

***Aphyosemion malumbresi n.sp., un nouveau
Chromaphyosemion (Teleostei: Aplocheilidae)
originaire de Guinée Equatoriale continentale***

Olivier Legros¹, Frédéric Zentz²

Résumé

La répartition géographique de nombreuses espèces de Cyprinodontidae présentes en Guinée Equatoriale est encore relativement peu connue. De récentes collectes ichtyologiques effectuées au Nord-Ouest du Rio Muni, et initiées par Francisco J. Malumbres, permettent aujourd'hui une meilleure représentation de l'aire de distribution du sous-genre *Chromaphyosemion*.

L'étude phylogénique comparant des poissons originaires de Guinée Equatoriale à des populations représentatives de 12 espèces déjà connues de *Chromaphyosemion*, suggère l'existence d'une espèce encore non décrite. Les représentants de ce nouveau taxon se distinguent des autres espèces du sous-genre par une combinaison unique de couleurs des nageoires impaires et par d'autres caractères plus mineurs. Cette description s'appuie sur un ensemble de données phénotypiques et génétiques (ADN mitochondrial) qui valident les caractères spécifiques de cette nouvelle espèce.

Mots-clés: Cyprinodontidae; *Chromaphyosemion*, taxonomie, ADN mitochondrial.

1 Floralaan, 51; 1501 Buizingen, Belgique; Tél : 003223749436 - Fax : 003237005628 , email: olivier.legros@belgacom.net

2 Université de Bretagne Occidentale, IUT de Quimper, Département Génie Biologique; 2, rue de l'Université; 29334 Quimper Cedex, France; Tél: 0033298908530 – Fax: 0033298908540, email: zentz@univ-brest.fr

Resumen

La distribución geográfica de muchas especies de Cyprinodontidae presentes en Guinea Ecuatorial sigue siendo relativamente poco conocida. Recientes colecciones ictológicas recogidas al noroeste del Río Muni, e iniciadas por Francisco J. Malumbres, permiten a día de hoy un mayor conocimiento de la distribución del subgénero *Chromaphyosemion*. Un estudio filogenético sugiere la existencia de una especie todavía no descrita a partir de la comparación de los pescados originarios de Guinea Ecuatorial con poblaciones representativas de 12 especies ya conocidas de *Chromaphyosemion*. Los representantes de este nuevo taxón se distinguen de otras especies del subgénero por una combinación única de colores de las aletas impares y por otros caracteres de menor importancia. Esta descripción se apoya en un conjunto de datos fenotípicos y genéticos (ADN mitocondrial) que validan los caracteres específicos de esta nueva especie.

Palabras claves: Cyprinodontidae; *Chromaphyosemion*, taxonomía, ADN mitocondrial.

Introduction

La Guinée Equatoriale est située en Afrique de l'Ouest, entre le Cameroun au Nord et le Gabon au Sud et à l'Ouest. Son territoire comprend une partie continentale appelée Rio Muni (26.000 km²) et un chapelet d'îles volcaniques dont la plus importante est l'île de Bioko (2017 km²).

La plaine littorale du Rio Muni s'étend sur 30 kilomètres de large environ. Elle ne varie que très peu en altitude (de 20 à 50 mètres). Cette région est très similaire aux côtes forestières du Sud du Cameroun et du Nord-Ouest du Gabon.

Le contexte géopolitique de cette région du Golfe de Guinée rend les prospections ichtyologiques peu fréquentes et limite les connaissances de la répartition des différents genres de Cyprinodontidae présents au Rio Muni.

Roman (1971) et Scheel (1974) sont à l'origine des premières récoltes de *Chromaphyosemion* sur des stations géographiquement situées, pour la plupart, à l'Est de Bata. Des descriptions succinctes de patrons de coloration sont rédigées mais un seul document photographique en noir et blanc d'un spécimen conservé est publié (Roman, 1971). Par la suite, en 1985 et 1987, Castelo effectue quelques relevés complémentaires (Huber, 2000).

On attendra les années « 2000 » pour voir apparaître des prospections ichtyologiques de nature plus ambitieuses. En juillet 2000, Malumbres, SanJuan et van Huijgevoort prospectent l'île de Bioko et la partie continentale de la Guinée équatoriale. Ils échantillonnent un certain nombre de populations appartenant à plusieurs genres et sous-genres de Cyprinodontidae. Cette expédition baptisée « GEMHS 2000 » permet la capture de quelques poissons vivants et leurs importations en Europe. A cette occasion, plusieurs populations de *Chromaphyosemion* seront correctement répertoriées géographiquement et diffusées dans le milieu killiphile.

D'autres collectes ichtyologiques suivent: Malumbres et Lora (GEML 2000); Malumbres, Lora et Blanco (GEMLB 2002); Malumbres, Lora, Blanco et Juhl (GEMLBJ 2003)

L'ensemble de ces expéditions permet, à ce jour, de comptabiliser 34 biotopes où l'on note la présence de *Chromaphyosemion* (voir Carte 1). Ces stations se répartissent principalement sur les réseaux hydrographiques des régions voisines de la ville de Bata au Rio Muni. Malheureusement, la plupart des poissons capturés n'ont pu être conservé en vie et de ce fait nous ne disposons que d'une connaissance partielle de la répartition des phénotypes.

Des travaux récents sur la phylogénie du sous-genre *Chromaphyosemion* (Agnès & al, 2006) suggèrent qu'une population originaire du Nord-Ouest du Rio Muni appartient à une espèce encore non décrite.

La présente description constitue le développement logique de cette précédente étude.

Méthodologie

Cette description est basée essentiellement sur des données phénotypiques, morphologiques, méristiques et génétiques.

Analyses méristiques et morphométriques

L'holotype et les paratypes ont tous été déposés au Musée royal de l'Afrique centrale, Tervuren, Belgique (MRAC). Tous ont été collectés vivants par Malumbres, SanJuan et van Huijgevoort en juillet 2000 au Rio Muni et fixés dans l'alcool à 70%.

Les données morphologiques et méristiques ainsi que leurs abréviations sont exprimées selon Huber (2000). Les valeurs des mesures sont arrondies au dixième de millimètre.

Analyse moléculaire et reconstruction phylogénique

Les données génétiques proviennent de séquences partielles d'ADN mitochondrial. On utilise les informations obtenues à partir de fragments originaires de trois gènes différents: 459 pb issues du gène de cytochrome oxydase I (COI), 319 pb non codantes, pouvant comporter des régions hypervariables (D-loop) et 326 pb provenant du gène de l'ARNr-12S. Les données liées aux trois marqueurs sont réunies dans une matrice constituée de 1104 paires de bases alignées.

Les méthodes d'extraction, d'amplification, de séquençage et les techniques de reconstruction phylogénique sont détaillées dans Agnèse & al. (2006).

Notre travail repose sur l'étude de quatre populations originaires des systèmes hydrographiques du *Rio Mbia* et du *Rio Movo Ecucu*, tous deux situés au Nord-Ouest du Rio Muni (voir Carte 1). Les séquences des trois marqueurs, ont été obtenues à partir de tissus provenant à la fois de captures sauvages (GEHMS00/26W et GEHMS00/32W) et d'individus appartenant à des lignées captives d'aquarium (GEHMS00/31, GEHMS00/32 et GEMLBJ03/47). Afin d'affiner les connaissances sur la phylogénie du sous-genre, nous avons également exploité de nouvelles données concernant deux populations de *A. kouamense* (LEC93/24, G02/115) et une population encore non étudiée de *A. splendopleure* (Big Ikange Camp).

Pour cette étude, notre matrice utilise les séquences provenant d'une sélection de populations déjà étudiées (Agnèse & al., 2006) et choisies comme représentatives des 12 autres espèces déjà décrites. Un ensemble de 55 taxons est utilisé (Table 1) pour définir la situation de la nouvelle espèce au sein d'un nouvel arbre consensus. Les données génétiques obtenues pour *Aphyosemion ahli* CLL03/17 (out group) permettent d'enraciner cet arbre.

Toutes les séquences nouvelles, utilisées pour la rédaction de cet article, ont été enregistrées auprès de GenBank. Les références sont les suivantes: *A. malumbresi* GEHMS00/26W (EF063371, EF143417, EF063380); *A. malumbresi* GEHMS00/31 (EF063370, EF143416, EF063379); *A. malumbresi* GEHMS00/32 (EF063368, EF143414, EF063377); GEHMS00/32W (EF063369, EF143415, EF063378); *A. malumbresi* GEMLBJ03/47 (EF063372, EF143418, EF063381); *A. kouamense* LEC93/24 (EF063365, EF143412, EF063374); *A. kouamense* G02/115 (EF063366, EF185305, EF063375); *A. splendopleure* «Big Ikange Camp» (EF063367,

EF143413, EF063376); *A. (Chrom.) species* GEMHS00/35 (EF185308, EF185306); *A. (Chrom.) species* «Oba, 7 km sud Onitsha» NA04/02 (EF185309, EF185307); *A. ahli* CLL03/17, «out group»; (EF063373, EF143419, EF063382).

L'alignement des séquences est réalisé automatiquement à l'aide du logiciel « CLUSTALW » (Thompson & al., 1997), puis affiné manuellement par l'introduction d'insertions ou de délétions (indel ou gap, en langue anglaise) à l'aide du logiciel « BioEdit, v7.0.0 » (Hall, 1999). Cette dernière étape consiste à optimiser l'homologie des 1104 caractères des 55 taxons intégrant la matrice. L'alignement de ce jeu de données est disponible auprès du second auteur.

Le logiciel « ModelGenerator, v0.82 » développé par Keane & al. (2006) est utilisé pour choisir le modèle d'évolution et les paramètres de reconstruction phylogénétique qui s'ajustent le mieux à notre jeu de données. Ce programme compare et hiérarchise toute une gamme de modèles sur la base de tests statistiques probabilistes comme celui du rapport des vraisemblances (L.R.T. pour « Likelihood Ratio Test »; (Huelsenbeck & Crandall, 1997) et sur d'autres critères d'information tels, A.I.C. pour « Akaike Information Criterion »; (Akaike, 1974); et B.I.C. pour « Bayésien Information Criterion ».

Selon « ModelGenerator », le modèle d'évolution « **HKY + I + Γ** » correspond au modèle qui s'ajuste le mieux aux données analysées.

La matrice de substitutions « **HKY** » a été décrite par Hasegawa & al (1985), il s'agit de l'un des Modèles les plus utilisés pour l'étude de séquences nucléotidiques d'origine mitochondriale.

Ce modèle est à 5 paramètres, il intègre des fréquences différentes pour les 4 types de nucléotides (π_A , π_C , π_G et π_T) et considère un paramètre k qui prend en compte le rapport ts/tv au cours de l'évolution [ts est le taux de transitions (A-G et C-T), tv est le taux de transversions (A-C, A-T, T-G et C-G) et $k=ts/tv$]. Compte tenu de l'existence de variations dans les taux de substitution entre les sites, le paramètre « **I** » permet d'exclure de l'analyse les sites qui apparaissent invariables. Ce paramètre représente la proportion de sites invariables.

La distribution gamma « **Γ** » est utilisée pour modéliser le continuum de la variabilité des taux entre sites. Cette loi statistique (Yang, 1993) permet de décrire une large gamme de distributions des taux de substitution par site en introduisant un paramètre de forme « α ». La valeur de ce paramètre est estimée et accessible par le biais des logiciels utilisés.

Une approximation « Γ_c » de la distribution gamma est souvent nécessaire, en la discrétisant en « C » catégories de poids égal. Nous avons attribué 8 catégories à cette grandeur, de façon à obtenir un temps de calcul adapté à notre jeu de donnée.

Pour la construction de la topologie des dendrogrammes, nous avons fait le choix de recourir aux méthodes probabilistes fondées sur le concept de vraisemblance. Deux techniques sont employées : celle du maximum de vraisemblance et celle qui utilise l'approche bayésienne. Généralement, ces deux méthodes sont appliquées avec succès au problème statistique de l'estimation des phylogénies.

Bien que fondées toutes les deux sur la fonction de vraisemblance et utilisant les mêmes modèles d'évolution des séquences, ces deux méthodes diffèrent par le concept de probabilité qu'elles emploient. Ainsi, la méthode du maximum de vraisemblance sélectionne l'arbre qui maximise la vraisemblance (l'arbre ayant la plus forte probabilité d'avoir conduit aux données), alors que l'approche bayésienne assigne une distribution de probabilités *a priori* aux différents arbres et réalise des inférences à partir de la distribution des probabilités *a posteriori* de ces arbres.

La confrontation de la topologie des arbres obtenus par les deux méthodes probabilistes permet d'apprécier la fiabilité des résultats.

Le logiciel « PHYLIP, v2.4.4 » (Guindon & Gascuel, 2003) est utilisé pour l'analyse de notre jeu de données en Maximum de Vraisemblance. Ce logiciel met en oeuvre des propriétés statistiques performantes qui réduisent les temps de calculs pour la sélection des arbres les plus vraisemblables. Pour cette méthode, on réalise une analyse avec Bootstrap comportant 1000 réplicats qui permet d'estimer la robustesse des nœuds de l'arbre consensus (Figure 1).

Cette technique de reconstruction phylogénétique est l'une des plus utilisées à l'heure actuelle dans les domaines de l'évolution.

L'analyse Bayésienne fait appel au logiciel « Mr Bayes, v3.1.2 » (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

La distribution des probabilités postérieures des arbres a été estimée par MC3 «Metropolis Coupling

Markov Chain Monte Carlo ». Les paramètres choisis pour cette analyse sont de 2 millions de générations et la fréquence d'échantillonnage est de 1 sur 100. De manière conservative, les premières générations ont été éliminées (10 %). Cela

signifie que l'algorithme du logiciel va explorer les probabilités des 1.800.000 arbres restant et qu'il va n'en retenir que 1 sur 100. La topologie finale (Figure 2) représente le consensus majoritaire à 50 % de ces 18.000 arbres. Les valeurs indiquées aux différents noeuds représentent les probabilités postérieures que le clade correspondant soit vrai.

La représentation des dendrogrammes est obtenue à l'aide du logiciel « TreeView, v1.6.6 » (Page, 1996).

Référence	Localité	Longitude	Latitude	Espèce
CLL03/17	Pama-Fifinda, Kribi-Edea, km 33 CLL 03/17	03°10,527'N	10°02,115' E	<i>A. ahli</i>
LEC93/26	17,1 km Libreville Cap Esterias LEC 93/26	0°35' N	09°20' E	ALP
ABC05/54	N'koleon ABC 05/54	02°23,480' N	10°02,367'E	LUG
HLM99/28	Afan Essokie HLM 99/28	02° 23 430' N	09° 59,323' E	LUG
ABC05/28	Fenda ABC 05/28	02°49,083' N	10°22,534' E	LUG
Ibadan	47 km nord de Lagos vers Ibadan	± 06°52' N	03°11' E	BIT
Umudike	Umudike	05°31' N	07°25' E	BIT
Kwa	Kwa River Falls Plantation	05°07' N	08°20' E	BIV
Biafra	Biafra			BIV
Funge	Funge	04°45' N	08°54' E	BIV
ABC05/12	Funge ABC 05/12	04°45,508' N	08°54,266' E	BIV
Nkwo97	Nkwo 97/1	04°20' N	10°02' E	RIG
ABC05/18	13 km sud carrefour Edea-Yabassi ABC 05/18	04°22,236' N	10°01,059' E	RIG
C89/18	Bonepoupa-Yabassi km 20 C89/18	04°18,258' N	10°02,582' E	RIG
ABC05/19	Nkouli-Ngnock ABC 05/19	04°10,591' N	10°03,033' E	RIG
LEC93/24	27.8 km NE Kougouleu LEC 93/24	00°25' N	10°04' E	KOU
G02/115	Mvang Ayong G 02/115	00°30,13' N	10°09,11' E	KOU
GEMHS00/31	3km Ouest de Nlosoc GEMHS 00/31	02°07,137' N	09°53,350' E	MAL
GEMLBJ03/47	Route Bata-Niefang, Km 26 GEMLBJ 03/47	01° 52.680' N	09° 57.011' E	MAL
GEMHS00/26W	Bata-Niefang, Km 25 GEMHS 00/26	01°52,391' N	09°55,991' E	MAL
GEMHS00/32W	4 km Nord de Ndyiacom GEMHS 00/32	02°03,358' N	09°55,319' E	MAL
ABC05/58AB	700 m Nord de la rivière Lolabe ABC 05/58	02°41,141' N	09°51,262' E	MEL
ABC0523A	Ouest de Naha ABC 05/23	02°53,092' N	09°58,157' E	MEL

ABC0524AB	Nko along ABC 05/24	02°51,124' N	10°02,005' E	MEL
ABC05/22AB	Ouest de Nagadjo ABC 05/22	02°54,010' N	09°57,053' E	MEL
ABC05/39AB	Ebome ABC 05/39	02°53,576' N	09°54,262' E	MEL
C98/30	Apou C 89/30	03°38' N	10°07' E	LOE
BLLMC05/25	Bidjouka BLLMC05/25	03°07,810' N	10°29,404' E	LOE
CSK95/28	Edea-Yaounde km 18 CSK 95/28	03°49' N	10°15' E	LOE
ABC05/66AB	East of Batombe ABC 05/66	03°48,336' N	10°12,061' E	LOE
C89/31	Edea-Yaounde km 18 C 89/31	03°49' N	10°15' E	LOE
ABC05/49AB	Etonde Fang ABC 05/49	02°25,397' N	09°50,582' E	PUN
ABC05/56AB	Akak ABC 05/56	02°22,334' N	09°57,510' E	PUN
ABC05/50AB	Route de Pondo ABC 05/50	02°22,175' N	09°51,201' E	PUN
ABC05/51AB	Bibabimvoto ABC 05/51	02°21,464' N	09°54,447' E	PUN
ABC05/05AB	7.5 km Est deTiko ABC 05/05	04°07,269' N	09°24,047' E	VOL
ABC 05/08	Mile 29 ABC 05/08	04°15,140' N	09°22,251' E	VOL
CBL01/23	Ekande CBL 01/23	04°08,019' N	09°18,342' E	PLK
ABC05/14ACD	Kumba ABC 05/14	04°39,162' N	09°30,243' E	VOL
ABC05/13	Ekondo Nene ABC 05/13	04°41,237' N	08°57,572' E	VOL
Bimbia	Bimbia Camp	03° 98,25'N	09° 13,474' E	SPP
CBL01/10	Ndog Bong, CBL 01/10	03°44,988' N	09°52,482' E	SPP
CBL01/25	Entrée de Tiko, CBL 01/25	04°05,773' N	09°22,387' E	SPP
Ikange	Big Ikange Camp	04°04' N	09°22' E	SPP
CBL01/11	Benengue CBL 01/11	03°40,551' N	09°47,844' E	SPP
GEMHS00/43	Ile de Bioko, <i>Rio Consul</i> GEMHS 00/43	03°43,682' N	08°46,429' E	SPP
CBL01/15	Sipe, CBL 01/15	03°42,344' N	10°06,408' E	SPP
ABC05/48AB	Afan Essokie II ABC 05/48	02°27,523' N	09°50,288' E	SPP
GEMHS00/35	Nomenam, GEMHS 00/35	01°17,182' N	09°36,130' E	species
Oba	Oba, 7 km sud de Onitsha NA 04/02	± 06°05'	06°48'E	species

Table 1. Référencement des populations de *Chromaphyosemion*.

Codes attribués aux différentes espèces: *ALP*, *A. alpha*; *BIT*, *A. bitaeniatum*; *BIV*, *A. bivittatum*; *KOU*, *A. kouamense*; *LUG*, *A. lugens*; *RIG*, *A. riggenbachi*; *LOE*, *A. loennbergii*; *MEL*, *A. melanogaster*; *MAL*, *A. malumbresi*, *PLK*, *A. poliaki*; *SPP*, *A. splendopleure*, *PUN*, *A. punctulatum*, *VOL*, *A. volcanum*.

Dénominations antérieures

A. (Chrom.) sp. Rio Muni phénotype GEMHS 31 in Legros (1999, p 35).

A. sp. Rio Muni in Agnèse et al. (2006, p 332).

Aphyosemion (Chromaphyosemion) malumbresi n. sp.

Holotype

Un mâle de 21,3 mm de L.S. et de 25,4 mm de L.T. Spécimen récolté dans un ruisseau à 4 km au Nord de Ndyiacom (Ndyiacom II ou San Joachin de Ndyiacom sur certaines cartes espagnoles anciennes), système hydrographique du *Rio Mbia*, Rio Muni, Guinée Equatoriale (coordonnées GPS: N 02°03,358'; E 09°55,319'), altitude 42 mètres, station GEMHS 2000/32; collecteurs: F. Malumbres, J. SanJuàn et G-J. van Huijgevoort, 8 juillet 2000; leg. G-J. van Huijgevoort, juillet 2000.

Holotype déposé au Musée royal de l'Afrique centrale, Tervuren, Belgique (MRAC) sous le numéro MRAC A6-48-P-1.

Paratypes

MRAC A6-48-P-2-4: deux mâles et une femelle, même localité que l'holotype, mêmes collecteurs; leg. G-J. van Huijgevoort juillet 2000.

Les types sont conservés dans l'alcool.

Etymologie

Poisson dédié au Dr. Francisco J. Malumbres (Madrid, Espagne), codécouvreur de l'espèce et initiateur de plusieurs expéditions de collectes ichtyologiques en Guinée Equatoriale.

Diagnose

Espèce présentant toutes les caractéristiques du sous-genre *Chromaphyosemion* Radda, 1971: dorsale insérée légèrement en retrait de l'anale, nageoires impaires à rayons hypertrophiés en acumens; points paradorsaux brillants et patron temporaire de deux bandes latérales sombres.

À l'instar de *A. splendopleure*, la nouvelle espèce semble présenter un phénotype variable. Elle comprend deux morphes, l'une bleue (la localité typique GEMHS 2000/32 et la station GEMHS 2000/31), l'autre brune aux alentours de Bata. À l'heure actuelle, aucun élément d'investigation sur le terrain ne permet de dire s'il existe d'autres morphes intermédiaires ou à coloration variable. L'analyse des données moléculaires regroupe les deux morphes dans un même clade bien défini (voir chapitre «Interprétation des données moléculaires »).

Une diagnose est établie pour chaque patron de coloration :

La morphe bleue se distingue de tous les autres *Chromaphyosemion* décrits excepté *A. (Chrom.) alpha* Huber, 1998 et *A. (Chrom.) loennbergii* (Boulenger, 1903) par la combinaison de la couleur de fond de ses nageoires impaires: dorsale orange vif, caudale et anale bleu blanchâtre.

Le corps est bleuté avec des points rouges bordant chaque écaille: macules chez *A. (Chrom.) bivittatum* (Loennberg, 1895) et *A. (Chrom.) lugens* Amiet, 1991; flancs bleu-gris et lignes de points plus fins chez *A. (Chrom.) kouamense* Legros, 1999; flancs bleus ou vert pâle métallique et macules rouge vif formant des lignes plus irrégulières chez *A. (Chrom.) riggenbachi* (Ahl, 1924); flancs bruns dorés et lignes de points chez *A. (Chrom.) poliaki* Amiet, 1991.

L'anale est bleu blanchâtre ponctuée de rouge en partie, surtout à l'arrière: non ponctuée ou seulement à la base chez *A. (Chrom.) bitaeniatum* (Ahl, 1924), *A. alpha*, *A. volcanum* Radda & Wildekamp, 1977 et *A. (Chrom.) splendopleure* (Brüning, 1929b) - excepté les populations des régions de Likado et de Mboro - et caudale ponctuée de points rouges et quelques courtes flammules sur les bords: nombreuses et longues flammules et macules dans l'anale et la caudale chez *A. loennbergii*, sans flammules chez *A. (Chrom.) punctulatum* (Legros, Zentz & Agnèse, 2005); fond de toutes les nageoires impaires jaune vert chez *A. (Chrom.) melanogaster* (Legros, Zentz & Agnèse, 2005).

La morphe brune se distingue de la **morphe bleue** par un corps de couleur brunâtre et des nageoires impaires à dominante orangée ou brune sur fond bleuté. L'anale et la caudale sont densément ponctuées, présence de flammules dans le lobes supérieur de la caudale: corps moins brunâtre et nageoires entièrement ponctuée chez *A. punctulatum*, nageoires flammulées à fond bleu ciel chez *A. loennbergii*, corps bleu-gris et anale moins orangée et moins ponctuée chez *A. kouamense*.

Coloration en vie

Mâle

Morphe bleue

La coloration du corps est délimitée longitudinalement en trois parties. La région dorsale est brun foncé avec deux rangées d'écailles paradorsales d'un orange brillant. La partie médiane, blanc bleuâtre, est parcourue de lignes de points rouges. Ces points bordent toutes les écailles du corps mais sont plus visibles sur les flancs, plus clairs. La partie inférieure est dominée par une bande latérale noire quasi-visible en permanence. Celle-ci occupe une large partie de la région ventrale, des pectorales jusqu'à la fin du pédoncule caudal.

Gorge et région ventrale bleuâtres avec bords des opercules noir foncé. Les taches operculaires et post-operculaires sont peu marquées.

L'anale, sur fond bleu blanchâtre et zone médiane jaune orange, est ponctuée de points rouges surtout dans sa partie postérieure. Une rangée de traits verticaux rouges souligne l'insertion de cette nageoire avec le corps. Une fine bande submarginale rouge avec une bande marginale peu visible la borde mais est absente chez certains individus.

La dorsale, sur fond orange, est densément maculée de points rouges foncés dans la partie inférieure. La zone orangée n'atteint pas le bord de la nageoire mais est remplacée par une zone jaune verdâtre. Quelques flammules sont présentes entre les rayons les plus longs.

La caudale, bleu blanchâtre, est ponctuée de points rouges dans la partie médiane. Des flammules assez courtes la bordent. Une bande submarginale rouge nette est présente dans le lobe inférieur. Bande marginale bleue.

Les acumens des nageoires impaires, peu développés, sont orange.

Les pelviennes sont bleu blanchâtre avec une zone jaune-vert dans la partie médiane. Submarginale rouge très peu marquée, voire absente. Pectorales translucides jaune-vert.



A. malumbresi n. sp. Ndyiacom GEMHS 2000/32, localité typique, m le non préservé.
Photo: Alf Persson



A. malumbresi n. sp Ndyiacom GEMHS 2000/32. Holotype MRAC A6-48-P-1 en haut,
Paratypes MRAC A6-48-P- 2-4 en bas. Photo: O. Legros

Les spécimens récoltés à 3 kilomètres à l'Est de Nlosoc (GEMHS 2000/31) présentent les différences de coloration suivante:

Partie antérieure du corps à reflets jaune doré. Anale ponctuée à fond bleu avec une zone orange en son milieu et une ligne noire constituée de courtes flammules à son insertion. Absence de submarginale nette sur cette nageoire, remplacée par une ligne de flammules, bande marginale bleue. Couleur de fond de la dorsale d'un orange moins prononcé, bord bleu-vert. Tous les acumens des nageoires sont oranges.

Morphe brune

Les mâles de Ncomedyi (station GEMHS-2000/25), dont le phénotype avait été décrit in Legros (2000), et de Machinda (station GEMLBJ-2003/47) ont un dos brun, des flancs bruns à reflets légèrement bleu irisé, un ventre brun orange et une région sous-pédonculaire noire.

Les bandes latérales sont peu visibles. La caudale est orange avec une ponctuation dense et un lobe supérieur flammé. Des bandes submarginale rouge et marginale bleue soulignent le lobe inférieur. L'anale est orange avec une zone bleue, ponctuée densément de petites macules, la bande submarginale est rouge et composée de flammules avec une bande marginale bleue. La dorsale est brun-orange avec des acumens orange.

Femelle

Des lignes de points rouges bordent chaque écaille mais elles sont moins visibles dans la partie dorsale, brune. Le ventre est de teinte blanc cassé, plus vif entre le museau et la partie antérieure de l'anale.

Les bandes latérales noires sont bien visibles. La bande latérale inférieure est nettement plus large que la supérieure et borde l'entièreté du ventre.

L'anale, non ponctuée, est translucide avec quelques reflets bleu-vert à l'avant et sur le bord. La caudale est translucide avec un bord inférieur légèrement orangé. Quelques points marrons sont présents à l'insertion du pédoncule caudal.

La dorsale est parsemée de points marrons sur fond orange assez vif par rapport aux autres femelles de *Chromaphyosemion*.

Les pectorales et les pelviennes sont translucides.

Coloration en alcool des types

Mâle

Le dos est brun clair. La partie médiane du corps est beige. La ligne latérale inférieure est visible, brun léger et laisse bien en évidence le ventre de couleur beige.

Deux lignes de points rouges parcourent le dos jusqu'à l'insertion de la caudale. La cicatrice post-operculaire formée de deux ou trois points plus vifs se prolonge ensuite par une ligne de points rouges jusqu'à hauteur du début de la dorsale. Cette ligne s'interrompt et ne réapparaît que dans le pédoncule caudal par deux ou trois points.

La partie inférieure du corps est marquée par deux lignes de points rouges jusqu'à l'insertion de la caudale.

Les nageoires impaires sont blanchâtres. L'anale présente une pigmentation de très fins points noirs sur toute sa surface. Pas de bande submarginale visible.

La dorsale est parsemée de quelques macules rouge carmin. La dorsale ne montre aucune présence de macules ou de flammules.

Femelle

L'ensemble du corps est brun clair avec le ventre blanc. Cinq lignes de points rouges vifs parcourent le corps de la cicatrice operculaire au pédoncule caudal. La tête est brun plus foncé que le reste du corps. Quelques macules brunes présentes dans la dorsale. Caudale légèrement noirâtre. Anale, pelviennes et pectorales translucides.

Données morphométriques des types

Les mesures sont présentées en pourcentages de la longueur standard (LS en mm); holotype en premier et en gras.

Sexe: **mâle**, mâle, mâle, femelle.

D : **9**, 9, 10, 11 (Moy: 9,75; Ety: 0,96).

A : **12**, 15, 14, 11 (Moy: 13; Ety: 1,83).

D/A : **+1**, +2, +0, +0 (Moy: 0,75; Ety: 0,96).

L.L.: **26 + 2**, 27 + 2, 25 + 2, 25 + 2 (Moy: 25,75 (+2); Ety: 0,96 (+0)).

pDor: **15**, 15, 14, 13 (Moy: 14,25; Ety: 0,96).

TRAV: **9**, 9, 9, 8 (Moy: 8,75; Ety: 0,50).

L.S.(en mm): **21,3**; 19,2; 17,7; 17,6 (Moy: 18,95; Ety: 1,73).

L.T.(en % de L.S.) : **120**, 122, 123, 114 (Moy: 119,75; Ety: 4,03).

P.D. (%) : **59**, 57, 56, 57 (Moy: 57,25; Ety: 1,26).

P.A (%) : **60**, 51, 56, 57 (Moy: 56; Ety: 3,74).
P.V.(%) : **46**, 41, 46, 45 (Moy: 44,50; Ety: 2,38).
Hauteur niv. anale (%) : **16**, 14, 14, 17 (Moy: 15,25; Ety: 1,50).
Hauteur niveau pédoncule (%) : **12**, 10, 12, 11 (Moy: 11,25; Ety: 0,96).
Longueur tête (%) : **33**, 30, 29, 29 (Moy: 30,25; Ety: 1,89).
Interorbitaire (%) : **11**, 11, 11, 10 (Moy: 10,75; Ety: 0,50).
Diamètre oeil (%) : **7**, 9, 7, 7 (Moy: 7,50; Ety: 1,00).

L'écaillure frontale est de type G et les neuromastes frontaux sont ouverts.

Distribution géographique

Les spécimens étudiés, proviennent de stations localisées sur la zone côtière du nord-ouest de la Guinée Equatoriale continentale. Les quatre stations sont probablement situées sur des sols sédimentaires.

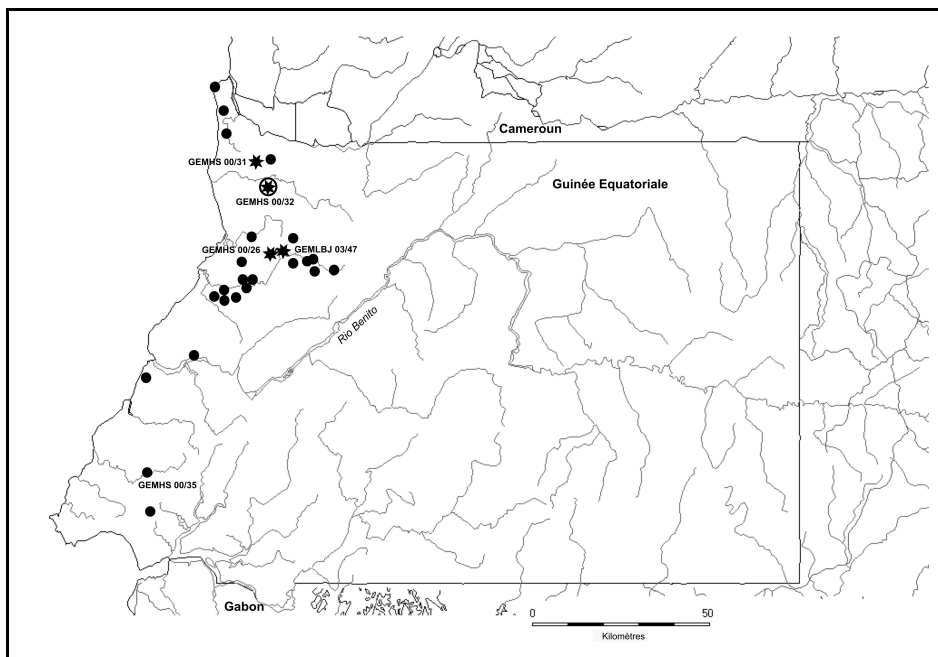
La localité typique (morphe bleu) se situe sur la rive gauche du *Rio Mbia*, tandis que la station à 3 kilomètres à l'est de Nlosoc (GEMHS 2000/31; coordonnées GPS 02°07,137 N; 09°53,350 E) est sur la rive droite. Les deux biotopes sont distants d'environ 8 kilomètres.

Les deux autres stations, plus au sud, (GEMHS 2000/26 et GEMLBJ 2003/47, morphe brune) se trouvent dans le bassin hydrographique du *Rio Movo Ecucu*, à l'est de Bata vers Niefang. Elles sont proches l'une de l'autre, d'environ 2 kilomètres.

La distance séparant les stations les plus éloignées ne dépassent pas une trentaine de kilomètres.

Le relevé des stations connues de *Chromaphyosemion* au Rio Muni figure sur la carte 1. Il est possible que l'aire de répartition de cette nouvelle espèce s'étende plus au nord, plus à l'est et peut-être jusqu'au *Rio Benito*. Cependant, comme spécifié dans l'introduction, des informations sont manquantes pour établir avec certitude l'appartenance de ces points de collecte à l'espèce étudiée.

A l'instar du Cameroun, il est également possible que deux espèces de *Chromaphyosemion* se succèdent de la côte vers l'intérieur des terres, dans un même réseau hydrographique. Il est donc important de ne pas négliger la prospection vers l'Est en direction du plateau.



Carte 1. Localités connues du sous-genre *Chromaphyosemion* en Guinée Equatoriale.

* *A. malumbresi* n. sp. (localité typique entourée); ● autres stations répertoriées de *Chromaphyosemion* (parfois, plusieurs points de collecte proches par symbole). Ces stations, dont les spécimens n'ont pas été étudiés, pourraient faire partie de la répartition de la nouvelle espèce ou d'autres espèces méconnues. Les stations codées ont fait l'objet d'analyses moléculaires.

La distribution des localités a été conçue avec DIVA-GIS 5.4 (Hijmans et al., 2001), les fichiers GIS ont été obtenus sur les serveur de DIVA-GIS (<http://www.diva-gis.org/Data.htm>) et du Programme régional pour l'environnement en Afrique centrale (CARPE) (<http://carpe.umd.edu/>). Source des stations: Legros, 2000 et <http://home.scarlet.be/chromaphyosemion>.

Comparaison des données phénotypiques, morphométriques et moléculaires avec les autres espèces du sous-genre Chromaphyosemion

Comparaison des données phénotypiques

L'espèce la plus proche, de par sa coloration, est *A. melanogaster*, originaire de l'Est et du Sud de Kribi, Cameroun. *A. malumbresi* n. sp. partage avec elle une large bande latérale inférieure noire qui s'élargit très fortement et augmente en intensité lorsque la bande latérale supérieure disparaît. Chez la nouvelle espèce, cette bande ne couvre pas complètement le ventre. Cependant, *A. melanogaster* se distingue par des nageoires impaires à fond jaune-vert et un corps de couleur plus ou moins verdâtre (bleuâtre chez *A. malumbresi* n. sp.).

Ces deux espèces sont séparées géographiquement par d'autres *Chromaphyosemion*:

- Sur la côte camerounaise de Kribi à Campo, par *A. splendopleure* en répartition fractionnée (Agnèse & al., 2006). Cette espèce variable est représentée ici par des spécimens à anale à dominante orange finement ponctuée ou non ponctuée;
- Au Nord, au Sud-Est et à l'Est de Campo par *A. punctulatum*, à nageoires impaires totalement ponctuées;
- A l'Est de Campo, à partir de Afan Essokie par *A. lugens*, au corps et aux nageoires maculés de noir.

A. loennbergii présente également le même type de coloration sur les nageoires impaires. Cependant, la zone orangée dans l'anale est beaucoup plus étendue. L'anale et la caudale sont parcourues de longues flammules rouge vif. Les bandes submaginales sont irrégulières, formées de flammules et beaucoup plus visibles. Les acumens sont beaucoup plus développés. Le corps est à dominante orange et à reflets bleus à mauves (vs bleuâtres chez la nouvelle espèce).

A. punctulatum présente le même type de patron que la morphe brune mais il peut être aisément séparé par ses nageoires sans zone orangée et entièrement ponctuées.

Plus au Sud, à partir du *Rio Benito*, quatre stations sont connues, mais on sait peu de chose sur ces poissons à dominante brunâtre (Legros, 2000). Les spécimens d'une station (GEMHS 2000/35 ont été séquencés en partie (voir chapitre « Interprétation des données moléculaires »)

Au Gabon, deux espèces gabonaises (*A. alpha* et *A. kouamense*) ont des répartitions connues très restreintes. Seul, *A. alpha* présente avec *A. malumbresi* n. sp. une dorsale orangée, une caudale et une anale bleues. Cependant *A. alpha* présente une anale non ponctuée, une dorsale moins orangée et une cicatrice post-operculaire en forme d' "α" très caractéristique.

A. kouamense présente quelques similitudes avec la morphe brune de *A. malumbresi* n. sp. mais le corps est de couleur bleu-gris, les nageoires sont plus flammulées et l'anale et la caudale ont un fond de couleur différente (brun orange sur fond bleu sur toutes les nageoires impaires de la morphe brune).

Comparaison des données méristiques et morphométriques

D'après Scheel (1968) et repris par Amiet (1987 et 1991), les valeurs méristiques et morphologiques permettent de séparer les sous-genres ou les groupes d'espèces mais sont inadéquates pour séparer les espèces d'un même groupe.

A. malumbresi partage avec *A. bitaeniatum* et *A. punctulatum* un nombre peu élevé de rayons dans la nageoire dorsale (deux exemplaires avec neuf rayons). Ceci mérite d'être vérifié sur un échantillonnage plus conséquent.

La comparaison des données méristiques et morphométriques entre les espèces génétiquement les plus proches (*A. malumbresi*, *A. kouamense*, *A. melanogaster*) n'a pas révélé de différences significatives.

Des valeurs plus faibles sont obtenues chez *A. malumbresi* n. sp. pour les mesures PD, PV, PA, et hauteur au niveau de l'anale par rapport aux deux autres espèces (comparaison par rapport aux mesures publiées dans les descriptions originales). Cependant, il faut tenir compte du fait que les types de *A. malumbresi* n. sp. sont très jeunes. Des comparaisons sur des échantillons plus importants seraient souhaitables.

Interprétation des données moléculaires

Le sous-genre *Chromaphyosemion* a la caractéristique d'être constitué d'un ensemble d'espèces relativement isomorphes ayant un dimorphisme sexuel marqué. Les différentes espèces sont réparties sur les plaines côtières du Golfe de Guinée, du Togo au Gabon. De nombreuses populations sont parfois difficilement identifiables par des analyses classiques, basées sur la morphométrie et l'étude de leur phénotype (patron de coloration).

Les données moléculaires apportent souvent des informations déterminantes pour interpréter la phylogénèse des populations encore mal identifiées. Certaines espèces peuvent même présenter, de part leur biologie, un haut degré d'isolement génétique entre leurs populations. Par exemple, les représentants

des espèces *A. bivittatum* et *A. riggenbachi* montrent une grande variabilité de leur caryotype en fonction de leur répartition géographique (Scheel, 1990; Völker & al., 2006).

Les deux arbres obtenus par maximum de vraisemblance (Figure 1) et inférence Bayésienne (Figure 2) ont des topologies très semblables, tous les branchements sont identiques, à l'exception de ceux qui se trouvent en position basale, proches de la racine (*A. ahli* CLL03/17). On observe une irrésolution des noeuds profonds au niveau des clades correspondants aux espèces : *A. alpha* (Gabon), *A. lugens* (sud-Cameroun) et *A. bitaeniatum* (large aire de répartition située à l'ouest de la *Cross River*). Ces trois espèces se présentent comme étant porteuses du plus grand nombre de caractères ancestraux du sous-genre *Chromaphyosemion* qui est clairement monophylétique. On retiendra que de nombreux naturalistes considèrent la *Cross River* comme une zone de transition (ou comme une «frontière écologique») pour la répartition de nombreuses espèces végétales et animales.

Notre jeu de données possède un très fort rapport transitions/transversions ($k = 11.138$), propre aux gènes mitochondriaux, et une très faible valeur du paramètre de forme ($\alpha = 0.207$) de la distribution gamma « Γ », indiquant la très forte hétérogénéité des taux de substitution entre sites pour l'ensemble des trois marqueurs utilisés (COI, D-loop, ARNr-12S). On notera que ces gènes ont probablement eu des évolutions distinctes. Nous avons fait le choix d'ajouter les informations apportées par les trois différents marqueurs moléculaires afin d'établir par analyse combinée, les deux constructions phylogénétiques représentées par les Figures 1 et 2.

Les valeurs de bootstrap (vb) et de probabilités postérieures (pp) des clades indiquent des noeuds diversement soutenus.

Les clades qui intègrent les populations des espèces antérieurement décrites sont dans l'ensemble relativement bien définis. On retrouvera dans Agnese & al. (2006), un arbre consensus regroupant de très nombreuses populations affiliées aux 12 espèces de *Chromaphyosemion* reconnues ainsi que l'analyse des dendrogrammes obtenus par différentes méthodes (distances, maximum de vraisemblance, maximum de parcimonie et inférence Bayésienne.).

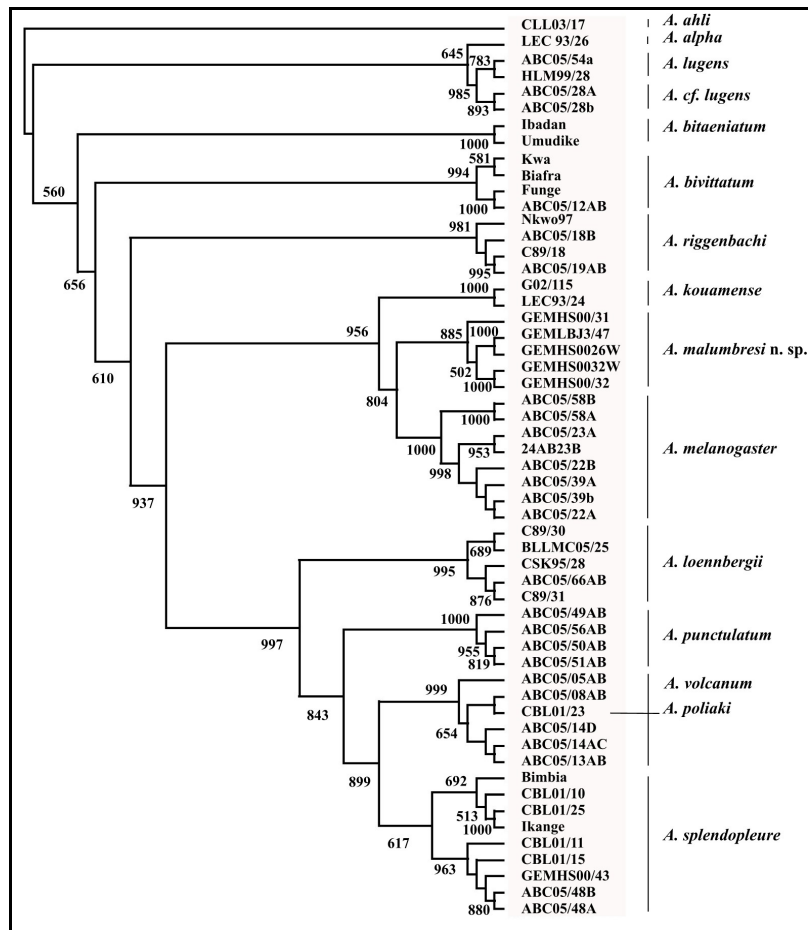


Figure 1. Analyse phylogénétique par Maximum de Vraisemblance de l'ADNmt (1104 pb: COI, Dloop, ARNr12s) obtenue pour 54 taxons de *Chromaphyosemion*.

Modèle d'évolution: **HKY + I + Γ_8** . Paramètres de reconstruction phylogénétique: **lnL= -5234.96724**, **$\alpha=0.207$** , **I=0.215**, **ts/tv=11.138**. Fréquences des nucléotides: **$\pi_A=0.29515$** , **$\pi_C=0.22151$** , **$\pi_G=0.17000$** , **$\pi_T=0.31334$** .

Les grandeurs indiquées aux nœuds de chaque clade représentent les valeurs de bootstrap (vb) obtenues après 1000 réplifications. Les valeurs non significatives ne sont pas retranscrites.

Les références des 55 taxons étudiés sont regroupées dans la table 1.

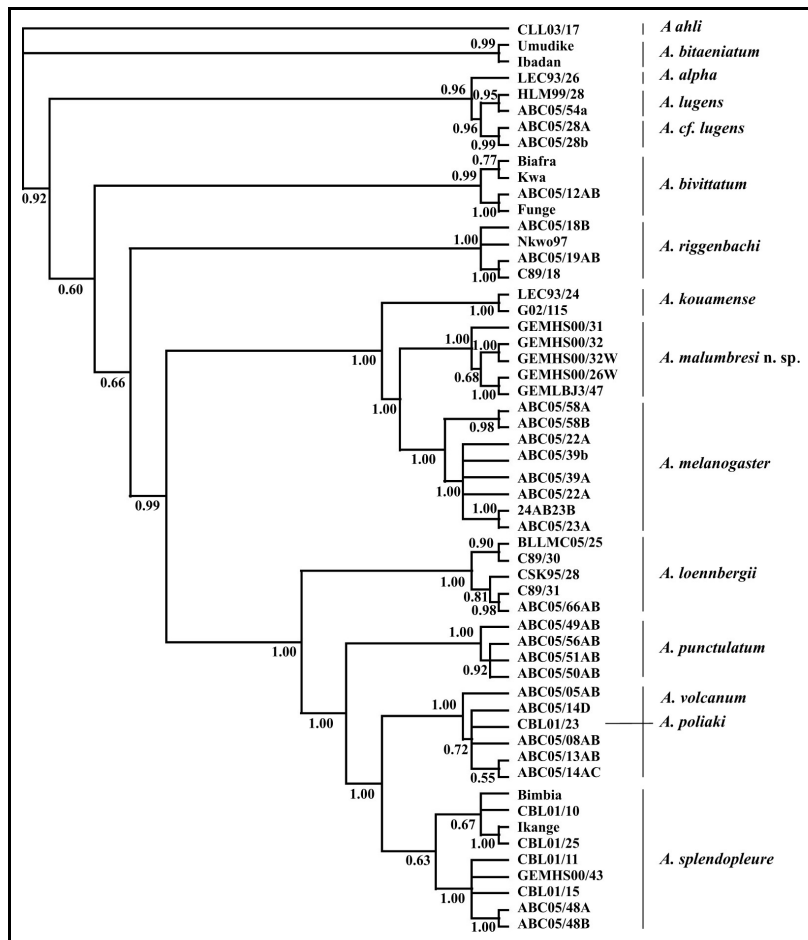


Figure 2. Analyse phylogénétique par inférence Bayésienne de l'ADNmt (1104 pb: COI, Dloop, ARNr12s) obtenue pour 54 taxons de *Chromaphyosemion*. Consensus majoritaire à 50% des arbres échantillonnés. Valeurs de vraisemblances (moyenne arithmétique : -5296.68, moyenne harmonique : -5397.70)

Modèle d'évolution: **HKY + I + Γ_8** .

Les valeurs aux nœuds indiquent les probabilités postérieures (pp) des clades correspondants. Les valeurs non significatives ne sont pas retranscrites.

Les références des 55 taxons sont regroupées dans la table 1.

Les cinq taxons (GEHMS00/31, 32, 32W, 26W et GEMLBJ03/47) représentant la nouvelle espèce *A. malumbresi*, constituent un cluster bien résolu (vb=804, pp=1.00). Cet ensemble se présente comme le groupe frère de deux autres unités également bien définies (vb=1000, pp=1.00 et vb=958, pp=1.00), respectivement attribuées aux espèces *A. melanogaster* (Cameroun; ABC05/22A, 22B, 23A, 23B, 39A, 39B, 58A et 58B) et *A. kouamense* (Gabon; G02/115 et LEC93/24).

La phylogénèse du groupe (*kouamense-melanogaster-malumbresi*) est également bien soutenue (vb=937, pp=0.99). Ce cluster est encadré par deux clades correspondant aux espèces *A. riggenbachi* (Cameroun; Nkwo97, ABC05/18B, 19AB et C89/18) et *A. loennbergii* (Cameroun; C89/30, 31, CSK95/28, BLLMC05/25 et ABC05/66AB).

Les Figures 1 et 2 représentent la phylogénèse du sous-genre *Chromaphyosemion* dans l'état des données actuellement disponibles. Signalons également qu'une population de coloration brune, située au sud du *Rio Benito* (GEMHS00/35) s'inscrit également dans le cluster (*kouamense-melanogaster-malumbresi*). Malheureusement, des données incomplètes (D-loop, non présente dans la matrice) ne nous ont pas autorisé à présenter cette population au sein de notre reconstruction phylogénétique. Il en est de même pour un *Chromaphyosemion* originaire du Nigéria (station de Oba, 7km au sud de Onitsha, NA 04/02). La phylogénèse de cette population indique clairement que ce poisson n'appartient pas au cluster (*splendopleure-volcanum*). Il est hautement probable qu'il s'agisse d'une espèce inédite, distinctement proche de *A. bivittatum* et de *A. bitaeniatum*. Le statut mal défini de *A. bitaeniatum* dont les types proviennent d'une localité imprécise (« Niger », soit fleuve *Niger*, Sud Nigéria) ne nous permet pas de décrire cette espèce. Des vérifications morphométriques et phylogénétiques préalables sont souhaitables afin de vérifier la validité des taxons *A. bitaeniatum* (Ahl, 1924) et *A. multicolor* (Brüning, 1929a).

Les clusters, représentant chaque espèce, ne correspondent pas toujours à une aire de répartition géographique clairement définie et homogène, ceci est particulièrement vrai pour la répartition des populations de *A. splendopleure*. Cette espèce se caractérise par une grande variabilité du patron de coloration dont de nombreux phénotypes sont localisés du Mont Cameroun (l'île de Bioko, proche du littoral, appartient au même ensemble volcanique) jusqu'à l'extrémité du sud Cameroun sur toute une mosaïque de territoires côtiers.

L'observation de plusieurs patrons de coloration au sein d'une espèce, peut être attribuée à une probable endogamie liée à la biologie des *Chromaphyosemion*, conséquence de la séparation physique des biotopes qu'ils colonisent.

L'ensemble du sous-genre mériterait d'être sujet à de nouveaux travaux d'investigation en utilisant d'autres marqueurs génétiques. Cela permettrait peut être, de mieux comprendre les relations complexes entre l'évolution des *Chromaphyosemion* (isolement des populations puis recolonisation des milieux) et la fragmentation des forêts sempervirentes, apparue au cours des aléas climatiques du Quaternaire. En effet, les distributions actuelles de nombreuses espèces forestières, animales et végétales, reflètent encore les restrictions d'habitat imposées lors de la dernière séquence glaciaire. Selon les données actuelles (pollens ou macrofossiles végétaux), on suppose que la formation des zones de refuges forestiers s'est produite aux environs de -18000 ans, pendant une période très aride du climat. Cette fragmentation des écosystèmes, principalement localisés au Cameroun, Guinée Equatoriale et Gabon, est à l'origine de la grande richesse de la biodiversité de l'ensemble de cette région. Quelques auteurs proposent une cartographie détaillée de ces zones refuges situées en Afrique Occidentale et Centrale (Hamilton & Taylor 1991, Lévêque 1997, Maley 1991, Sayer & al, 1992).

L'expansion des espaces forestiers, aux environs de -16000 ans, a généré des schémas évolutifs et des stratégies de conservation des ressources génétiques difficiles à établir et à comprendre. Il est hautement probable qu'à cette époque les îlots forestiers relictuels furent tout d'abord des refuges de biodiversité et d'endémisme, puis des foyers de peuplement pour de nombreuses espèces (Hamilton, 1981).

Concernant la Guinée Equatoriale, Guinea (1946) distinguait quatre formations forestières à Mbini: «la première, dans le bassin de l'*Utamboni* et le couloir d'*Evinayong-Acurenam-Nsoc*, à affinités floristiques avec les forêts du Gabon; la seconde, dans le couloir du Rio *Ntem-Ebbiyin*, ressemble aux forêts de la côte du Cameroun; la troisième, au nord-est, dans le bassin de Bimville et d'Abia, est une formation marécageuse; la quatrième est constituée des forêts côtières situées entre Utonde, Punta Mbonda et Pemba». Cette citation suscite l'envie de mieux comprendre les mécanismes historiques et contemporains qui sont à l'origine de la biodiversité de cette région. Les *Chromaphyosemion* pourraient être considérés comme des marqueurs biogéographiques intéressants. Dans cette hypothèse, leur phylogénie constituerait un des moyens d'identifier les mouvements de fragmentation et de dispersion de leurs habitats, liés aux

événements du Quaternaire supérieur. Ainsi, une meilleure connaissance de la distribution géographique des trois espèces, *A. kouamense* (Gabon), *A. melanogaster* (Cameroun) et *A. malumbresi* (Guinée Equatoriale), permettrait de mieux appréhender les relations complexes entre les contraintes climatiques et l'histoire de l'évolution des espèces végétales et animales, inféodées à la forêt guinéo-congolaise.

Remerciements

Nous exprimons toute notre gratitude envers Jean-François Agnès et Claudine Mongelard (Montpellier, France), Daniel Sellos et Samuel Iglésias (Concarneau, France) sans lesquels cette description n'aurait pas pu voir le jour.

Nous remercions la Station de Biologie marine de Concarneau (M.N.H.N.) pour son support scientifique, Jérôme Crossouard (Quimper, France) pour son aide technique, et Oscar Martinez (Madrid, Espagne) pour la version espagnole du résumé.

Tous nos remerciements vont aussi à Geert-Jan van Huijgevoort (Tilburg, Pays-Bas) qui nous a très aimablement cédé les exemplaires sauvages nécessaires à cette étude lors de son retour de collecte de Guinée Equatoriale en juillet 2000.

Nous remercions également Alf Persson (Annelöv, Suède) pour sa collaboration à l'illustration photographique de cette publication et les killiphiles qui nous ont permis de collecter et d'élever les espèces nécessaires à cette étude.

Références citées

- Agnese J.-F., Zentz F., Legros O. & Sellos D., (2006).** Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 332–346.
- Ahl E., (1924).** Neue afrikanische Zahnkarpfen aus dem zoologischen Museum Berlin. - *Zool. Anz.*, 61 (3-4): 135-145.
- Akaike H., (1974).** A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.*, AC-19: 716-723.
- Amiet J. L., (1991).** - Diagnoses de deux espèces nouvelles d' *Aphyosemion* du Cameroun (Teleostei: Aplocheilidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 2: 83-95.
- Amiet J.L., (1987).** Faune du Cameroun. 2 - Le genre *Aphyosemion* Myers. *Sciences Nat, Compiègne*, 262 p., 60 pls.
- Boulenger G.A., (1903).** Description of new freshwater fishes from southern Cameroon. *Annals and magazine of Natural History*, (7) 12 (70): 440-441
- Brüning C., (1929a).** *Wochenschrift Aquar.-Terr.*, 26 (24) 372.
- Brüning C., (1929b).** Der grüne Leuchtaugenfisch und der afrikanische Glanzkärpfling. *Wochenschrift für Aquarien und Terrarienkunde*, 26 (33): 356.
- Guindon S. & Gascuel O., (2003).** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.*, 52 : 696-704.
- Guinea, E., (1946).** Ensayo geobotánico de la Guinea Ecuatorial. *Instituto de estudios Africanos, Consejo superior de investigaciones científicas*, Madrid.
- Hall T.A., (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hamilton, A. C., (1981).** The Quaternary history of African forests: its relevance to conservation. *African journal of ecology* 19:1-6.
- Hamilton, A.C. & Taylor D., (1991):** History of climate and forests in tropical Africa during the last Million years. - *Climate Change*, 19: 65-78.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.A., (1985).** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22: 160–174.
- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E (2001).** Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genet Resour News* 127: 15–19.

- Huber J.-H., (1998).** *Aphyosemion alpha* n. sp. - Eine neue Art der Untergattung *Chromaphyosemion* mit einem ausgeprägten Färbungsmuster und einer besonders südlichen Verbreitung. - *Das Aquarium*, 350: 15-23.
- Huber J.-H., (2000).** Killi-Data 2000. Liste actualisée des noms taxonomiques, des localités de pêche et des références bibliographiques des Poissons Cyprinodontes ovipares (Atherinomorpha, Pisces), *Soc. Fr. d'Ichtyologie, Paris*, 538 p
- Huelsenbeck J.P. & Crandall K.A., (1997).** Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 28 : 437-466.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F., (2001).** “Mrbayes”: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 : 754-755.
- Keane T. M., Creevey C. J., Pentony M. M., Naughton T. J. & McInerney J. O., (2006).** Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified, *BMC Evolutionary Biology*, 6:29
- Legros O., (1999).** *Aphyosemion kouamense* n. sp., ein neues *Chromaphyosemion* (Teleostei: Aplocheilidae) vom Rand der Monts de Cristal im Nordwesten Gabuns. *DKG-Journal*, 31(2), 32-40.
- Legros O., (2000).** La distribution géographique du sous-genre *Chromaphyosemion* au sud du Cameroun, en Guinée Equatoriale (Rio Muni et île de Bioko) et au Gabon. *AKFB, Killi-Contact*, 3-4, 5-45.
- Legros O., Zentz F. & Agnèse J-F., (2005).** Description de deux nouveaux *Chromaphyosemion* (Teleostei: Aplocheilidae) du sud de la plaine littorale camerounaise. *AKFB, Killi-Contact*, 33, 3-30.
- Lévêque, C., (1997).** Biodiversity dynamics and conservation. The freshwater fish of tropical Africa. - Cambridge University Press, Cambridge.
- Lönnberg E., (1895).** Notes on fishes collected in the Cameroons by Dr. Y. Sjöstedt. *Öfversigt Svenska. Vetenskaps Akademiens Förhandlingar*, 3: 190-191
- Maley J., (1991).** The African rain forest vegetation and paleoenvironments during late Quaternary. - *Climatic Change* 19:79-98.
- Page R. D. M., (1996).** TreeView : an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp.Appli. Biosci.*, 12 :357-358
- Radda A. C. , (1971).** Cyprinodontidenstudien im südlichen Kamerun; 2, Das Tiefland der Küste, *Aquaria* 8: 109-121,

- Radda A. C. & Wildekamp R. H. , (1977).** Die *A. bivittatum*-superspezies, *DKG-J.*, 9,9, pp 133-141.
- Roman B., (1971).** Peces de Rio Muni, Guinea Ecuatorial (Aguas dulces y salobres) *Fondacio la Salle de Ciencias Naturales*, Barcelona, Spain, 296 pp.
- Sayer. J. A., Harcourt C. S. & Collins N. M., (1992).** The Conservation Atlas of Tropical Forests. Africa. - Macmillan, London.
- Scheel J. J., (1968).** Rivulins of the Old World. *Tropical Fish Hobbyist Publication*, New Jersey . 480 pp.
- Scheel J. J., (1974).** Rivulines Studies, *Ann. Mus. Royal Afrique Centrale, Tervuren, ser IN-8-Sc. Zool.*, (211): 47-98, 150 p.
- Scheel J. J., (1990).** Atlas of Killifishes of The Old World, *TFH publ.*, 448p.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D. G., (1997).** The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25 (24): 4876-4882.
- Völker M., Sonnenberg R., Ráb P. & Kullmann, H., (2006).** Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae). II: Cytogenetic and mitochondrial DNA analyses demonstrate karyotype differentiation and its evolutionary direction in *C. riggenbachi*. *Cytogenet Genome Res.*, 115 (1):70-83.
- Yang Z., (1993).** Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol. Biol. Evol.*, 10 : 1396-1401.

Publié le 28 décembre 2006. © Association Killiphile Francophone de Belgique.

