PADRÃO DE COLORAÇÃO E CARACTERES MORFOLÓGICOS EXTERNOS DA FAMÍLIA DENDROBATIDAE (POISON FROGS) COMO FERRAMENTA DE INFERÊNCIA FILOGENÉTICA

COLOR PATTERN AND EXTERNAL MORPHOLOGY CHARACTERS OF THE DENDROBATIDAE FAMILY (POISON FROGS) AS A TOOL TO PHYLOGENETIC INFERENCE

SILVA, Lucas Gonçalves¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Departamento de Biodiversidade e Ecologia
Av. Ipiranga, 6681, Campus Central da PUCRS, Prédio 12C, Sala 173
e-mail: lucas.silva@pucrs.br

Received 20 July 2010; received in revised form 13 September 2010; accepted 06 October 2010.

RESUMO

Os “poison frogs” (família Dendrobatidae) formam um grupo de espécies com extensa distribuição nos ecossistemas da Terra. Através do levantamento de caracteres morfológicos e do padrão de coloração das mais conhecidas espécies de Dendrobatidae e de rotinas filogenéticas de *softwares* especializados em sistemática, foi inferida uma filogenia para o grupo, tendo como objetivo esclarecer relações filogenéticas ainda desconhecidas. Algumas relações filogenéticas são novas comparadas com trabalhos já publicados como de Summers & Clough (2001) e Grant *et al.* (2006), que utilizaram bases moleculares, mas outras são corroboradas pelo presente estudo. O cladograma de consenso obtido é sustentado por altos valores de suporte *Bootstrap* em quase todos os ramos. Com altos índices de consistência e retenção da árvore de consenso (0,68 e 0,62, respectivamente), a metodologia consolida o potencial da morfologia externa das espécies como ferramenta de inferência filogenética.

Palavras-chave: *Dendrobatidae*, *filogenia*, *morfologia*, *conservação*.

ABSTRACT

The “poison frogs” (Dendrobatidae family) are a group of species widely distributed on Earth’s ecosystems. Through the analysis of morphological characters and color pattern of the best known species of Dendrobatidae and specialized software routines of phylogenetic systematics, it was inferred a phylogeny for that group aiming to find unknown phylogenetic relations. Some phylogenetic relationships are new compared with published studies as Summers & Clough (2001) and Grant *et al.* (2006), who used molecular basis, but others are now supported by this study. The consensus cladogram is supported by high bootstrap support values in almost all the branches. With high consistency and retention of the consensus tree (0.68 and 0.62, respectively), the methodology reinforces the potential of the species external morphology as a tool for phylogenetic inference.

Keywords: *Dendrobatidae*, *phylogeny*, *morphology*, *conservation*.

Introdução

A família Dendrobatidae, composta pelos chamados “poison frogs”, é um grupo de anuros terrestres que possuem uma extensa gama de coloração e toxicidade (Summers & Clough, 2001). Estes anuros estão presentes principalmente em regiões tropicais, com maior representação nas Américas, África e Ásia (Meegaskumbura *et al.*, 2002) e tendem a adquirir características e padrões morfológicos por conta desses isolamentos geográficos (Baum *et al.*, 2005). Estão seriamente ameaçados de extinção principalmente pela perda de habitats, sobre-exploração e fatores enigmáticos, como doenças e perda de relações ecológicas importantes (Stuart *et al.* 2004).

A família possui cerca de 260 espécies no total, considerando-se algumas sub-espécies dentro desse número e, por conta disso, sua filogenia não é totalmente conhecida (Grant *et al.*, 2006). Já foram publicados trabalhos com relações filogenéticas da família Dendrobatidae. Grant *et al.* (2006) e Summers & Clough (2001) publicaram artigos no qual trazem filogenias a partir de bases moleculares e análise da toxicidade dos representantes do grupo taxonômico, mas trabalhos com filogenias levando em consideração padrões de coloração e morfologia externa do corpo ainda não foram publicados por pesquisadores.

O objetivo do presente trabalho é definir caracteres morfológicos e do padrão de coloração das espécies como ferramentas filogenéticas do grupo e inferir uma filogenia das principais espécies da família Dendrobatidae, comparando com trabalhos já publicados. A importância se dá pelo fato desse grupo estar seriamente ameaçado em diversos ecossistemas do mundo (Becker *et al.*, 2007).

Material e Métodos

Para inferir a filogenia dos Dendrobatidae foram utilizadas as mesmas espécies que compõem a filogenia proposta por Summers & Clough (2001) e por eles analisadas a partir da composição das toxinas presentes nas espécies. As informações referentes à morfologia e padrão de coloração do grupo de interesse estão disponíveis nos portais *Amphibia Web* (www.amphibiaweb.org) e *All About Frogs* (www.allaboutfrogs.org).

O “*ingroup*” foi definido a partir do

trabalho de Summers & Clough (2001), apresentando 21 espécies (terminais) de 5 gêneros diferentes (*Allobates*, *Colostethus*, *Minyobates*, *Dendrobates* e *Phylllobates*). O “*outgroup*” foi definido a partir do trabalho de Grant *et al.* (2006) e identificado como o clado composto pelas famílias Bufonidae e Hylodinae, grupo-irmão dos Dendrobatidae na filogenia proposta pelos autores. Foram utilizados 5 gêneros diferentes (7 espécies no total) das duas famílias citadas anteriormente para polarização dos caracteres levantados no “*ingroup*” (Figura 1). As relações filogenéticas do “*outgroup*” foram modeladas durante o processo de construção da filogenia, porém foram omitidas no cladograma final de consenso para melhor visualização das relações entre os terminais no “*ingroup*”.

Foram definidos 20 caracteres para análise, tanto de morfologia externa dos exemplares, quanto do padrão de coloração do corpo. A polarização dos caracteres foi feita assumindo-se a característica mais frequente no grupo externo como mais primitiva. Foram definidos como caracteres e seus respectivos estados: **(A)** Cor do olho: (0) preto e (1) azul; **(B)** Comprimento do dedo médio posterior em relação aos demais dedos: (0) longo, (1) médio e (2) curto; **(C)** Número de cores do corpo: (0) duas cores, (1) uma cor e (2) mais de duas cores; **(D)** Faixa colorida lateral antero-posterior acima do olho: (0) ausente e (1) presente; **(E)** Padrão de coloração do corpo: (0) manchado, (1) cores uniformes dispostas em linhas e (2) coloração única sem linhas nem manchas; **(F)** Padrão de coloração do ventre: (0) uma cor e (1) manchado; **(G)** Tamanho das manchas no dorso: (0) presentes-pequenas, (1) presentes-grandes e (2) ausentes; **(H)** Formato do nariz: (0) arredondado e (1) bicudo; **(I)** Tamanho dos olhos em relação ao tamanho da cabeça: (0) médios, (1) pequenos e (2) grandes; **(J)** Coloração predominante nas pernas anteriores: (0) uma cor e (1) duas cores; **(L)** Forma do dorso na posição antero-posterior: (0) reto e (1) curvado; **(M)** Textura do dorso: (0) liso, (1) pouco rugoso e (2) muito rugoso; **(N)** Tamanho da coxa em relação ao tamanho da perna posterior: (0) fina e (1) grossa; **(O)** Glândula atrás do olho na posição dorsal: (0) presente e (1) ausente; **(P)** Tamanho da ponta adesiva do dedo em relação ao tamanho do dedo: (0) presente-pequena, (1) presente-grande e (2) ausente; **(Q)** Linha lateral antero-posterior colorida abaixo do olho: (0) ausente, (1)

presente-contínua e (2) presente-não-contínua; **(R)** Padrão de coloração das pernas posteriores: (0) padrão semelhante ao dorso, (1) padrão semelhante ao ventre e (2) padrão diferente do dorso e do ventre; **(S)** Mimetismo: (0) padrão escuro e (1) cor chamativa; **(T)** Anel colorido acima da narina: (0) presente e (1) ausente. A partir dos caracteres e respectivos estados presentes nas espécies foi gerada uma matriz descritiva que serviu de base para a construção de uma matriz numérica utilizando-se do *software* Mesquite 2.01 (Maddison & Maddison, 2009). A matriz numérica foi gerada com os caracteres A-T anteriormente descritos. Os mesmos foram numerados de 1 a 20 na matriz numérica (Figura 2).

A matriz gerada no *software* Mesquite 2.01 (Figura 2) foi exportada para o *software* WinClada 1.00.08 (Cladistics, 2009). Para as análises filogenéticas, foi utilizado o *software* NONA 2.0 (Goloboff, 2005), inserido dentro do Winclada. A matriz foi analisada preliminarmente pelo método clássico de parcimônia e análise heurística (tentativa e erro), utilizando-se múltiplo TBR+TBR (*Tree Bisection Reconnection*), o qual recorta sub-árvores e insere em pontos aleatórios da filogenia. Para esse método foram utilizadas 100.000 replicações, mantendo 1000 árvores (*hold*). Após, foi utilizado o método Ratchet para analisar a mesma matriz, mantendo-se as árvores encontradas na análise heurística, mas, com esse método, perturbando-se os caracteres e realizando um rearranjo das árvores encontradas e atribuindo peso aos caracteres (Nixon, 1999). Para Ratchet foram utilizadas 1000 iterações, 500 árvores foram retidas e 5 caracteres presentes na matriz foram perturbados durante o processo de análise (25%).

Para obtenção de valores de suporte foi utilizada a metodologia de Bootstrap (Seo, 2008), onde uma re-amostragem randômica de caracteres gera uma estatística de frequência, que atribui valores de confiabilidade aos ramos da filogenia conforme a frequência com que o ramo ocorre nas árvores obtidas. A função Bootstrap está incluída dentro do *software* WinClada e, para o processo, foram utilizadas 500 replicações, 500 iterações, com 50 árvores iniciais e análise por TBR. Após todas as análises filogenéticas, foi gerada uma árvore de consenso.

Resultados e Discussão

Para a análise heurística foram obtidas 7 árvores com 66 passos cada. Na metodologia Ratchet foram obtidas 25 árvores com os mesmos 66 passos. Foi gerada uma árvore de consenso com índice de consistência 0,68 e índice de retenção de 0,62 (Figura 3).

Comparando os dados obtidos no presente estudo através da análise filogenética embasada em caracteres morfológicos e padrão de coloração das espécies com o trabalho de Summers & Clough (2001), que utilizou análises moleculares, existem algumas diferenças. As espécies *Colostethus marchesianus* e *Colostethus talamancae* tinham uma relação filogenética desconhecida. Agora *C. marchesianus* está mais basal na filogenia obtida, com padrão de coloração bastante semelhante com elementos do “*outgroup*”. *Epipedobates tricolor* e *Epipedobates trivittatus* formam um grupo-irmão com 57% de suporte de Bootstrap, grupo esse que não aparece na filogenia de Summers & Clough (2001), onde *E. tricolor* se relacionava mais proximamente com *Epipedobates anthonyi*. O gênero *Minyobates* está mais relacionado com o gênero *Epipedobates* do que *Dendrobates*. A espécie *Phyllobates bicolor* apresenta relação direta de ancestralidade com *Dendrobates speciosus* e, apesar de estarem classificadas em diferentes gêneros, possuem um padrão de coloração do corpo muito semelhante, o que pode ter interferido diretamente na análise dessas duas espécies (caracter E, 100% de suporte Bootstrap). As relações entre as espécies *Dendrobates pumilio*, *Dendrobates granuliferus* e *Dendrobates histrionicus* mantêm-se, formando este um grupo monofilético em ambas filogenias. O grupo formado pelas espécies *Phyllobates vittatus* e *Phyllobates lugubris* é corroborado, inferindo relação filogenética próxima dessas duas espécies.

Na filogenia obtida, a relação entre as espécies *Allobates femoralis*, *E. anthonyi* e *Epipedobates boulengeri* não se mostrou bem resolvida, assim como *Epipedobates bilinguis* e *Minyobates minutus*, pois apresenta politomia nos ramos. Da mesma forma, dentro do clado formado quase que exclusivamente por espécies do gênero *Dendrobates*, a relação entre *Dendrobates ventrimaculatus* e *Dendrobates tinctorius* não foi resolvida pelo mesmo motivo.

O presente estudo evidencia o potencial dos caracteres morfológicos e o padrão de

coloração das espécies de anuros como ferramenta filogenética, complementando lacunas das filogenias moleculares publicadas. Porém, vale ressaltar, essas filogenias moleculares são muito bem embasadas e consolidadas, e o presente trabalho mostra uma nova ferramenta potencial de inferência. Esse potencial ajuda na compreensão de relações filogenéticas dos grupos e essas relações são extremamente importantes para a conservação das espécies em questão, já que diversos trabalhos como Stuart *et al.* (2004), Becker *et al.* (2007), Meegaskumbura *et al.* (2002), Mendelson *et al.* (2006) e Silvano & Segalla (2005) trazem como principal tema o declínio no número de espécies de anfíbios no mundo, bem como a depleção de populações. A ameaça à conservação das espécies se dá por conta da fragmentação e descaracterização de habitats, sobre-exploração e perda de relações ecológicas naturais das espécies (Mittermeier *et al.*, 2003). Mendelson *et al.* (2006) sugerem a criação de políticas voltadas para conservação, bem como ações de pesquisa com relação às espécies de anfíbios, sejam elas de ecologia ou sistemática.

Referências

1. BAUM, D. A., SMITH, S., DONOVAN, S. S. 2005. **The Tree-Thinking Challenge**. Science 310, 979-980.
2. BECKER, C. G., FONSECA, C. R., HADDAD, C. F., BATISTA, R. F., PRADO, P. I. 2007. **Habitat Split and the Global Decline of Amphibians**. Science 318, 1775-1777.
3. GRANT, T., FROST, D. R., CALDWELL, J. P., GAGLIARDO, R., HADDAD, C. F., KOK, P. J., MEANS, D. B., NOONAN, B. P., SCHARGEL, W. E., WHEELER, A. W. 2006. **Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae)**. American Museum of Natural History 299, 7-262.
4. MEEGASKUMBURA, M., BOSSUYT, F., PETHYAGODA, R., MANAMENDRA-ARACHCHI, K., BAHIR, M., MILINKOVITCH, M. C., SCHNEIDER, C. J. 2002. **Sri Lanka: An Amphibian Hot Spot**. Science 298, 379.
5. MENDELSON, J. R., *et al.* 2006. **Confronting Amphibian Declines and Extinctions**. Science 313, 48.
6. MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., BROOKS, T. M., PILGRIM, J. D., KONSTANT, W. R., FONSECA, G. A. B. 2003. **Wilderness and biodiversity conservation**. PNAS 100:18, 10309-10313.
7. NIXON, K. C. 1999. **The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis**. Cladistics 15, 407-414.
8. SEO, T. K. 2008. **Calculating Bootstrap Probabilities of Phylogeny Using Multilocus Sequence Data**. MBE 14, 2-37.
9. SILVANO, D. L., SEGALLA, M. V. 2005. **Conservação de Anfíbios no Brasil**. Megadiversidade 01, 79-86.
10. STUART, S. N., CHANSON, J. S., COX, N. A., YOUNG B. E., RODRIGUES, A. S., FISCHMAN, D. L., WALLER, R. W. 2004. **Status and Trends of Amphibian Declines Worldwide**. Science 306, 1783-1785.
11. SUMMERS, K., CLOUGH, M. E. 2001. **The Evolution of Coloration and Toxicity in the Poison Frog Family (Dendrobatidae)**. PNAS 98:11, 6227-6232.

Figura 1 – O “ingroup” (branco) e o “outgroup” (vermelho) utilizados para a inferência filogenética.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Taxon \ Character																					
1	<i>C. marchesianus</i>	0	0	2	1	1	1	2	1	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	1	1
2	<i>C. talamancæ</i>	0	1	2	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	1	0	0	2	2	1	1
3	<i>A. femoralis</i>	0	0	2	1	1	1	2	0	2	1	0	2	1	1	0	1	1	0	1	1
4	<i>E. tricolor</i>	0	0	2	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
5	<i>E. anthonyi</i>	0	0	2	1	1	1	2	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
6	<i>E. boulengeri</i>	0	0	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
7	<i>E. bilinguis</i>	0	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	2	1	0	1
8	<i>E. hanheli</i>	0	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2	1	1
9	<i>E. trivittatus</i>	0	0	2	1	1	1	2	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
10	<i>M. minutus</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2	2	0	1
11	<i>D. ventrimaculatus</i>	0	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	2	0	1
12	<i>D. tinctorius</i>	0	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
13	<i>D. leucomelas</i>	0	1	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
14	<i>D. auratus</i>	0	1	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
15	<i>D. granuliferus</i>	0	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
16	<i>D. speciosus</i>	0	1	1	0	2	1	2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
17	<i>D. pumilio</i>	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
18	<i>D. histrionicus</i>	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
19	<i>P. vittatus</i>	1	1	2	1	1	0	2	0	2	1	1	0	0	1	0	1	2	1	0	1
20	<i>P. lugubris</i>	0	1	2	1	1	0	2	0	2	1	1	1	0	1	2	1	2	2	0	1
21	<i>P. bicolor</i>	0	1	1	0	2	1	2	0	2	1	1	0	1	1	2	0	0	1	0	0

Figura 2 - Matriz numérica (codificada) gerada a partir dos caracteres e respectivos estados.

Figura 3 - Filogenia da família Dendrobatidae obtida nas análises (consenso). Os valores sobre os ramos indicam o suporte de Bootstrap, ilustrando a freqüência da ocorrência do ramo no conjunto de dados analisados durante a construção da filogenia.