

# Molekulare Untersuchungen zur Phylogenie und Taxonomie der Neukaledonischen Geckos der Gattung *Rhacodactylus* (Reptilia: Gekkonidae)

MIGUEL VENCES, FRIEDRICH-WILHELM HENKEL & ROBERT SEIPP

## Abstract

*Molecular studies on the phylogeny and taxonomy of the New Caledonian geckos of the genus Rhacodactylus (Reptilia: Gekkonidae).*

A 513 bp fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene was sequenced in representatives of all known species of *Rhacodactylus*, and in the Australian *Pseudothecadactylus lindneri*. Within *R. leachianus* a significant differentiation was noted which suggests that populations from northern New Caledonia may belong to a separate species. A low differentiation was observed between populations of *R. leachianus* and *R. trachyrhynchus* of the main New Caledonian island to conspecific populations on the small Île des Pins and associated offshore islands. Within *Rhacodactylus*, a monophyletic grouping of *R. ciliatus* and *R. sarasinorum* is strongly supported; these two species are the sister group of *R. chahoua*. This result is in conflict with previously published hypotheses which advocated a close relationship of *R. ciliatus* and *R. chahoua*, but are in accordance with data on tooth morphology and tooth numbers. *Pseudothecadactylus lindneri* was grouped within the genus *Rhacodactylus* in two analyses (maximum parsimony and neighbor joining) but was the sister group of all *Rhacodactylus* in the maximum likelihood analysis. It showed a rather high degree of differentiation and its clustering within the genus *Rhacodactylus* may therefore be an artefact due to a wrong choice of outgroup (*Bavayia cyclura*).

Key words: Reptilia; Squamata; Gekkonidae; *Rhacodactylus*, *Pseudothecadactylus*, *Bavayia*; New Caledonia, Australia; molecular phylogeny.

## Zusammenfassung

Ein 513 Basenpaare umfassendes Fragment des mitochondrialen 16S rRNA Gens wurde von Exemplaren aller *Rhacodactylus*-Arten sowie von dem australischen Gecko *Pseudothecadactylus lindneri* sequenziert. Innerhalb der Art *R. leachianus* wurde anhand dieser Daten eine erhebliche genetische Differenzierung festgestellt, was nahe legt, dass Populationen aus dem Norden der neukaledonischen Hauptinsel als eigenständige Art abgetrennt werden müssen. Eine schwächere Differenzierung existiert zwischen Hauptinsel-Populationen der Arten *R. leachianus* und *R. trachyrhynchus* sowie jeweils konspezifischen Populationen von der Île des Pins und weiteren kleinen Inseln. Innerhalb der Gattung *Rhacodactylus* unterstützen unsere Daten die Gruppierung von *R. ciliatus* und *R. sarasinorum* als monophyletische Gruppe, die zusammen die Schwestergruppe von *R. chahoua* bilden. Dies widerspricht bisherigen Hypothesen, die von einem Monophylum aus *R. ciliatus* und *R. chahoua* ausgingen, steht aber mit Daten über Anzahl und Morphologie von Zähnen im Einklang. *Pseudothecadactylus lindneri* wurde in zwei Analysen (Maximum Parsimony und Neighbor Joining) innerhalb der Gattung *Rhacodactylus* eingeordnet, während die Maximum Likelihood Analyse ihn als Schwestergruppe aller *Rhacodactylus* klassifizierte. Die gefundene hohe Differenzierung dieser Art zu allen *Rhacodactylus* weist darauf hin, dass die Einordnung der Art innerhalb von *Rhacodactylus* möglicherweise ein Artefakt auf Grund der falschen Wahl der Außengruppe (*Bavayia cyclura*) darstellt.

Schlagwörter: Reptilia; Squamata; Gekkonidae; *Rhacodactylus*, *Pseudothecadactylus*, *Bavayia*; Neukaledonien, Australien; molekulare Phylogenie.

## 1 Einleitung

Zu der Gattung *Rhacodactylus* werden sechs Arten aus Neukaledonien gezählt, die zu den größten und beeindruckendsten Geckos der Welt zählen (BAUER & VINDUM 1990, BAUER & SADLER 1993). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand handelt es sich bei *R. leachianus* sogar um den größten rezent vorkommenden Gecko (BAUER & RUSSELL 1991). Drei australische Geckoarten (*australis*, *lindneri*, *cavaticus*) wurden von BAUER (1990) als Untergattung *Pseudothecadactylus* in die Gattung *Rhacodactylus* gestellt; auf Grund der festgestellten starken Allozymdifferenzierung machten GOOD et al. (1997) diesen Schritt jedoch kürzlich wieder rückgängig und werteten *Pseudothecadactylus* zur Gattung auf.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den *Rhacodactylus*-Arten sind von BAUER (1990) und GOOD et al. (1997) untersucht worden. Nach dem kombinierten Kladogramm aus morphologischen und Allozym-Merkmalen in GOOD et al. (1997) ist *R. auriculatus* die ursprünglichste Art der Gattung, gefolgt von einer monophyletischen Gruppe aus *R. leachianus* und den Geschwisterarten *R. chahoua* und *R. ciliatus*. Die Schwestergruppe hierzu stellt die Linie mit den Arten *R. sarasinorum* und *R. trachyrhynchus* dar.

SEIPP & OBST (1994) wiesen vor wenigen Jahren darauf hin, dass die Populationen von *R. leachianus* von der Île des Pins, die der neukaledonischen Hauptinsel vorgelegt ist, sich morphologisch von denen der Hauptinsel unterscheiden. Die Validität der von ihnen aufgestellten Unterart *R. leachianus henkeli* wurde jedoch von GOOD et al. (1997) in Frage gestellt. Weiterhin hatte HENKEL (1991) dokumentiert, dass zwischen *R. leachianus*-Populationen von der Hauptinsel deutliche Färbungsunterschiede bestehen. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, zur Aufklärung der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gattung *Rhacodactylus* beizutragen und Daten über die genetische Differenzierung der *Rhacodactylus*-Inselpopulationen vorzustellen. Mit Hilfe molekularer Methoden (DNA-Sequenzanalysen) soll hierzu ein von den publizierten morphologischen und enzymatischen Merkmalen unabhängiger Datensatz gewonnen werden. Die sich aus den Analysen ergebenden taxonomischen Schlussfolgerungen sollen in einer zweiten, folgenden Arbeit gezogen werden.

## 2 Material und Methoden

Gewebeproben (Schwanzspitzen) wurden je einem in Gefangenschaft gehaltenen Exemplar der folgenden Populationen entnommen und eingefroren oder in 98%igen Analysealkohol (Ethanol p.a.) konserviert: *Bavayia cyclura* (Loyalty Inseln); *Pseudothecadactylus lindneri* (Nord-Australien, ohne genaueren Fundort); *Rhacodactylus auriculatus* (Neukaledonien, ca. 50 km südöstlich Nouméa); *R. chahoua* (Neukaledonien, 25 km nördlich Koumac); *R. ciliatus* (Neukaledonien, Île des Pins); *R. leachianus* (südliches Neukaledonien, ca. 50 km südöstlich Noumea – gestreifte Form); *R. leachianus* (Neukaledonien, Île des Pins); *R. leachianus* (Neukaledonien, Île d'Ani); *R. leachianus* (Neukaledonien, Île des Bayonais); *R. leachianus* (Neukaledonien, Île de Bros); *R. cf. leachianus* (nördliches Neukaledonien, westlich von Houailou – grau gefärbte Form); *R. sarasinorum* (Neukaledonien, Mt. Koghis); *R. trachyrhynchus* (Neukaledonien, Mt. Koghis); *R. trachyrhynchus* (Neukaledonien, Île des Pins).

DNA wurde mit QIAamp tissue extraction kits (Qiagen) extrahiert. Die Primer 16SA (leichte Kette; 5' - CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT - 3') und 16SB (schwere Kette; 5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T - 3') wurden verwendet, um einen Teil des

mitochondrialen 16S rRNA Gens zu amplifizieren. PCR Bedingungen waren wie folgt: Initialer Denaturierungsschritt: 90 s bei 94 °C; darauf folgend 33 Zyklen: 45 s bei 94 °C; 45 s bei 55 °C; 90 s bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden mit QIAick purification kits (Qiagen) aufgereinigt. Es wurde ein einzelsträngiges Fragment von 554 Basenpaaren Länge sequenziert, welches den Basenpaaren 4007-4565 des *Xenopus laevis* Genomes homolog ist (vgl. ROE et al. 1985). Die nicht alignierten Originalsequenzen sind in der GenBank unter AF215246-AF215259 abrufbar.

Die Sequenzen wurden mit dem Programm SEQUENCE NAVIGATOR (Applied Biosystems) manuell aligniert. Ein kurzer, hochvariabler Abschnitt von 41 Basenpaaren wurde aus der Gesamtanalyse ausgeschlossen, da die Basenpaare der verschiedenen Taxa nicht zuverlässig homologisiert werden konnten. Die Sequenzen wurden mit PAUP\* 4.0 (SWOFFORD 1998) analysiert. Wir berechneten Phylogramme nach der Maximum Parsimony (MP) Methode, bei der alignierungsbedingte Lücken als „fünfte Base“ gewertet wurden. Daneben wurden auch Phylogramme nach der Neighbor-Joining (NJ) Methode mit Jukes-Cantor Distanzen (JUKE & CANTOR 1969) und der Maximum Likelihood (ML) Methode berechnet, wobei die Lücken als „missing data“ interpretiert wurden. Eine Überprüfung der Absicherung der einzelnen Knoten erfolgte durch die Bootstrap-Methode (FELSENSTEIN 1985); in den MP und NJ Analysen wurden 2000 Replikate berechnet (vgl. HEDGES 1992), während auf Grund der hohen benötigten Rechnerkapazität in der ML Analyse nur 130 Replikate berechnet werden konnten. In den experimentellen Analysen von HILLIS & BULL (1993) entsprachen Bootstrap-Werte von 70 % und höher einer Signifikanz des entsprechenden Knotens von 95 %; aus diesem Grund sehen wir im Folgenden nur die Verzweigungen als gesichert an, die mindestens Werte von 70 % erhielten. *Bavayia cyclura* wurde als Außengruppe verwendet.

## 3 Ergebnisse

Die errechneten MP, NJ und ML Phylogramme sind in Abbildung 1-3 dargestellt. Mit relevanten Bootstrap Werten wurden folgende monophyletische Gruppen unterstützt: (1) eine Gruppe aller zu *R. leachianus* gerechneten Tiere; (2) eine Gruppe aller *R. leachianus* außer dem grau gefärbten Tier aus dem Norden; (3) beide Exemplare von *R. trachyrhynchus*; (4) *R. ciliatus* und *R. sarasinorum*. Weiterhin unterstützten Bootstrap-Werte über 60 % (MP) bzw. über 70 % (ML) die Gruppierung von *R. chahoua* als Schwestergruppe von (*R. ciliatus*, *R. sarasinorum*), sowie ein Wert von 62 % (NJ) die Stellung der vier *R. leachianus*-Populationen der kleinen Inseln als Schwestergruppe des Exemplars aus dem Süden der Hauptinsel (gestreifte Form). *Pseudothecadactylus lindneri* stand nach den MP und NJ Berechnungen innerhalb von *Rhacodactylus*, doch diese Gruppierung wurde nur im NJ-Phylogramm von einem relevanten (aber äußerst geringen) Bootstrap-Wert von 54 % unterstützt. In der ML Analyse war *P. lindneri* die Schwestergruppe aller *Rhacodactylus*, welche ein (schwach abgesichertes) Monophylum bildeten.

Innerhalb des untersuchten Fragments (mit Ausnahme der 41 ausgeschlossenen Basen) zeigten sich bei paarweisen Vergleichen zwischen den neukaledonischen *Rhacodactylus*-Arten 18-34 Basenaustausche (3,5-6,6 % Sequenzdifferenz). Der australische *P. lindneri* war von den anderen Arten mit Ausnahme von *R. ciliatus* (33) stärker differenziert (39-43 Basenaustausche). Diese Differenzierungsgrade waren sogar höher als die zwischen der Außengruppe (*Bavayia cyclura*) und den *Rhacodactylus*-Arten (31-37 Substitutionen).

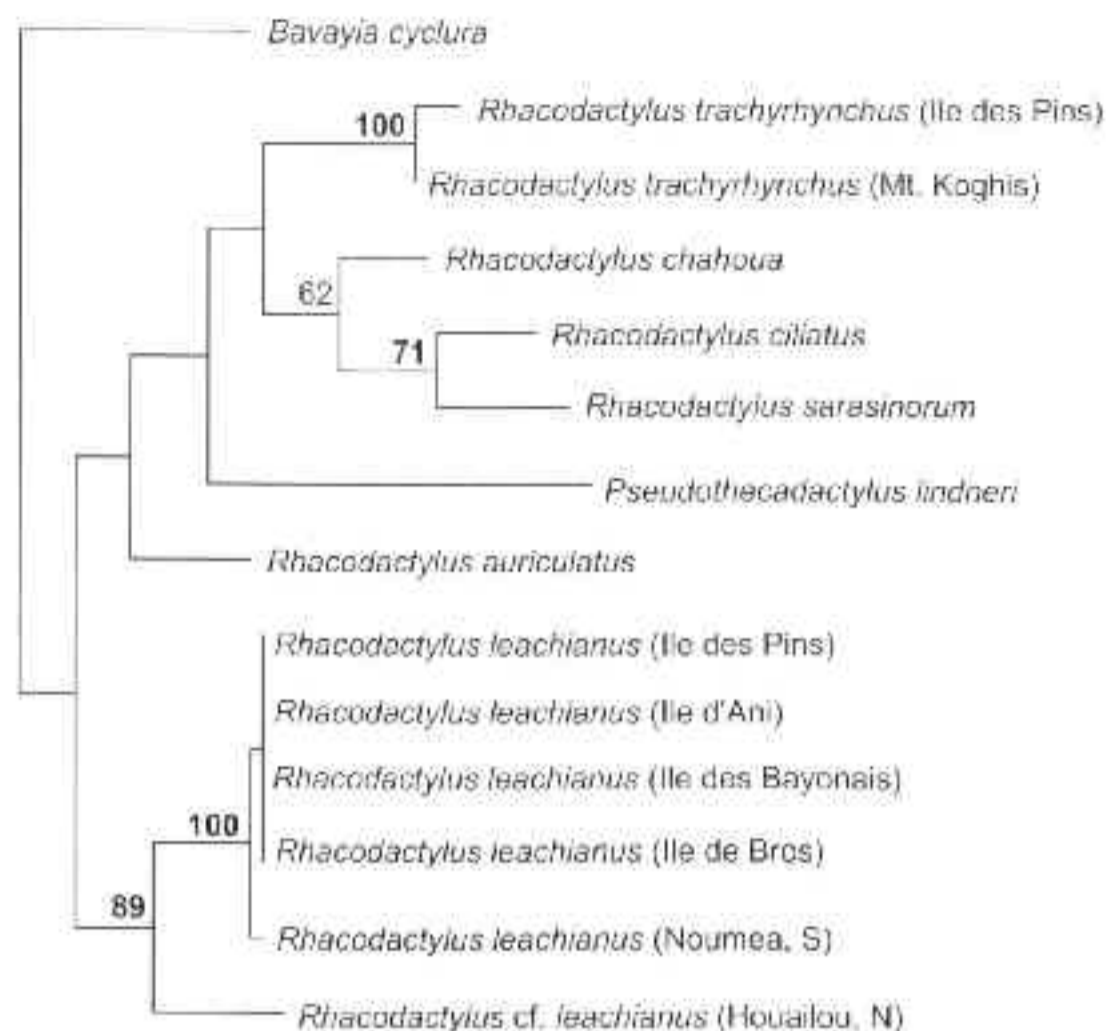


Abb. 1. Phylogramm der untersuchten Taxa nach der Maximum Parsimony Methode, basierend auf der Analyse von 513 Basenpaaren des mitochondrialen 16S rRNA Gens. Die Zahlen sind Bootstrap-Werte in Prozent (2000 Wiederholungen). Lücken wurden als „fünfte Base“ gewertet.

Maximum Parsimony phylogram of studied taxa, based on 513 bp of the mitochondrial 16S rRNA gene. Numbers are bootstrap values in percent (2000 replications). Gaps were treated as 'fifth base'.

Innerhalb der zu *R. leachianus* gerechneten Tiere fiel die grau gefärbte Form aus dem Norden der Grande Terre aus dem Rahmen; sie zeigte zu den übrigen *leachianus*-Exemplaren 18-19 Substitutionen. Die *R. leachianus*-Exemplare der vier kleinen Inseln (Pins, Ani, Bayonais, Bros) wiesen vollkommen identische Sequenzen auf und unterschieden sich von dem Exemplar aus dem Süden der Hauptinsel durch eine einzige Mutation. In einer separaten Betrachtung des kompletten sequenzierten Fragments (inklusive der hochvariablen Region) nur für die zu *R. leachianus* gerechneten Tiere akzentuierte sich dieses Muster weiter: Die Inselpopulationen waren weiterhin zu 100 % identisch und zeigten jeweils zu dem Tier aus dem Süden der Hauptinsel 2 Mutationen. Das grau gefärbte Tier vom Norden der Hauptinsel wich dagegen mit 25-27 Mutationen deutlich ab.

#### 4 Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse erlauben eine Reihe von phylogenetischen und systematischen Schlussfolgerungen, die im Folgenden kurz skizziert werden sollen.

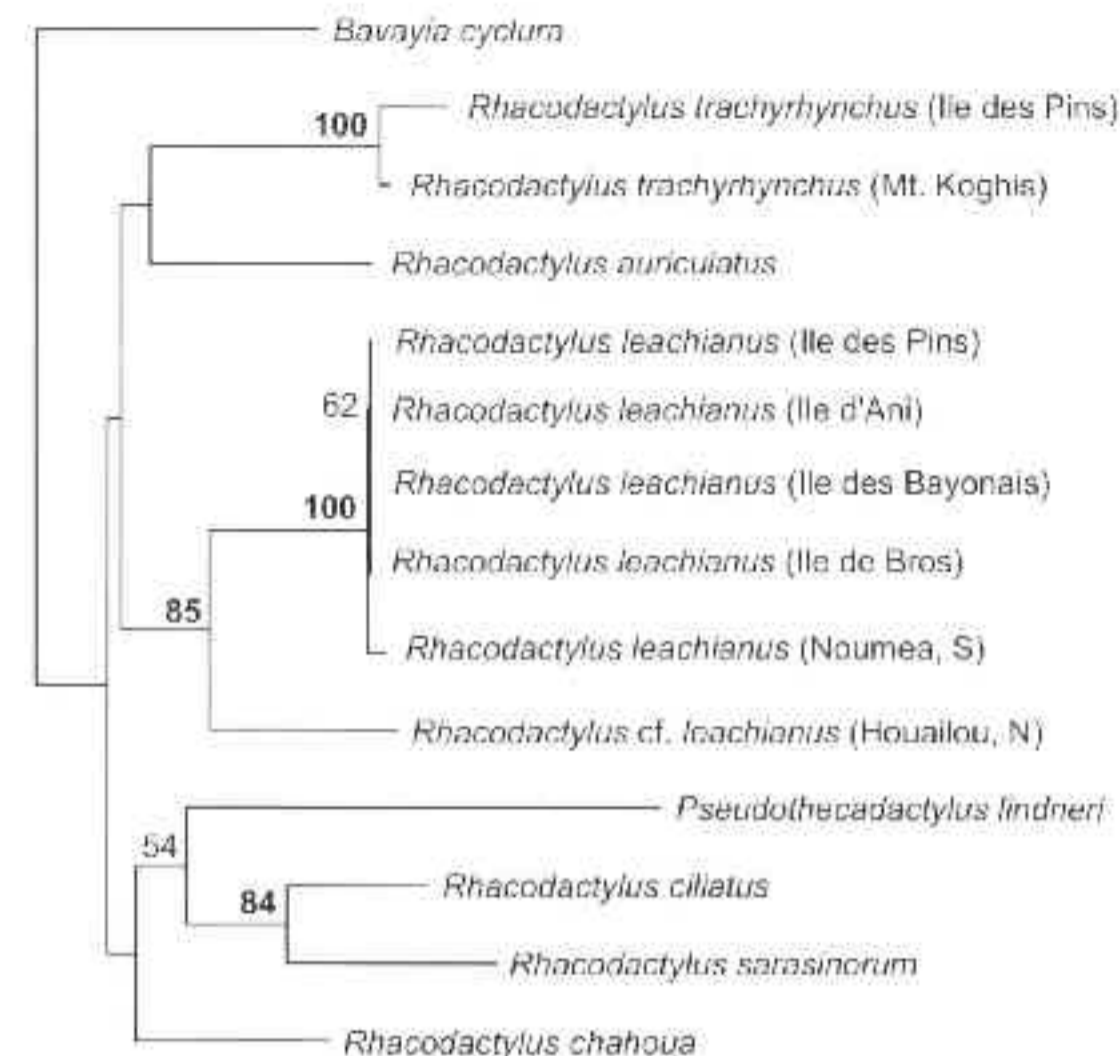


Abb. 2. Phylogramm der untersuchten Taxa nach der Neighbor-Joining-Methode (Jukes-Cantor-Distanzen), basierend auf der Analyse von 513 Basenpaaren des mitochondrialen 16S rRNA Gens. Die Zahlen sind Bootstrap-Werte in Prozent (2000 Wiederholungen). Lücken wurden als „missing data“ gewertet.

Neighbor-Joining phylogram of studied taxa, based on 513 bp of the mitochondrial 16S rRNA gene. Numbers are bootstrap values in percent (2000 replications). Gaps were treated as missing data.

#### 4.1 Differenzierung innerhalb von *R. leachianus* und *R. trachyrhynchus*

Unsere Daten belegen schlüssig, dass die bislang als *R. leachianus* bezeichneten Populationen aus zwei getrennten Taxa bestehen. Die grau gefärbten Tiere aus dem Norden der Hauptinsel sind stark von den übrigen hier untersuchten Populationen differenziert; die ermittelte Anzahl von Substitutionen liegt im Bereich der zwischen den übrigen *Rhacodactylus*-Arten gefundenen Werte. Auf Grund des sympatrischen Vorkommens beider Formen auf der Hauptinsel besteht kaum Zweifel, dass die grauen Tiere als separate Art aufzufassen sind.

Zwischen den *R. leachianus* aus dem Süden der Hauptinsel und denen der verschiedenen kleineren Inseln besteht ein äußerst schwacher Unterschied (1 Substitution im reduzierten Genabschnitt; 2 Substitutionen im gesamten Fragment), während die Tiere der vier untersuchten Inselpopulationen eine untereinander zu 100 % identische Sequenz aufweisen. Im Fall von *R. trachyrhynchus* zeigt das Exemplar der Île des Pins ebenfalls eine geringe Differenzierung (4 Substitutionen) zu dem einbezogenen Tier von der Hauptinsel.

