UPPSALA
UNIVERSITET

# Giftighet hos pilgiftsgrodor (Dendrobatidae)

Joakim Wester

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Sammandrag

Pilgiftsgrodor inom familjen Dendrobatidae är ofta giftiga och verkar ha utvecklat denna möjlighet flera gånger. Gifterna de innehåller är alkaloida, något som är väldigt ovanligt. De giftiga arterna är kraftfullt varningsfärgade och lever i tropikerna men är populära husdjur. De antogs länge producera sina gifter själva men de senaste 20 åren har man upptäckt att deras diet ligger till grund för gifterna. Dendrobatidae är en monofyletisk familj med 13 släkten. Många av dessa innehåller giftiga arter men endast ett släkte är helt ofarliga och kryptiskt färgade. De giftigaste arterna är ofta mer välstuderade. Man kan konstatera att det utvecklats ett upptagningssystem vilket innebär att alkaloiderna tas upp från dieten och inte produceras av grodorna själva. Upptagningssystemets processer är relativt okända men man kan nå slutsatsen att det bör ske genom mag-tarmslemhinnan. Utsöndringen sker genom granulära körtlar på grodornas rygg. Dessa innehåller ett sekretoriskt syncytium kopplat till öppningar i huden. Alkaloiderna ansamlas i vesiklar i syncytiet, dessa bildar sedan större korn som kan lagras långa tider i körtlarna. När de lagras i vesiklarna verkar de vara kopplade till sura ämnen, troligtvis för att de inte ska brytas ned under tiden de lagras. Bland alkaloiderna de innehåller ingår några av de giftigaste ämnena i naturen och över 22 grupper av toxiner har klassificerats. De varierar i giftighet men de allra flesta grodor innehåller en cocktail av flera grupper. Det enda toxinet som verkar vara unikt för ett släkte är batrachotoxinerna som endast finns hos *Phyllobates*. Studier har genomförts för att försöka förklara ursprunget till dessa alkaloider. Först fokuserades studierna på myror då man kunnat se en klar specialisering på myrdiet hos bland annat *Oophaga pumilio*. Dessa studier fann att myror kunde förklara en viss del av innehållet av alkaloider hos grodorna men att det fortfarande saknades många källor. Senare studier har inriktat sig på hornkvalster (*Oribatida*) och man har kunnat förklara en större del med dessa, men både myrorna och kvalstren innehåller alkaloider som är unika för deras organismgrupper. En liten del av alkaloiderna har också kunnat förklaras av dubbelfotingar ur släktet *Rhinotus*. Upptagningssystemet verkar ha utvecklats hos en icke-toxisk anfader till hela familjen då möjligheten att bli giftig har utvecklats flera gånger samt att det finns en koppling mellan dietspecialisering och giftighet. Man har dessutom funnit att alkaloidinnehåll hos grodorna varierar kraftigt mellan olika lokaler och tid på året. Slutsatsen man kan dra kring födokällorna till alkaloiderna är få och komplicerade. Studier på *O. pumilio* tyder på att det är en komplex näringsväv med många typer av föda på olika tidpunkter av året på olika lokaler som ger upphov till en individs unika alkaloidprofil. Processerna som styr upptagningen av alkaloiderna är okänd men min hypotes är att det finns en kombination av generella och specialiserade transportproteiner i dessa grodors enterocyter. Detta för att grodor med möjlighet att bli giftiga genom dieten som ges samma föda inte alltid utvecklar samma alkaloidprofil. Detta upptagningssystem är troligen ett resultat av födospecialisering och utveckling av immunitet mot gifterna de innehåller.

## Inledning

Det som gör pilgiftsgrodorna speciella är att en stor del av de ingående arterna är giftiga till varierande grad och att detta inte verkar begränsat till något enskilt släkte (Daly et al. 2002, 2005). Förutom detta har man funnit att möjligheten att bli giftig har utvecklats flera gånger i familjen (Darst et al. 2005) och att de olika arterna kan använda sig av olika typer av gifter (Daly et al. 2002, 2005). Många av arterna använder sig av varningsfärger och de är ofta väldigt lätta att känna igen som giftiga (Summers & Clough 2001). Deras utseende gör att de är populära som husdjur och då de inte får den giftiga diet som de har i tropikerna är de helt harmlösa. Det finns dock exempel på vissa arter som kan fortsätta vara giftiga i upp till sex år

efter att dieten upphört (Daly et al. 1994b).

Daly et al (1994) fann att dessa gifter är exogena, alltså att grodorna inte själva skapar det utan får det ifrån någon annan källa. Denna källa bestämdes senare vara ifrån födan och man kunde konstatera att ett sådant system fanns. Källorna till gifterna var fortfarande oklara likaså hur processen såg ut för att ta upp gifterna i kroppen (Daly et al. 1994a, 1994b). Det verkar också som att Dendrobatidae inte är ensamma om att ha ett sådant system. Det har kunnat visas även hos *Mantella*, ett släkte av grodor på Madagaskar (Clark et al. 2005).

Gifterna som uttrycks hos grodor och paddor har, oavsett om de är födobaserade eller självproducerade, visats ha medicinala effekter. Man har föreslagit att dessa kan användas som antibiotika, smärtstillande medel, antivirala medel (till exempel mot HIV) och som hjärtmedicin (Calkosiński et al. 2015, Macfoy et al. 2005).

Syftet med denna översiktsartikel är att försöka klargöra vilka källor grodorna i familjen Dendrobatidae har till sina gifter, hur upptagningssystemet ser ut, hur det har utvecklats och varför det är överrepresenterat i familjen.

## Fylogeni

Pilgiftsgrodorna (Dendrobatidae) är en familj av amfibier vars fylogeni ständigt är under diskussion. År 2006 genomfördes en omfattande förändring som delade upp den tidigare familjen i två delar: Dendrobatidae och Aromobatidae. Denna studie samlade familjen i elva släkten med 154 arter (Grant et al. 2006). Redan några år senare skapades ett nytt släkte inom familjen med en ny art (Twomey & Brown 2008) och några år efter det fördelades arterna så att ännu ett nytt släkte uppkom (Brown 2011). Denna fördelning är den som används idag med 13 släkten. Antalet arter däremot förändras ofta med upptäcker av nya arter och sådana som tidigare ansågs vara utdöda (Batista et al. 2014, Perez-Pena et al. 2010).

De släkten som innehåller giftiga arter är främst *Phyllobates*, *Dendrobates*, *Oophaga*, *Ranitomeya*, *Epipedobates* och *Ameerega*. Det finns dock mer eller mindre giftiga arter inom de andra släktena. Det enda släkte som inte innehåller några alkaloider alls och som är kryptiskt färgade är *Colostethus*. Följden av att det skiljer mycket i giftighet gör att vissa av arterna studeras mer ingående än andra, med ett fokus på de mest giftiga. Typexempel på detta är *Phyllobates* som innehåller de allra giftigaste arterna.

## Upptagnings- och utsöndringssystemen

### Upptagningssystemet

Man har länge kunnat konstatera att grodor i Dendrobatidae är giftiga och man antog till en början att gifterna var endogena, alltså tillverkade av grodorna själva, då många grodor och även paddor utsöndrar giftiga ämnen. Det man fann senare var dock att gifterna har sitt ursprung i grodornas föda (Daly 1995).

Detta testades först genom att föda upp två grupper av guldgroda (*Dendrobates auratus)*. Ena gruppen matades med bananflugor (*Drosophila)* och den andra matades med likadana flugor

som besprutats med en alkaloid man vet finns hos arten i det vilda. Det man fann var att gruppen som fötts upp på obesprutade flugor inte innehöll alkaloiderna, medan de som fötts upp på besprutade flugor innehöll dem. Man kunde utifrån detta dra slutsatsen att grodor av denna art har system för att ta upp alkaloider ur födan. Förutom detta kunde man också se att inte alla alkaloider togs upp av detta system och att de som togs upp var oförändrade när de utsöndrades (Daly et al. 1994b).

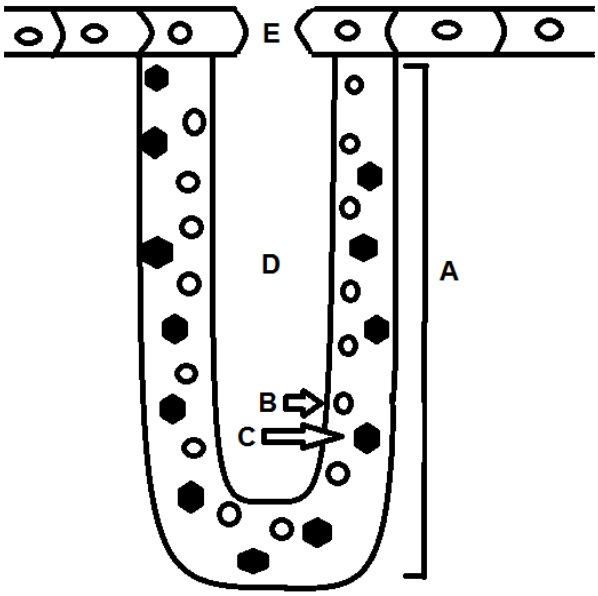
Då man konstaterat att ämnena tas upp genom dieten kan man dra slutsatsen att de måste tas upp genom mag- eller tarmslemhinnorna. Hur upptagningen ser ut här är oklar men man har kunnat påvisa att upptagningen är selektiv då alla arter i familjen inte kan ta upp alla alkaloider som finns representerade i alla släkten och arter ur andra familjer inte kan upp några alls (Mebs et al. 2010, 2014).

Mebs *et al.* (2014) lyckades även påvisa att systemet skiljer sig inom släkten. Arter ur släktet *Phyllobates* ifrån norra Sydamerika innehåller en av de starkaste alkaloiderna som hittats hos pilgiftsgrodorna, batrachotoxin, medan andra arter ur samma släkte som hittas i Centralamerika har lägre, och annorlunda giftinnehåll. Detta trots att arter ur släktet *Dendrobates* som lever i Centralamerika och har samma diet innehåller fler alkaloider. Det verkar alltså som att *Phyllobates* ifrån Centralamerika har ett sämre upptagningssystem för defensiva alkaloider ifrån dieten än både sina släktfränder och grodor ifrån *Dendrobates*.

**Utsöndringssystemet**

Man har studerat morfologin och funktionen av giftkörtlarna hos Anthonys pilgiftsgroda (*Epipedobates anthonyi),* guldgroda (*D. auratus), Oophaga histrionica, Oophaga pumilio,* trefärgad pilgiftsgroda (*Epipedobates tricolor*), gyllene kokoigiftgroda (*Phyllobates terribilis*), *Phyllobates vittatus, Colostethus inguinalis, Mannophryne trinitatis* (tidigare *Colostethus trinitatis* men numera placerad i familjen Aromobatidae) (Neuwirth et al. 1979), *Ameerega picta* (Prates et al. 2012) och *Phyllobates bicolor* (Moreno-Gómez et al. 2014).

Moreno-Gomez *et al.* fann 2014, med hjälp av histologiska studier av huden hos *P. bicolor,* att giftkörtlarna består av ett syncytium (en cell med flera cellkärnor) som lagrar toxinerna som korn av vesiklar i cytoplasman. Dessa celler utsöndrar toxinerna ut i en större lumen som sedan komprimeras med hjälp av slät muskulatur och pressar ut sekretet genom en stoma (en öppning i epidermis som består av tre till fyra epitelceller) i huden (Figur 1). Syncytiet är omgivet av blodkärl som misstänkts vara upptagningsvägen för toxinerna då de är dietbaserade. (Moreno-Gómez et al. 2014)




**Figur 1 A: Sekretoriskt syncytium. B: Cellkärna. C: Vesikelkorn. D: Lumen. E: Stoma. Ritad ifrån text ur Moreno-Gómez et. al. 2014.**

Förutom strukturen och funktionen hos körtlarna så fann man också att giftkornen innehöll dels alkaloider men också sura komponenter. Detta kan tyda på två saker, antingen att alkaloiderna

hålls inaktiva med hjälp av sura ämnen som produceras i syncytiet, eller att grodorna utsöndrar både alkaloider och syror som bioaktivt skydd (Moreno-Gómez et al. 2014). Det tidigare alternativet känns troligt då det skulle förhindra att ämnena förändras under tiden de spenderar i syncytiet, vilket kan vara perioder på upp till sex år (Daly et al. 1994b). Det är också troligt att detta system ser likadant ut inom Dendrobatidae då en studie gjorts även på *A. picta* som kommit fram till liknande resultat (Prates et al. 2012).

## Gifterna

Familjen Dendrobatidae är välkända för att innehålla några av de giftigaste ämnena man kan hitta i naturen, totalt 23 grupper klassificerade toxiner med över 800 aktiva ämnen beskrivna (Daly et al. 2005). Något som är viktigt att visa på är att grodorna inte enbart utsöndrar alkaloider utan även andra ämnen som de producerar endogent likt de flesta grodor och paddor gör (Clark et al. 2012). Det som gör dem unika är dock alkaloiderna.

Studier har visat att flera typer av predatorer på grodor ratar de giftiga grodorna till mycket större del än deras sympatriska och icke-toxiska släktingar. Detta har visats hos predatorer på *O. pumilio* (Fritz et al. 1981, Szelistowski 1985) och guldgrodan (*D. auratus*)(Gray & Kaiser 2010). I studien av Gray & Kaiser (2010) testades om spindeln *Sericopelma rubronitens*, en av de få bekräftade predatorerna på guldgrodan, anföll den icke-toxiska och sympatriska grodan *Engystomops pustulosus* i samma utsträckning. De fann att signifikant fler *E. pustulosus* vart dödade och ätna jämfört med guldgrodorna. Det är viktigt att påvisa att alkaloiderna fungerar som ett aktivt skydd då det är en grundförutsättning för att systemet ska kunna utvecklas. De diskuterar även att guldgrodorna troligen har ett väldigt högt selektionstryck på grund av att spindlarna kommer att undvika de allra giftigaste individerna men fortfarande predera på de mindre giftiga (Gray & Kaiser 2010). Inga studier genomfördes dock mellan toxiska och icke-toxiska individer av guldgrodor.

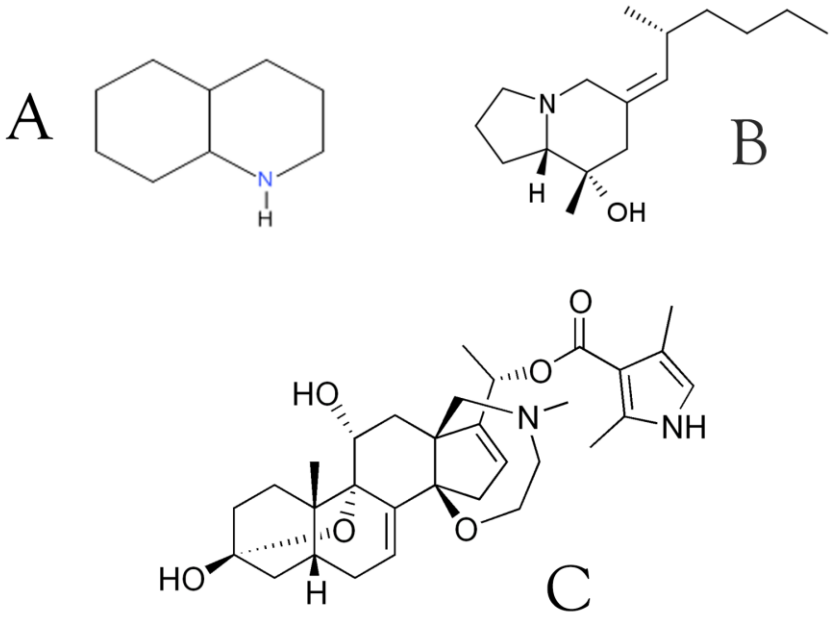
Förutom möjligheten att bli giftig hos adulta grodor har man kunnat påvisa att mödrar av *O. pumilio* matar sina yngel med ägg innehållandes alkaloider och att alkaloiderna sedan kan detekteras hos ynglerna (Stynoski et al. 2014b). Det har också visats att det ger ett lägre predationstryck hos yngel av *O. pumilio* jämfört med yngel av den sympatriska icke-toxiska rödögda bladgrodan (*Agalychnis callidryas).* Alla yngel anfölls dock lika frekvent. Resultatet blev att attack följt av konsumtion av yngel skedde 33 gånger oftare hos icke-toxiska yngel av *O. pumilio* än toxiska och 87 gånger oftare hos yngel av den rödögda bladgrodan. Totalt skedde 13 predationsförsök av fyra olika predatorer, en art av skalbagge, en art av spindel och två arter av ormar (Stynoski et al. 2014a).

Det finns även teorier om att alkaloiderna fungerar som antimikrobiala medel och därmed skyddar grodorna mot infektioner (Macfoy et al. 2005). Det är oklart om alkaloiderna skyddar grodorna mot chytridiomycos, en svampsjukdom som just nu orsakar massdöd hos många grodpopulationer i världen. Förutom möjligheten för grodorna själva att använda alkaloiderna som mikrobialt skydd har man undersökt möjligheten att använda dessa ämnen som läkemedel hos människor. En studie av dessa möjligheter har visat att flera av de ämnena har möjlighet att fungera som antibiotika, smärtstillande, antivirala medel och hjärtmediciner.

## Batrachotoxiner

En av de absolut giftigaste grupperna av toxiner är batrachotoxinerna (Figur 2C) som, innan de upptäcktes i *Phyllobates*, var helt okända för vetenskapen (Tokuyama & Daly 1969). De har sedan hittats i fler djur och växter, bland annat ett fågelsläkte (Dumbacher et al. 1992) och en skalbagge (Dumbacher et al. 2004).

Batrachotoxinerna verkar genom att irreversibelt binda till spänningskänsliga natriumkanaler i nerver och muskler och depolarisera cellen (Daly et al. 1980). batrachotoxinerna är overksamma mot dessa grodor då de spänningskänsliga natriumkanalerna förändrats så att toxinet inte kan fästa alternativt att detta har blivit en följd av överexponering av toxinet (Daly et al. 1980).




**Figur 1 Vanliga förekommande alkaloider inom Dendrobatidae. A: Ett decahydroquinolin. B: Pumiliotoxin 251D. C: Ett batrachotoxin.**

## Pumiliotoxiner

Daly *et al.* (1990) upptäckte dessa gifter (Figur 2B) och dess verkningsmekanism kunde fastställas som liknande den batrachotoxinerna utnyttjar. Det fastställdes senare att det finns ett specifikt bindningssite på dessa natriumportar som är gemensamt för flera alkaloider (Daly et al. 1990, Gusovsky et al. 1992). Flera arter i släktena *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Minyobates* och *Phyllobates* innehåller pumiliotoxiner (Daly et al. 2005).

## Decahydroquinoliner

Dessa toxiner (Figur 2A) är vanliga i Dendrobatidae och många av dem verkar genom att blockera nikotinerga receptorer och därmed förhindra nervsignalöverföring (Daly et al. 2005).

## Spiropyrrolizidiner

Dessa alkaloider hittas sparsamt i Dendrobatidae men man har funnit dem hos myror och

dubbelfotingar (Daly et al. 2002, Saporito et al. 2003). De verkar också genom att blockera nikotinerga receptorer (Daly et al. 2005).

## Födan

Det har sedan upptäckten av att grodorna får sitt gift genom födan diskuterats vilka källor som finns till gifterna. Sättet detta har testats på har ofta varit att utgå ifrån gifter man vet redan finns i grodorna och sedan leta efter evertebrater som innehåller dessa (Daly et al. 2000, Saporito et al. 2003, 2007, 2011, Takada et al. 2005). Den andra metoden som använts är att först studera grodor för att se vilka gifter de innehåller och sedan jämföra detta med redan tillgänglig data för vilka gifter specifika evertebrater innehåller (Mebs et al. 2010).

En av de viktigaste delarna i giftighetsprocessen verkar vara att gifterna normalt inte omvandlas i grodorna utan att de enbart ackumulerar gifter ifrån födan och alltså inte har något eget system för omvandling av ämnena (Daly et al. 1994b). Undantaget som verkar bekräfta regeln verkar vara pumiliotoxiner som kan omvandlas till en giftigare form hos vissa arter i *Dendrobates*.

Något som komplicerar studierna extra är att alkaloidinnehållet hos grodorna inte är konstant utan varierar dels mellan geografiska platser och tid på året (Saporito et al. 2006) men även mellan könen inom samma art på samma lokal (Saporito et al. 2010).

### Myror (Formicidae)

Man visste sedan tidigare att myror var en del av guldgrodans (*D. auratus*) diet men undrade då om myrorna faktiskt innehöll de alkaloider som grodorna uttrycker. Detta testades av Daly et al (2000) genom att föda upp grodor av denna art i fem olika miljöer med olika tillgång till vilda evertebrater som föda. Dessa grodor dödades och deras hud testades för innehåll av alkaloider. Grodorna hade sitt ursprung ur två olika lokaler: Cerro Ancón och Isla Taboga, Panama. Uppfödningsexperimentet utfördes en gång per lokal, totalt tio uppfödningsgrupper. Resultatet blev att alkaloider ur flera grupper[1] hittades och i de vildfångade grodorna hittade man uppemot 40 olika alkaloider. Myrbon testades sedan ifrån dessa två olika lokaler. 50 myrbon ifrån Cerro Ancón testades och man fann att två av dessa bon hade myror som innehöll alkaloider man även funnit i grodorna. I den andra lokalen fann man också att två bon av elva hade myror med samma alkaloider som funnits i grodorna ifrån denna lokal. Man lyckades spåra alkaloiderna ifrån Cerro Ancón till myror av släktet Eldmyror (*Solenopsis*), men dessa artbestämdes inte. På Isla Taboga spårades alkaloiderna istället till myror av arten *Megalomyrmex silvestri*. Dessa myror var dock inte tillräckligt för att förklara alla alkaloider som grodorna innehöll (Daly et al. 2000).

Ytterligare en studie inriktade sig på att ta reda på vilka myror som gav upphov till förekomsten av pumiliotoxiner hos grodor i Dendrobatidae. Sju stycken lokaler på Isla Bastimentos, Panama, valdes ut och beskrevs utifrån floran i området. Där samlades sedan evertebrater av en storlek på mindre än tio millimeter in och analyserades för innehåll av toxiner. De enda evertebrater som innehöll alkaloider var tre arter av myror i släktena

[1] 3,5-Pyrrolizidiner, 3,5-Indolizidiner, Spiropyrrolizidiner, Tricykliner, 2,5-Pyrrolizidiner och flera sedan tidigare okända alkaloider.

*Brachymyrmex* och *Paratrechina* och då bara under vissa tider på året och i vissa lokaler. Dessa jämfördes med maginnehållet hos grodor av arten *O. pumilio* för att se huruvida myrorna fanns i grodornas diet. Man fann att så var fallet och att toxinerna matchade dem som fanns i grodorna vilket ledde till slutsatsen att myrorna med stor sannolikhet är ursprunget till grodornas pumiliotoxiner i dessa lokaler. Värt att nämna är att man aldrig tidigare hade upptäckt alkaloider i myror av underfamiljen Formicinae som normalt bara har sura skyddsämnen som de producerar endogent (Saporito et al. 2004).

En senare studie jämförde möjligheten att ackumulera gift mellan *Ameerega picta* (Dendrobatidae) och *Elachistocleis sp.* (Microhylidae) med samma diet av myror. Vilda grodor av dessa arter samlades in från två olika lokaler och deras giftinnehåll jämfördes. Man fann att extrakten av *A. picta* innehöll 2,5-disubstituerade decahydroquinoliner, histrionicotoxiner och ett pumiliotoxin. Dessa kunde matchas med alkaloidinnehållet i myror från tidigare studier. Extrakten av *E. sp* innehöll inga alkaloider. Båda arters fekalier undersöktes med elektronmikroskop och man fann att båda innehöll myrrester av samma arter. Trots att bägge grodarter hade samma diet kunde alltså bara den ena av dem ackumulera giftet i sina giftkörtlar. Giftet verkar dock inte ha haft någon effekt på *E. sp.* även om de inte kunde ackumulera gifterna (Mebs et al. 2010).

### Dubbelfotingar (Diplopoda)

Studier har försökt koppla dubbelfotingarna till pilgiftsgrodorna med varierande resultat (Daly et al. 2002, Saporito et al. 2003). Studien som inte lyckades hitta en koppling nämnde att anledningen till att man hittat gifterna som dubbelfotingarna förväntades innehålla men inte dubbelfotingarna är att grodorna kan hålla kvar gifter i huden under väldigt lång tid efter första förtäringen, detta genom att äta sin ömsade hud (Daly et al. 1994b, 2002).

#### *Rhinotus*

En studie har hittat att dubbelfotingar ur släktet *Rhinotus* verkar vara en källa till gifter hos grodor. Metoden som dessa studier utförde var massinsamlingar av evertebrater och sedan att undersöka närvaro av alkaloider i extrakt från dessa massinsamlingar. Dessa går sedan ned till artnivå för att utesluta prover utan alkaloider. Spiropyrrolizidine 236 som hittats i flera arter av släktena *Dendrobates* och *Epipedobates* (samt även arter ur familjerna Mantellidae och Bufonidae) fanns då även i *Rhinotus purpurea*. Då en majoritet av arter inom dessa grodfamiljer och släkten finns där dubbelfotingar av detta släkte också finns kan man komma till slutsatsen att *Rhinotus* är en trolig källa till detta gift hos grodorna (Saporito et al. 2003). Detta bekräftade också teorier om dessa som källa ifrån tidigare studier (Daly et al. 2000).

### Hornkvalster (Oribatida)

Två arter av hornkvalster samlades in ifrån två lokaler i Japan och testades för innehåll av alkaloider, *Scheloribates amunaensis* och *Scheloribates sp*. Man fann att dessa innehöll två olika pumiliotoxiner som tidigare hittats hos grodan *O. pumilio*. Man testade larver, nymfer och adulta individer av de två arterna för alkaloidinnehåll och fann att endast de adulta innehöll Pumiliotoxinerna. Detta trots att alla tre stadier har samma föda. I detta fall drog studien slutsatsen att adulta kvalster måste biosyntetisera toxinerna och att de därför är den ursprungliga källan. Man skulle också kunna dra slutsatsen att ett upptagningssystem finns även hos kvalstren och att det inte är utvecklat hos de yngre exemplaren men något sådant har inte kunnat påvisas. Om man utgår ifrån att hornkvalstren är de primära producenterna av

Pumiliotoxiner kan man också komma fram till att myror som också innehåller dessa prederar på hornkvalster, vilket man också funnit (Masuko 1994). Då man redan konstaterat att flera arter i Dendrobatidae äter myror och hornkvalster (Donnelly 1991, Jones et al. 1999) kan man alltså säga att Pumiliotoxiner med största sannolikhet har sitt ursprung hos hornkvalster men att grodorna tar upp dem genom både kvalster och myror (Takada et al. 2005).

Saporito et. al. (2007) genomförde en mer genomgående undersökning av flera lokaler där *O. pumilio* finns och genomförde en massinsamling av evertebrater från samma lokaler. Dessa korstestades för alkaloidinnehåll hos *O. pumilio* i samma lokaler. Det man fann var att hornkvalster innehöll flera alkaloider som hittats hos grodorna. Man diskuterar vidare att det verkar som att myror innehåller fler alkaloider som inte ännu hittats hos kvalstren men att även kvalstren innehåller alkaloider som är exklusiva för dem. Man har tidigare konstaterat att *O. pumilio* är en myr- och kvalsterspecialist (Donnelly 1991) och detta stärks av denna studie (Saporito et al. 2007).

Vidare har man funnit att hornkvalster av arten *Scheloribates laevigatus* innehåller andra alkaloider som inte tidigare hittats en källa till hos pilgiftsgrodorna. Detta inkluderar Pumiliotoxiner, men även andra viktiga alkaloider. Man födde upp hornkvalster i labb och fann att de juvenila exemplaren inte innehöll alkaloider. Man samlade sedan in adulta exemplar ifrån det vilda och dessa hittade man alkaloider hos. Man försökte i denna studie också skifta tyngden av födokällan från myror till hornkvalstren med bakgrund av att det verkar finnas en större förklaringsgrad hos kvalstren då de innehåller flest av alkaloiderna även om många hittas i andra evertebrater. Man har också funnit att många av evertebrater som innehåller alkaloider har hornkvalster som födodjur. Tre olika teorier formuleras som anledningen till varför adulta hornkvalster innehåller alkaloider medan juvenila inte gör det. Den första är att endast adulta individer biosyntetiserar ämnena, vilket innebär att de är grundkällan till dem. Den andra är att de juvenila individerna saknar systemet för omvandling av prekursormetaboliter till alkaloider. Den tredje är att hornkvalster har en gemensam endosymbiont som producerar dessa alkaloider (Saporito et al. 2011).

**Skalbaggar (Coleoptera)**

Skalbaggar av släktet *Choresine* har funnits innehålla batrachotoxiner som endast hittas hos *Phyllobates*-arter. Huruvida de är den ursprungliga källan är dock omtvistat då skalbaggar normalt inte biosyntetiserar den typen av alkaloider själva. Kopplingen mellan skalbaggarna och *Phyllobates* är inte speciellt utforskad och det är därför svårt att säga huruvida de är källan till Batrachotoxiner hos dessa grodor (Dumbacher et al. 2004).

## Upptagningssystemets evolution

För att diskutera evolutionen av upptagningssystemet måste man ta med tre olika variabler hos grodorna: Alkaloidinnehåll, aposematism (varningsfärgning) och specialisering av dieten. Detta för att kunna fastställa om giftigheten är något som uppkommit separat från de andra variablerna eller om det finns ett samband. Utgångspunkten i studier av uppkomsten av detta system är att det finns en förfader som inte är toxisk men som har detta system. Detta skulle innebära att systemet finns inom hela Dendrobatidae men att det endast är aktivt hos vissa släkten och arter (Daly 1998).

Darst *et al.* (2005) utförde en serie tester för att pröva hypotesen att systemet utvecklats en gång hos en anfader till hela Dendrobatidae. Man kom fram till flera viktiga slutsatser efter studier av födan, färgteckningen och alkaloidinnehållet hos 15 arter ur släktena *Allobates* (senare placerad i Aromobatidae), *Colosthethus, Dendrobates, Epipedobates* och *Phyllobates*. Dietspecialisering och giftighet poänggavs och jämfördes även med varandra. Det man fann var att dietspecialisering hade utvecklats vid minst fyra separata tillfällen: Hos *Colostethus sauli*, *Epipedobates anthonyi*, en klad av tre andra *Epipedobates* och hos det stora släktet *Dendrobates*. Man lyckades även visa att uppkomsten av dietspecialisering var signifikant korrelerad med uppkomsten av giftighet. Man lyckades dock inte visa att aposematism var korrelerad med giftighet. Detta tros vara på grund av att flera grodor som inte är giftiga troligtvis använder sig av ”Batesisk mimikry” alltså att de uppvisar sig som giftiga trots att de inte är det och därmed lever på sina giftiga släktingars utseende. Teorin som läggs fram för att visa hur vissa grodors extrema giftighet har utvecklats är att då flera av alkaloiderna som de innehåller är bittra eller annars osmakliga kan det ha förstärkts och visats i aposematism. Alltså, om grodorna redan innehar ett system för upptag av alkaloider ur födan och lyckas med detta till en mindre grad än nu, kommer detta förstärkas över tid då predatorer undviker dem och ger dem en större möjlighet att specialisera sig på viss föda. Över lång tid kommer alltså den osmakliga smått aposematiska grodan att utvecklas till en dödligt giftig kraftigt aposematiskt färgad groda med hjälp av födospecialisering (Darst et al. 2005).

Saporito *et al.* (2010) fann vid jämförelse av alkaloidprofiler hos *O. pumilio* på olika lokaler att dessa skilde signifikant. Dessa lokaler kunde vara så lite som ett par kilometer. Dessutom skilde alkaloidprofilerna inom samma lokal över tid på året. Man kan även se ett mer likt alkaloidinnehåll hos *O. pumilio* och *Dendrobates granuliferus* inom samma lokal än hos delpopulationer av samma art på olika lokaler (Myers et al. 1995).

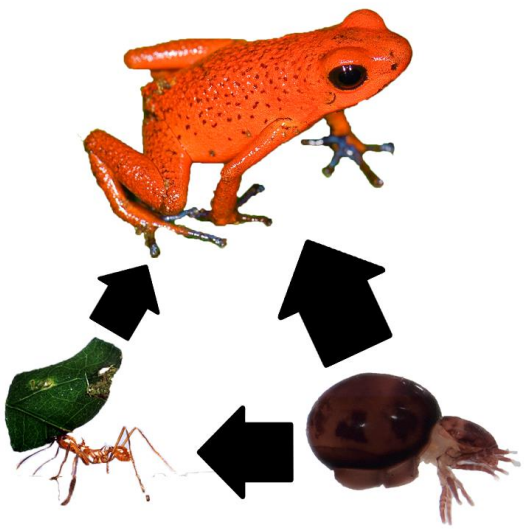
## Diskussion

Myror ansågs länge vara den största källan av alkaloider för pilgiftsgrodor i familjen Dendrobatidae och de har också en stor betydelse. Nya studier tyder på att denna betydelse kan vara mer sekundär och att hornkvalster har en större betydelse för alkaloidinnehållet hos dessa grodor. Det är väldigt svårt att säga att enbart den ena eller den andra organismen förklarar alla alkaloider då knappt tio procent av över 800 alkaloider hos dessa grodor har ursprungsbestämts (Saporito et al. 2012).

Det är en komplex bild som beskrivs där grodorna specialiserar sig på olika födokällor och där ursprunget av alkaloiderna hos dessa källor är omtvistade. Många av evertebraterna prederar på varandra eller äter växter vilket leder till ett svårföljt mönster av upptag av alkaloider.

Slutsatsen jag kan dra ur denna diskussion är att det i dagsläget är omöjligt att peka ut en enskild organismgrupp som källa till pilgiftsgrodors alkaloider. Det troligare scenariot är

istället att grodorna äter en stor mängd olika organismer, och att det visar sig i den stora diversiteten av gifter som finns hos dem. Det blir än mer komplicerat när man räknar med att olika släkten och arter inom släkten tar upp olika ämnen olika väl och att vissa inte tar upp alkaloider från födan överhuvudtaget.



**Figur 2 Toxinkällor och näringsväv hos *Oophaga pumilio* (Foto av *Oophaga pumilio*: Marshal Hedin)**

När det gäller *O. pumilio* kan man i alla fall klarlägga att den specialiserat sig på både myror och kvalster och att dessa ger upphov till en cocktail av alkaloider som inte kan förklaras av bara den ena organismgruppen (Figur 3).

Man vet att grodor i Dendrobatidae har ett system för att ta upp alkaloider ur sin föda. Detta system är specifikt för de olika ämnena och det skiljer sig emellan släkten och arter inom familjen.

Hur själva upptaget ser ut är okänt. Jag skulle vilja diskutera möjligheten att det finns specifika och ospecifika transportproteiner för dessa alkaloider som en följd av en diet som varit likadan under väldigt lång tid. Då de alkaloider som tas upp av grodorna skiljer sig åt strukturellt kräver det antingen få generella transportproteiner som används, att det är en stor mängd specifika transportproteiner eller att det är en kombination av dessa. Då upptagningssystemet kan skilja sig så mycket som har påvisats inom *Phyllobates* lutar jag mer mot det senare antagandet. De alkaloider som är representerade i nästan alla släkten av Dendrobatidae bör vara generellt transporterade medan till exempel Batrachotoxinerna som endast hittas i några få arter inom *Phyllobates* bör vara specifikt transporterade.

Alkaloiderna som grodorna utsöndrar har visats vara ett effektivt sätt att skydda sig mot predatorer. Det verkar dock som att majoriteten av denna skyddande effekt kan förklaras av att grodorna blir osmakliga snarare än att de är giftiga. Det kan såklart finnas en kombination mellan dessa effekter. Studien som visar att yngel som fått alkaloiderna ifrån ägg lagda av modern också skyddas av dessa effekter är jag tveksamma till för tillfället då mängden replikat (13 predationsförsök totalt) är allt för få för att bestämt kunna säga att så är fallet (Stynoski et al. 2014a).

En väldigt viktig punkt man måste se till när det gäller ursprunget och evolutionen av upptagningssystemet är att man har kunnat påvisa att icke-toxiska grodor även är immuna mot verkningarna av vissa av alkaloiderna (Darst et al. 2005, Mebs et al. 2010). Det innebär att icke-toxiska grodor kan äta samma föda som toxiska grodor utan att påverkas av födans toxininnehåll. Det är därför troligt att upptagningssystemet utvecklats ur denna immunitet och att det har förstärkts genom att till en börja vara osmaklig för att sedan utvecklas till en ren giftighet. Det bygger också på att osmakligheten är en tillräckligt stark faktor för att motverka predation.

När det gäller skillnaden i alkaloidinnehåll över tid och lokal kan det förklaras med att

upptagningssystemet är väldigt likt hos alla de giftiga arterna. Det tyder starkt på att födan har en större påverkan på alkaloidinnehållet än hur specialiserat systemet är. Det finns dock undantaget *Phyllobates* som med sina Batrachotoxiner måste vara väldigt specialiserade. Inga andra grodor innehåller dessa alkaloider (inte ens alla *Phyllobates*) och inga andra grodor är immuna mot dess verkan vilket tyder på att de är extremt specialiserade. Att endast de är immuna mot batrachotoxinerna och att de innehåller dem stärker teorin om att för att utveckla giftighet måste man först utveckla en immunitet mot det som sedan kan utsöndras. Detta bör vara en lång evolutionär process som accelererar ju tåligare grodan blir mot alkaloiderna.

Det som gör grodorna inom Dendrobatidae unika är att möjligheten att bli giftig finns i flera släkten. Exempel på upptagningssystem finns även hos *Mantella* (Clark et al. 2012) och *Melanophryniscus stelzneri* (Hantak et al. 2013) med flera. Studier visar även på att evolutionen av detta system har utvecklats konvergent mellan Madagaskar och tropikerna (Clark et al. 2005).

Väldigt mycket är fortfarande oförklarat kring födokällorna till Dendrobatidaes alkaloider. Hur alkaloiderna tas upp i mag-tarmkanalen finns det, vad jag har kunnat hitta, inga studier på.

Slutsatsen jag kan dra av denna översiktsartikel är att man har kunnat förklara en liten andel av ursprunget till de över 800 alkaloiderna som grodorna utsöndrar och att det därmed krävs en hel del forskning för att kartlägga den exakta bilden. Evolutionen av upptagningssystemet verkar vara klarlagd och förmodligen finns det hos en stor mängd grodor och paddor men att det är överuttryckt hos Dendrobatidae, orsaken till detta är dock oklar.

Det är mycket forskning i området som kvarstår innan man kan få en helhetsbild av vad som pågår men det man har kommit fram till hittills har redan gett en mycket klarare bild.

## Tack

Tack till professor Monika Schmitz för handledning och tack till Germán Orizaola och professor Anna Qvarnström för tips till relevant litteratur.

## Referenser

Batista A, Jaramillo A. CA, Ponce M, Crawford AJ. 2014. A new species of Andinobates (Amphibia: Anura: Dendrobatidae) from west central Panama. Zootaxa **3866**: 333–352.

Brown JL. 2011. A taxonomic revision of the Neotropical poison frog genus Ranitomeya (Amphibia: Dendrobatidae). Magnolia Press, Auckland, N.Z.

Calkosiński I, Zasadowski A, Bronowicka-Szydelko A, Dzierzba K, Seweryn E, Dobrzyński M, Gamian A. 2015. Amphibian skin secretions as a new source of antibiotics and biologically active substances. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej **69**: 537–548.

Clark VC, Harinantenaina L, Zeller M, Ronto W, Rocca J, Dossey AT, Rakotondravony D,

Kingston DGI, Shaw C. 2012. An endogenous bile acid and dietary sucrose from skin secretions of alkaloid-sequestering poison frogs. Journal of Natural Products **75**: 473–478.

Clark VC, Raxworthy CJ, Rakotomalala V, Sierwald P, Fisher BL. 2005. Convergent evolution of chemical defense in poison frogs and arthropod prey between Madagascar and the Neotropics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 11617–11622.

Daly JW. 1995. The chemistry of poisons in amphibian skin. Proceedings of the National Academy of Sciences **92**: 9–13.

Daly JW. 1998. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. Journal of natural products **61**: 162–172.

Daly JW, Garraffo HM, Jain P, Spande TF, Snelling RR, Jaramillo C, Rand AS. 2000. Arthropod–frog connection: decahydroquinoline and pyrrolizidine alkaloids common to microsympatric myrmicine ants and dendrobatid frogs. Journal of Chemical Ecology **26**: 73–85.

Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Jaramillo C, Rand AS. 1994a. Dietary source for skin alkaloids of poison frogs (Dendrobatidae)? Journal of Chemical Ecology **20**: 943–955.

Daly JW, Gusovsky F, Mcneal E, Secunda S, Bell M, Creveling C, Nishizawa Y, Overman L, Sharp M, Rossignol D. 1990. Pumiliotoxin alkaloids - a new class of sodium-channel agents. Biochemical Pharmacology **40**: 315–326.

Daly JW, Kaneko T, Wilham J, Garraffo HM, Spande TF, Espinosa A, Donnelly MA. 2002. Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**: 13996–14001.

Daly JW, Myers C, Warnick J, Albuquerque E. 1980. Levels of batrachotoxin and lack of sensitivity to its action in poison-dart frogs (*Phyllobates*). Science **208**: 1383–1385.

Daly JW, Secunda SI, Garraffo HM, Spande TF, Wisnieski A, Cover Jr JF. 1994b. An uptake system for dietary alkaloids in poison frogs (Dendrobatidae). Toxicon **32**: 657–663.

Daly JW, Spande TF, Garraffo HM. 2005. Alkaloids from amphibian skin: A tabulation of over eight-hundred compounds. Journal of Natural Products **68**: 1556–1575.

Darst CR, Menéndez-Guerrero PA, Coloma LA, Cannatella DC. 2005. Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): A comparative analysis. The American Naturalist **165**: 56–69.

Donnelly MA. 1991. Feeding patterns of the strawberry poison frog, *Dendrobates pumilio* (Anura: Dendrobatidae). Copeia **1991**: 723–730.

Dumbacher J, Beehler B, Spande T, Garraffo H. 1992. Homobatrachotoxin in the genus Pitohui - chemical defense in birds. Science **258**: 799–801.

Dumbacher JP, Wako A, Derrickson SR, Samuelson A, Spande TF, Daly JW. 2004. Melyrid beetles (Choresine): A putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 15857–15860.

Fritz G, Rand AS, dePamphilis CW. 1981. The aposematically colored frog, *Dendrobates pumilio*, is distasteful to the large, predatory ant, *Paraponera clavata*. Biotropica **13**: 158–159.

Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs

and their relatives (Amphibia : Athesphatanura : Dendrobatidae). Bulletin of the American Museum of Natural History **299:**6–262.

Gray HM, Kaiser H. 2010. Does alkaloid sequestration protect the green poison frog, *Dendrobates auratus*, from predator attacks. Salamandra **46**: 235–238.

Gusovsky F, Padgett WL, Creveling CR, Daly JW. 1992. Interaction of pumiliotoxin B with an“ alkaloid-binding domain” on the voltage-dependent sodium channel. Molecular pharmacology **42**: 1104–1108.

Hantak MM, Grant T, Reinsch S, Mcginnity D, Loring M, Toyooka N, Saporito RA. 2013. Dietary Alkaloid Sequestration in a Poison Frog: An Experimental Test of Alkaloid Uptake in Melanophryniscus stelzneri (Bufonidae). Journal of Chemical Ecology **39**: 1400–1406.

Jones TH, Gorman JS, Snelling RR, Delabie JH, Blum MS, Garraffo HM, Jain P, Daly JW, Spande TF. 1999. Further alkaloids common to ants and frogs: decahydroquinolines and a quinolizidine. Journal of Chemical Ecology **25**: 1179–1193.

Macfoy C, Danosus D, Sandit R, Jones TH, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW. 2005. Alkaloids of anuran skin: Antimicrobial function? Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences **60**: 932–937.

Masuko K. 1994. Specialized predation on oribatid mites by two species of the ant genus Myrmecina (Hymenoptera: Formicidae). Psyche: A Journal of Entomology **101**: 159–173.

Mebs D, Alvarez JV, Pogoda W, Toennes SW, Koehler G. 2014. Poor alkaloid sequestration by arrow poison frogs of the genus *Phyllobates* from Costa Rica. Toxicon **80**: 73–77.

Mebs D, Jansen M, Köhler G, Pogoda W, Kauert G. 2010. Myrmecophagy and alkaloid sequestration in amphibians: a study on *Ameerga picta* (Dendrobatidae) and Elachistocleis sp.(Microhylidae) frogs. Salamandra **46**: 11–15.

Moreno-Gómez F, Duque T, Fierro L, Arango J, Peckham X, Asencio-Santofimio H. 2014. Histological Description of the Skin Glands of *Phyllobates bicolor* (Anura: Dendrobatidae) Using Three Staining Techniques. International Journal of Morphology **32**: 882–888.

Myers CW, Daly JW, Garraffo HM, Wisnieski A, Cover JF. 1995. Discovery of the Costa Rican poison frog *Dendrobates granuliferus* in sympatry with *Dendrobates pumilio*, and comments on taxonomic use of skin alkaloids. American Museum Novitates **3144**: 1–21.

Neuwirth M, Daly J, Myers C, Tice L. 1979. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). Tissue & Cell **11**: 755–771.

Perez-Pena PE, Chavez G, Twomey E, Brown JL. 2010. Two new species of *Ranitomeya* (Anura: Dendrobatidae) from eastern Amazonian Peru. Zootaxa **2439**: 1–23.

Prates I, Antoniazzi MM, Sciani JM, Pimenta DC, Toledo LF, Haddad CFB, Jared C. 2012. Skin glands, poison and mimicry in dendrobatid and leptodactylid amphibians. Journal of Morphology **273**: 279–290.

Saporito RA, Donnelly MA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW. 2006. Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panama. Journal of Chemical Ecology **32**: 795–814.

Saporito RA, Donnelly MA, Hoffman RL, Garraffo HM, Daly JW. 2003. A siphonotid millipede (Rhinotus) as the source of spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. Journal of chemical ecology **29**: 2781–2786.

Saporito RA, Donnelly MA, Madden AA, Garraffo HM, Spande TF. 2010. Sex-related differences in alkaloid chemical cefenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas del Toro, Panama. Journal of Natural Products **73**: 317–321.

Saporito RA, Donnelly MA, Norton RA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW. 2007. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. Proceedings of the National Academy of Sciences **104**: 8885–8890.

Saporito RA, Donnelly MA, Spande TF, Garraffo HM. 2012. A review of chemical ecology in poison frogs. Chemoecology **22**: 159–168.

Saporito RA, Garraffo HM, Donnelly MA, Edwards AL, Longino JT, Daly JW. 2004. Formicine ants: an arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 8045–8050.

Saporito RA, Norton RA, Andriamaharavo NR, Garraffo HM, Spande TF. 2011. Alkaloids in the mite *Scheloribates laevigatus*: further alkaloids common to oribatid mites and poison frogs. Journal of Chemical Ecology **37**: 213–218.

Stynoski JL, Shelton G, Stynoski P. 2014a. Maternally derived chemical defences are an effective deterrent against some predators of poison frog tadpoles (*Oophaga pumilio*). Biology Letters **10**: 20140187.

Stynoski JL, Torres-Mendoza Y, Sasa-Marin M, Saporito RA. 2014b. Evidence of maternal provisioning of alkaloid-based chemical defenses in the strawberry poison frog *Oophaga pumilio*. Ecology **95**: 587–593.

Summers K, Clough ME. 2001. The evolution of coloration and toxicity in the poison frog family (Dendrobatidae). Proceedings of the National Academy of Sciences **98**: 6227–6232.

Szelistowski WA. 1985. Unpalatability of the poison arrow frog *Dendrobates pumilio* to the ctenid spider Cupiennius coccineus. Biotropica **17**: 345–346.

Takada W, Sakata T, Shimano S, Enami Y, Mori N, Nishida R, Kuwahara Y. 2005. Scheloribatid mites as the source of pumiliotoxins in dendrobatid frogs. Journal of Chemical Ecology **31**: 2403–2415.

Tokuyama T, Daly J. 1969. Structure of batrachotoxin, a steroidal alkaloid from the Colombian arrow poison frog, phyllobates aurotaenia, and partial synthesis of batrachotoxin and its analogs and homologs. Journal of the American Chemical Society **91**: 3931–3938.

Twomey E, Brown JL. 2008. Spotted poison frogs: rediscovery of a lost species and a new genus (Anura: Dendrobatidae) from northwestern Peru. Herpetologica **64**: 121–137.

**Bilder**

Oophaga pumilio, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oophaga_pumilio_(Strawberry_poision_frog)_(2532163201).jpg

Bladskärarmyra, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leaf-cutting_ant.jpg

Oribatidkvalster, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phthiracarid.jpg

Batrachotoxin, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Batrachotoxin.png

Pumiliotoxin, http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pumiliotoxin251D.png

Guldgroda framsidan,
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Goldenergiftfrosch2cele4.jpg Foto: Marcel Burkhard