado pelo facto da rã-de-focinho-pontiagudo apresentar os mais elevados estatutos de conservação de entre as espécies presentes na área de estudo (cf. Malkmus, 2004 e Cabral *et al.*, 2005). De modo oposto, o sapo-comum (*B. bufo*) foi encontrado em menor proporção em pontos negros que o esperado

face à sua frequência global. O sapo-comum frequentemente utiliza para reprodução, ao contrário da maioria das espécies, as massas de água permanentes de grandes dimensões com peixe para reprodução além de que apresenta também distâncias de migrações maiores (ca. 2200 m) face à restante fauna anfíbia (Nöllert e Nöllert, 1992). Estas características únicas poderão contribuir para que esta espécie possa estar a utilizar diferentes rotas de migração face às restantes espécies presentes na área de estudo.

Entretanto, a análise dos pontos negros de agrupamentos (pontos negros de tipo 1 e 2) revelou a existência de diferentes tipologias de pontos negros. Estes tipos de pontos negros podem-se considerar distintos na medida em que são constituídos por diferentes composições de espécies que ocorrem espacialmente segregadas. Esta segregação advém da inexistência de associação entre pontos negros de tipo 1 e 2, os quais são independentes, acompanhada da não independência, associação, face aos pontos negros com baseados na totalidade das espécies. Os pontos negros de tipo 1 e 2 acertaram, respectivamente, na localização de 64,7 e 52,9% dos pontos negros, contudo partilhavam menos de 8% (4 em 26) dos pontos negros detectados independentemente. Dado que as quatro espécies do primeiro grupo (*B. calamita*, *D. galganoi*, *P. cultripes* e *S. salamandra*) representam 69,8% do total de espécies, estas influenciam grandemente a localização dos pontos negros detectados com base nos totais, apesar de se tratar somente de 4 espécies em 12 espécies. Em face destes resultados propomos que, nos estudos prévios à aplicação de medidas mitigadoras da mortalidade, se tenha em consideração não só os pontos negros baseados nos totais, como também a variação espacial da composição específica de forma a se poder proteger o máximo de diversidade batracofaunística possível.

Propomos igualmente, no segundo artigo científico, que o índice de Gorelick (2006) seja utilizado para avaliação das diferentes selecções de pontos negros. O índice Shannon modificado por Gorelick combina as abundâncias e riquezas específicas entre locais num único valor, permitindo, assim, avaliar a diversidade β . Englobar o máximo de diversidade nos vários locais a modificar com vista à mitigação da mortalidade é, naturalmente, um dos critérios a ter em conta na selecção dos locais, pois os anfíbios, com excepção das relas (hilídeos) são globalmente beneficiados pela presença de medidas mitigadoras da mortalidade (Dodd Jr. *et al.*, 2004).

O índice de Gorelick baseia-se no conceito de transmissão bidireccional da informação. Quando há uma elevada transmissão de informação entre locais (*patches*) e espécies

(pouca informação mútua, $H(i,j)$), significa que há muitos endemismos, *i.e.* sabendo o habitat temos uma boa probabilidade de saber quais as espécies presentes e, analogamente, sabendo a espécie prevemos com uma boa probabilidade quais os locais onde estas ocorrem. Nestes casos em cada habitat temos um pequeno leque de espécies que poderiam estar presentes, ou seja, exactamente o que esperaríamos em condições de fraca diversidade entre locais. A entropia condicional, probabilidade de a sabendo b , foi muito bem ilustrada por Gorelick *et al.* (2004) com um exemplo de estenografia. Uma estenógrafa bem treinada usa sempre o mesmo dedo para cada tecla e cada dedo toca em várias teclas, assim, sabendo qual a tecla sabemos qual o dedo ($P=1$), contudo sabendo qual o dedo apenas temos uma certa probabilidade de acertar na tecla ($0 < P < 1$), de entre o pequeno leque de teclas tocadas por aquele dedo.

A análise do índice de Gorelick e dos respectivos parâmetros (entropia mútua, entropia condicional) deverá ser cuidadosa, tendo sempre em mente que a maximização do índice não é uma solução universal. Num cenário de elevados endemismos, extrema associação entre espécies e locais, poderá ser preferível escolher um baixo índice, pelo que se recomenda que a sua interpretação seja cuidadosa e tenha em conta diversos conhecimentos como, por exemplo, a distribuição da espécie e habitats preferidos.

Este índice foi utilizado para avaliar diferentes selecções, baseadas na maximização de sete critérios, de secções para mitigação. No entanto estas selecções revelaram-se indistintas entre si para qualquer dos critérios usados. Estas selecções foram comparadas com outras dez selecções aleatórias com o mesmo número de secções. Esta comparação mostrou claramente que o uso de critérios, quaisquer que estes fossem gerava conjuntos de secções melhores que as aleatórias em quaisquer dos critérios considerados, particularmente nos parâmetros derivados do GBI_H : entropia mútua, entropia condicional.

Com estes dois artigos contribuímos significativamente para o panorama da Ecologia Rodoviária portuguesa, e em particular para o estudo da mortalidade de anfíbios por atropelamento. Até ao momento, os artigos nacionais de ecologia rodoviária conhecidos publicados em revistas internacionais resumem-se a duas: Brito e Álvares (2004) e Petronilho e Dias (2005). Para colmatar este cenário a Unidade de Biologia da Conservação tem-se centrado nesta temática e diversos estudos encontram-se já em fase de submissão sob orientação do Professor Mira (Ascensão, Carvalho, Côrte-Real, Giga e Gomes) e do Professor Sá-Sousa (Baptista, Soares e Valente).

Colocámos sempre o ênfase destes estudos nas medidas mitigadoras da mortalidade que consideramos urgentes não só nas estradas a construir como nas já construídas. Os anfíbios encontram-se extremamente ameaçados globalmente, e Portugal não é excepção. O que é excepcional, pelo menos no panorama europeu, é o desinteresse demonstrado pelas questões ambientais por parte das autoridades responsáveis pela política rodoviária portuguesa. Este desinteresse ficou bem patente no facto de Portugal ter sido multado pelo Tribunal de Justiça Europeu devido ao traçado da A2, que atravessa a Zona de Protecção Especial de Castro Verde, sem que traçados alternativos tivessem sido considerados.

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer antes de mais aos meus pais que me possibilitaram e apoiaram na realização deste mestrado e ao meu orientador, Prof. Paulo Sá-Sousa, pela orientação e apoio à experimentação de novas técnicas. Estou imensamente agradecido a todos os investigadores que disponibilizam os seus artigos gratuitamente no próprio dia, em particular a Puky, Orłowsky e Gorelick. E finalmente um muito especial agradecimento a todos os que ajudaram na recolha dos dados e/ou revisão do presente trabalho: Ana Vanessa Alves, David Jacinto, Duarte Viana, Nuno Soares e Sérgio Correia.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, S. e Waters, N. 2000. The effects of highway fragmentation corridors on wildlife: a case study of Banff National Park. *Transportation Research Part C* 8: 307-320.
- Andrews, K. e Gibbons, J. 2005. How do highway influence snake movement? Behavioural responses to roads and vehicles. *Copeia* 4: 772-782.
- Aresco, M.J. 2003. Highway mortality of turtles and other herpetofauna at Lake Jackson, Florida, USA, and the efficacy of a temporary fence/culvert system to reduce roadkills. Pp 433-448 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). *Proceedings of the 2003 International Conference on Ecology and Transportation*. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Ascensão, F., Baptista, N., Sá-Sousa, P. e Mira, A. In prep. Partitioning the effects of environmental, road and spatial components in road-crossing patterns: a case study with amphibians.
- Austin, J. e Garland, L. 2001. Evaluation of wildlife underpass on Vermont State Highway 289 in Essex, Vermont. Pp. 616-624 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). *Proceedings of the 2001 International Conference on Ecology and Transportation*. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Bana e Costa, C., De Corte, A. e Vansnick, J.-C. 2003. Macbeth. London School of Economics. Working Paper 03.56. 40 pp.
- Barros Ferraz, S., Vettorazzi, C., Theobald, D. e Ballester, M. 2005. Landscape dynamics of Amazonian deforestation between 1984 and 2002 in central Rondônia, Brazil: assessment and future scenarios. *Forest Ecology and Management* 204: 67-83.
- Blaustein, A. e Wake, D. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution* 5: 203-204.
- Boarman, W., Sazaki, M. e Jennings, W. 1997. The effect f roads, barrier fences and culverts on desert tortoise populations in California, USA. Pp. 54-58 *in* van Abbema, J. (ed.). *Proceedings: Conservation, Retoration and Management of Tortoises and Turtles – An International Conference*. State University of New York, New York Turtle and Tortoise Society.
- Brito, J.C. e Álvares, F. 2004. Patterns of road mortality in *Vipera latastei* and *V. seoanei* from northern Portugal. *Amphibia-Reptilia* 25: 459-465.
- Brock, R. e Kelt, D. 2004. Influence of roads on the endangered Stephen's Kangaroo rat (*Dipodomys stephensis*): are dirt and gravel roads different? *Biological Conservation* 118: 633-640.
- Brotos, L. e Herrando, S. 2001. Reduced bird occurrence in pine forest fragments associated with road proximity in a Mediterranean agricultural area. *Landscape and Urban Planning* 57: 77-89.
- Cabral, M. (Coord.), Almeida, J., Almeida, P., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M., Palmeirim, J., Queiroz, A., Rogado, L. e Santos-Reis, M. (Eds.). 2005. *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal*. Instituto da Conservação da Natureza. Lisboa. 660 pp.
- Cain, A., Tuovila, V., Hewitt, D. e Tewes, M. 2003. Effects of a highway and mitigation projects on bobcats in Southern Texas. *Biological Conservation* 114: 189-197.
- Carr, L. e Fahrig, L. 2001. Effect of road traffic on two amphibian species of differing vagility. *Conservation Biology* 15: 1071-1078.
- Clevenger, A. e Waltho, N. 2000. Factors influencing the effectiveness of wildlife underpasses in Banff National Park, Alberta, Canada. *Conservation Biology* 14(1): 47-56.
- Clevenger, A. e Waltho, N. 2005. Performance indices to identify attributes of highway crossing structures facilitating movement of large mammals.. *Biological Conservation* 121: 453-464.
- Clevenger, A., Chruszcz, B. e Gunson, K. 2003. Spatial patterns influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biological Conservation* 109: 15-26.

- Collinge S., Johnson W., Ray, C., Matchett, R., Grensten, J., Cully Jr., J., Gage, K., Kosoy, M., Loye, J. e Martin, P. 2005. Landscape structure and plague occurrence in black-tailed prairie dogs on grasslands of the western USA. *Landscape Ecology* 20: 941-955.
- Collinge, S.K. 1996. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. *Landscape and Urban Planning* 36: 59-77.
- Conrey, R. e Mills, L. 2001. Do highway fragment small mammal populations? Pp. 448-457 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). *Proceedings of the 2001 International Conference on Ecology and Transportation*. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Debinski, D.M. e Holt, R.D. 2000. A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conservation Biology* 14: 342-355.
- Debinski, D.M. e Holt, R.T. 2000. A survey and overview of habitat fragmentation experiments (review). *Conservation Biology* 14(2): 342-355.
- Dodd Jr., C., Barichivich, W. e Smith, L. 2004. Effectiveness of a barrier wall and culverts in reducing wildlife mortality on a heavily traveled highway in Florida. *Biological Conservation* 118: 619-631.
- Erritzoe, J., Mazgajski, T. e Rejt, Ł. 2003. Bird casualties on European roads – a review. *Acta Ornithologica* 38(2): 77-93.
- Fahrig, L., Pedlar, J., Pope, S., Taylor, P. e Wegner, J. 1995. Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* 75: 177-182.
- Ficetola, G. e De Bernardi, F. 2004. Amphibians in a human-dominated landscape: the community structure is related to habitat features and isolation. *Biological Conservation* 119: 219-230.
- Forman, R.T.T. e Alexander, L.E. 1998. Roads and their major ecological effects. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 29: 207-31.
- Gartshore, R.G. e Rook, R.I. 2006. Bayview Avenue extension, Richmond Hill, Ontario, Canada habitat creation and wildlife crossings in a contentious environmental setting: a case study (September 2005). Pp 55-76 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). *Proceedings of the 2005 International Conference on Ecology and Transportation*. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Gibbs, J.P. e Shriver, W.G. 2002. Estimating the effects of road mortality on turtle populations. *Conservation Biology* 16(6): 1647-1652.
- Gibbs, J.P. e Shriver, W.G. 2005. Can road mortality limit populations of pond-breeding amphibians? *Wetlands Ecology and Management* 13: 281-289.
- Gorelick, R. 2006. Combining richness and abundance into a single diversity index using matrix analogues of Shannon's and Simpson's indices. *Ecography* 29: 525-530.
- Gorelick, R., Bertram, S.M., Killeen, P.R. e Fewell, J.H. 2004. Normalized mutual entropy in biology: quantifying division of labor. *The American Naturalist* 164(5): 667-682.
- Hels, T. e Buchwald, E. 2001. The effect of road kills on amphibian populations. *Biological Conservation* 99: 331-340.
- Jackson, S. 1996. Underpass systems for amphibians. Presentation at the Transportation Related Wildlife Mortality Seminar, April 30- May 2, 1996, Orlando, Florida.
- Jackson, S.D. 2000. Overview of transportation impacts on wildlife movement and populations. Pp 7-20 *In* Messmer, T.A. e West, B. (eds.). *Wildlife and highway: seeking solutions to an ecological and socio-economic dilemma*. The Wildlife Society.
- Lesbarrères, D., Pagano, A. e Lodé, T. 2003. Inbreeding and road effect zone in a Ranidae: the case of Agile frog, *Rana dalmatina* Bonaparte, 1840. *Comptes Rendus Biologies* 326, S68-S72.
- Little, S., Harcourt, R. e Clevenger, P. 2002. Do wildlife passages act as prey traps? *Biological Conservation* 107: 135-145.
- Malkmus, R. 2004. Amphibians and reptiles of Portugal, Madeira and the Azores-archipelago. A.R.G. Gantner Verlag K.G., Alemanha. 447 pp.

- Mazerolle, M., Huot, M. e Gravel, M. 2005. Behaviour of amphibians on the road in response to car traffic. *Herpetologica* 61(4): 380-388.
- Nelson, D.A., Papin, M.E. e Baker, T. 2006. Quick fixes: working together to address herptile road mortality in New York state. Pp 90-93 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). Proceedings of the 2005 International Conference on Ecology and Transportation. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Nöllert, A. e Nöllert, C. 1992. Los anfibios de Europa: identificación, amenazas, protección. Omega, Barcelona. 399 pp
- Petronilho, J. e Dias, C. 2005. Impact of two forest road upon wildlife after a road pavement change in a coastal area in the center of Portugal. *Wildlife Biology in Practice* 1(2): 128-139.
- Puky, M. 2000. A comprehensive three-year herpetological survey in the Gemenc Region of the Duna-Dráva National Park, Hungary. *Opuscula Zoologica Budapest* XXXII: 113-128.
- Puky, M. 2003. Amphibian mitigation measures in Central Europe. Pp. 413-428 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). Proceedings of the 2003 International Conference on Ecology and Transportation. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Puky, M. 2006. Amphibian road kills: a global perspective. Pp 325-338 *In* Irwin, C., Garrett, P. and McDermott, K (eds.). Proceedings of the 2005 International Conference on Ecology and Transportation. Raleigh, NC: Center for Transportation and the Environment, North Carolina State University.
- Puky, M. e Vogel, Z. 2003. Amphibian mitigation measures on Hungarian roads: design efficiency, problems and possible improvement, need for co-ordinated European environmental education strategy. Habitat fragmentation due to transportation infrastructure – IENE 2003. 13 pp.
- Reijnen, R., Foppen, R., Ter Braak, C. e Thissen, J. 1995. The effects of car traffic on breeding bird populations in woodland. III. Reduction of density in relation to the proximity of main roads. *Journal of Applied Ecology* 32: 187-202.
- Riley, S. P., Sauvajot, R. M., Fuller, T. K., York, E. C. Kamradt, D. A., Bromley, C. e Wayne, R. K. 2003. Effects of urbanization and habitat fragmentation on bobcats and coyotes in southern California. *Conservation Biology* 17(2): 566-576.
- Rudolph, D.C., Burgdorf, S., Conner, R.N. e Schaefer, R.. 1999. Preliminary evaluation of the impact of roads and associated vehicular traffic on snake populations in eastern Texas. Pp. 129-136 *In* Evink, G.L., Garrett, P. e Zeigler, D. (eds.) Proceedings of the Third International Conference on Wildlife Ecology and Transportation. FL-ER-73-99. Florida Department of Transportation, Tallahassee, Florida.
- Seiler, A. 2003. Effects of infrastructure on nature. Pp 31-50 *In* Trocmé, M., Cahill, S., de Vries, H. J., Farral, H., Folkson, L., Fry, G., Hicks, C. e Peymen, J. (eds). Habitat fragmentation due to transportation infrastructure. The European review Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.
- St. Clair, C.C. 2003. Comparative permeability of roads, rivers, and meadows to songbirds in Banff National Park. *Conservation Biology* 17(4): 1151-1160.
- Trombulak, S.C. e Frissel, C.A. 2000. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. *Conservation Biology* 14(1): 18-30.
- van Bohemen, H.D. 1998. Habitat fragmentation, infrastucture and ecological engineering. *Ecological Engineering* 11: 199-207.