



DKG Arbeitsgemeinschaft Chromaphyosemion
Rundschreiben Mai / 2006

Liebe Freunde der AG - Chromaphyosemion !

In wenigen Tagen (25.05.bis 27.05.2006) veranstalten wir unsere 36. Leistungsschau der DKG in Plochingen / Stuttgart. Am Donnerstag geht es gleich los mit einem neuen Vortrag über Chromaphyosemion: 20.00 Uhr im Albvereinsraum „ Chromaphyosemion- kleine Farbwunder aus Westafrika „, Ich hoffe, dass ich dort schon einige Mitglieder begrüßen kann. Wohnen werde ich im Stadthotel Princess. Die Arbeitsgruppentreffen sind in diesem Jahr vom Veranstalter am Samstag 27. Mai von 15.30 bis 18.30 Uhr geplant. Treffpunkt und Uhrzeit sind dem Aushang an der Infotafel zu entnehmen.

Tagungsordnung:

Tagungsordnung:

1. Portokasse
2. Artenbestandsliste
3. Verschiedenes
4. Chromaphyosemion- Arten nach DNA - Untersuchungen

Diesmal werde ich nur mein Notebook mitnehmen. Je nach Räumlichkeit werde ich versuchen einen Beamer zu bekommen. Ich hoffe, dass wir, wie die Jahre zuvor, ein ruhiges Plätzchen finden, um den Erfahrungsaustausch über Chromaphyosemion abzuhalten. Es wäre erfreulich, wenn ihr durch digitale Bilder den Vortrag ergänzen könntet.

Ende März überließ mir Jean-François Agnès sein **Manuscript:**

[„Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* \(Radda, 1971\) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences.“ \(PDF\)](#)

Er gab mir die Erlaubnis, den Text Anfang April in der AG- Chromaphyosemion zu veröffentlichen. Ich verschickte es an alle Mitglieder mit einem eMail- Anschluss. Innerhalb von einigen Tagen übertrug mir dann Dr. Werner Neumann den englischen Text bis auf einige Textabschnitte ins Deutsche, so dass ich die Übersetzung dem Rundschreiben beifügen kann.

[„Phylogenetische Verwandtschaft und Phylogeographie der Killifisch Arten der Untergattung *Chromaphyosemion* \(Radda, 1971\) in West Afrika, geschlussfolgert aus mitochondrialen DNA Sequenzen. „ \(PDF\)](#)

Für die schnelle geleistete Übersetzung möchte ich mich besonders bei Werner Neumann bedanken.

Durch die DNA –Untersuchungen durch Agnès hat sich vor allem in der splendopleure – Gruppe einiges geändert. Eine große Rolle spielt nun wieder die Art volcanum. Der Hauptkern der alten splendopleure –Art, Phänotypen Tiko und Meme, wird der Art volcanum zugeteilt.

Die Phänotypen sp. Bimbia, sp. Bioko, sp. Dizangue, sp. Koponge und einige Populationen zwischen Kribi und Kumba gehören zu splendopleure Tiko.

Zusammengefasst: Was splendopleure Tiko ähnlich sieht, gehört zu volcanum und die Phänotypen, die von den meisten Autoren von splendopleure getrennt wurden, gehören zu splendopleure. Ich habe die Arbeit zur Kenntnis genommen und hoffe, dass wir bald etwas von Rainer Sonnenberg hören.

Auf jeden Fall gibt es in Zukunft genügend Diskussionsstoff.

In der Artenliste ist die neue Einteilung (volcanum / splendopleure) von mir in Klammern gesetzt worden.

Zum Jahresende plane ich wieder, die gesammelten Daten und Bilder von Chromaphyosemion auf eine DVD abspeichern. Bis auf eine Ausnahme waren alle in der Lage, die DVD abzuspielen. Für die DVD- Scheibe benötigt man ein DVD-Laufwerk, die man heute schon sehr günstig bekommt. Das Datenvolumen ist mittlerweile so groß, dass eine normale CD nicht ausreicht.

In der Anlage:

[Artenbestandsliste](#)

[Deutsche Übersetzung der Arbeit von Agnèsè.](#)

AG- Chromophyosemion Artenbestandsliste 5/2006

	Population/Fundort	Bestand
bitaeniatum	Porto Novo (Benin 2003)	682 812
	Afanyangan TMBB 90/13	Bill 313 408 905
	Ijebu Ode	313 91 Lee 928 905 Chi
	Lagos	483 682 269 536 63 500 93 208 91 Lee APK Pol SA1 Bill Bass hezi 950 E-H Chi
	Umudike	483 269 91 408 928 950
	Ibeju – Creek	812 483 647 905
	Yemoji- River	812 313 682 905 SA1 207
	Benin City	353
	Zagnanado	65 Bill Kaj Tony APK
	Ivere	AKA
	Ijaguna- River	500
	47 KM Lagos - Ibadan	APK
	Nigerdelta	237
	Majidun Ilaje NIG03 FO	134 812
	Adja Ouere (Benin 2004)	812
	Ikorodu C /05	Tony
	DDR-Stamm	519
sp. Niger	Onitsha NA 2004/2	812 635 Leg 682 65
bivittatum	Biafra	169 513 313 Mary
	Funge	483 203 536 63 Bill 500 316 93 208 207 Lee APK 928 E-H Bass SA1
	Funge C 91	313 Henri 408
	Funge C 2006	Henri
	Kwa Riverfalls Plantation	Mary
	Funge 4/2000 (C 03/ 4)	812 63 91 928 905
	Ilor KV 03/35	905
	Toko C 03/8	905 812
	Mundemba KV 03/33	905
	Mundemba Süd KV 03/34	905
	Mundemba C/03	Tony
	Ikang NA 04/3	65 812 Bill
poliaki	Bolifamba	269 SA1
	Ekona	Bill GvH Henri SA1
	Ekona 1999 (KV 03/20)	812 647 905
	Ekona B 03/4	SA2
	Mille 33 DK	237
	Monea (Muea)	313 Kaj 408
	CMM 41	905 476 93 hezi
	Mpundu KV 03/3	905
	Bowanda KV 03/18	905
	Mutengene C03/45	905
	ohne Fundortangaben	E-H 519
riggenbachi	Ndokama HJRK 92/18	536 500
	Ndokama PK 12	538
	Ndokama 2004	812 Leg
	Nkwo 97/1	812 408
	Yabassi	313
	Yellow (gelb)	Lee
	Yabassi KV 03/28	905 812
	Yabassi- Loum KV 03/29	905
	Yabassi-Yingui KV 03/27	905
	Ndokama KV 03/25	905
loennbergii	Makondo CCP 82/7	321
	Makondo C/03	Tony Chi
	Song Bibai° C 89/21	313
	Mapan 2004	812
	Apou C 89/30	313
	KEK 98/ 7	63 237 93
	Nkakanzok CBL 1/13	APK
	Edea Y km 18 CSK 95/28	353 313
	SE 13 / 99	63
	Log Bako'o B03/1	SA2
	Elon KV 03/38	905
	Eseka KV 03/8	905
	Makondo KV 03/34	905
	ABC 05/67	Leg
	Makak-Ndokoma BLLMC 05/35	Henri
	Batombe ABC05/65	Henri
splendopleure / volcanum		
(vol)	Moliwe GPE 90/5 (C 03/1)	65 812 Henri 905
(vol)	CMM 52 (Molive)	905
(spp)	Tiko	614 812 63 St-L Chi
(spp)	Tiko Big Ikange Camp (C 03/46)	812 408 St-L 1092 905 Leg hezi 950 682
(spp)	Tiko CBL 01/ 25	812
(vol)	Bamukong Ombe-River System 99	Ron Chi
(vol)	Bombe CXC 23	Bill GvH
(vol)	CMM 50 (Mambanda)	812 63 476 St-L Ron 91 928 Leg
(vol)	HTL 9817	Roy
(vol)	Yoke C 03/37	905 812

(vol)	Ebonji KV 03/31	905
(vol)	ohne	544 484 353
(vol)	DDR-Stamm	483 91 298 928
(vol)	Ekondo Titi	65 St-L 812 Chi
(vol)	Ekondo Nene ABC06/13	Henri
(vol)	Mbonge	65 313 Kaj 812
(vol)	Muyuka Pol. Station C89/15	Tony
(vol)	Twin Bridges, Muyuka B03/5	SA2 SA1
(vol)	Muyuka C 03/41	905
(vol)	Likoko SE 99/21	63 812 91 298 928
(vol)	Owe 1999	St-L
(vol)	Kumba GPE 90/3	483 812 63 Bill 313 207 St-L 91 408 928 E-H 1092 682
(vol)	sp. Penda- Mboko	316 Bill St-L Henri 940 ccc
(vol)	sp. Kompina C 03/14	812
(spp)	sp. Bimbia Camp (C 03/44)	812 408 St-L 905
(spp)	sp. North of Bonguen ABC 05/62	Leg
(spp)	sp. Sipe CBL 01/15	Leg
(spp)	sp. "Afan Essokie II, ABC 2005-48"	65 Leg
(spp)	sp. "Ebodje, ABC 2005-46"	65
(spp)	sp. "North Bonguen, ABC 2005-62"	65
(spp)	sp. Campo HJRK 92/17	536
(spp)	sp. Likado CSK 95 / 23	812 SKS 63 Bill
(spp)	sp. Mboro CMM 18	812
(spp)	sp. Mamelles KV 03/39	905 Bill
(spp)	(Dizangue) Dizangue I C 89/33	812 63 313 Ron Tony
(spp)	Mangoule 1999	313 812 908
(spp)	CMM 8	812 APK 93
(spp)	Ndog Bong CBL 01/10	812
(spp)	Nkapa	Tony
(spp)	Nkapa KV 03/42	905
(spp)	Bonepoupa CLL 03/18	812
(spp)	Bemengue CBL 01/21	Leg
(spp)	(sp. Bioko) Nsupu GEMHS 2000/42	Bill St-L Ron 812
(spp)	GEMHS 2000/43	812 Bill St-L 905 682
(spp)	(Kopongo) Kopongo I C 89/35	63
(spp)	Kopongo CSK 95/27	Bill GvH
(spp)	Kopongo CMM 7	908
(spp)	Bessombe KV 03/16	905
(spp)	Kopongo C/04	Tony
(vol)	(poliaki) Mile 29 (C 03/42)	538 Bill 908 313 812 408 Roy 905
(vol)	Mile 29 CBL 01/21	Leg
(vol)	Mile 29 CMM 51	905 812
(vol)	Mile 29 HLM 99/ 15	Bill
(vol)	Mile 29 C 94/3	Bill
(vol)	Buea-Ekona SE 99/22	63

lugens	KEK 98 / 5	476 536
	Afan Essokie HLM 99/28	812 63 Bill Henri Leg
	KV 03/40	905
	Reserve campo maan ABC06/85	Henri
	ABC 05/53	Leg
sp. Nr.6 (lug)	KEK 98 / 10	65 483 647 536 313 513 91 St-L
sp. Nr.6 (lug)	Akok KV 03/37	905
alpha	Cap Estèrias LEC 93/26	483 Bill 93
	Santa Clara GJS 00/34	812 Bill 63 298 65 928 905
	BDBG 21/04	Henri Leg 812
kouamense	Engong Kouamè LEC 93/24	313
	Assong Essala BBS 99/29	523
	Mvang Ayong G02/115	408 905 Leg
	BDBG 24/04	Henri 812 Leg
	BFS 02/39	hezi
punctulatum	ABC 05/51	812 Leg
	ABC 05/49 Etonde Fang	Leg
	Bitande SE 99 / 16	63 91 93
	Bibabimwoto CMM 22	812 905 Leg
	Bibabimwoto HAH 98 / 314	Tony
	Etonde fang ABC05/49	
melanogaster	KEK 98 / 6	St-L
	KV 03/41	905
	ABC 05/58 Lolabe	812 Leg
	ABC 05/23 West of Naha	812 Leg
species		
sp. Nr.8	Boko- River KV 03/22	905
sp. Nr.8	Chutes d'Ekou HLM 99/1	812 63 65 313 237
sp. Rio Muni	Nlosoc GEMHS/2000/31	812 Leg
sp. Rio Muni	Ndyiacom GEMHS/2000/32	Bill 812 313 St-L GvH 905 Leg
sp. Rio Muni	GEMHS /2000/38	812
sp. Rio Muni	GEMLBJ/2003/36	Bill
sp. Rio Muni	GEMLBJ/2003/42	65 Bill Chi
sp. Rio Muni	GEMLBJ/2003/47	65 Bill 513 Leg
sp. Rio Muni	Ecurya 2 GEMHS/2000/41	905



DKG Arbeitsgemeinschaft – Chromaphyosemion
Rudolf Pohlmann / rudolfpohlmann@aol.com

Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences.

Mit freundlicher Genehmigung von J.-F. Agnèse.
Durch Dr. Werner Neumann aus dem Englischen ins Deutsche übersetzt.

Phylogenetische Verwandtschaft und Phylogeographie der Killifisch Arten der
Untergattung *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, geschlussfolgert aus mitochondrialen DNA Sequenzen.

J.-F. Agnèse,a,b,*, F. Zentz,c, O. Legros,d, D. Sellos,e

a Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Adaptation, UM2, IFREMER-CNRS UMR5000, Université de Montpellier II, cc63, place E. Bataillon, F34095 Montpellier CEDEX 5, France.

b Institut de Recherche pour le Développement, 213 rue La Fayette, 75480 Paris CEDEX 10, France.

c Université de Bretagne occidentale, IUT de Quimper, Dpt Génie Biologique, 2 rue de l'Université, 29334 Quimper CEDEX, France.

d Floralaan, 51, 1501 Buizingen, Belgium

e Station de biologie marine de Concarneau, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 5178, 29182 Concarneau CEDEX, France

*Korrespondierender Autor: Fax: +33 4 67 14 45 54

E-mail address: agnese@univ-montp2.fr (J.-F. Agnese)

Kurzfassung:

Wir haben die phylogenetische Verwandtschaft von 160 Exemplaren von 88 Mustern (Proben) aller definierten Arten der afrikanischen Untergattung *Chromaphyosemion* analysiert, um die Monophylie dieser Gruppe zu untersuchen sowie die gegenseitigen Beziehungen und Trends in der Evolution der Chromosomen sowie Hypothesen über ihre Entwicklungsgeschichte zu formulieren. Die Datensätze umfassen 1153 totale Nukleotide von der mitochondrialen 12S rRNA, cytochrome Oxydase I und D-loop. Die molekulare Basis – Topologie wurde durch Maximalwerte der Parsimonie analysiert, größte Dichte, Distanzmethode und Bayesian Interferenz zur Untermauerung der Monophylie bei der Untergattung *Chromaphyosemion*. Alle Populationen mit doppeldeutigem (unsicherem) taxonomischem Status wurden bereits beschriebenen Arten zugeordnet, mit Ausnahme von *A. sp.* Rio Muni, welche zu einer noch unbeschriebenen Art gehören dürfte. *A. alpha* und *A. lugens* erscheinen in basaler Position der drei verschiedenen Bäume, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Untergattung *Chromaphyosemion* ihren Ursprung in der Region Südkamerun – Nordgabun hat.

Weiterhin wird die Südkamerunische Region (zwischen 2 und 3 Grad nördlich des Äquator), welche die Hälfte der *Chromaphyosemion* - Arten aufweist, als Refugium in der Trockenzeit während der späten Quartärzeit betrachtet. Phylogenetische Beziehungen unter den Untergattungen decken auch auf, dass die chromosomale Evolution komplex ist und auf intraspezifischem (innerartlichem?) Level studiert werden sollte.

Schlüsselworte: Cyprinodontidae, Mitochondrial DNA, taxonomy, Biogeography, Refugezone

1. Einleitung

Fische der UG *Chromaphyosemion* bewohnen kleine Fließgewässer und Süßwasserflüsse im Küstenflachland von Togo bis Gabun (Scheel, 1990). *Chromaphyosemion* wurde durch Radda (1971) als UG von *Aphyosemion* Myers, 1924 beschrieben. Diese Fische können auf einfache Weise von allen anderen *Aphyosemion* durch mehrere Merkmale unterschieden werden, vorwiegend durch das Vorhandensein von zwei dunklen Längsbändern in beiden Geschlechtern (vergleichsweise einem oder keinem) und die Fähigkeit der Männchen, ihre Färbung schnell zu wechseln, in Abhängigkeit von Stress oder ihrem hierarchischen Status (vergleichsweise weniger deutlicher (auffälliger) Wechsel bei *Aphyosemion*).

Seegers (1981), Amiet (1987), Murphy und Collier (1999a), und Sonnenberg (2000) betrachteten *Chromaphyosemion* als eine wahrscheinlich monophyletische Gruppe, obwohl sie dafür keinen Beweis antraten. Dieser Trend führte einige Autoren in jüngeren Publikationen dazu, *Chromaphyosemion* als Gattung zu betrachten (Sonnenberg 2000; Legros et al., 2005; Völker et al., 2005).

Es ist einfacher, zu *Chromaphyosemion* gehörende Arten von allen anderen *Aphyosemia* zu unterscheiden, als die Arten innerhalb der UG *Chromaphyosemion* voneinander. Es existieren zwischen ihnen keine meristischen Unterschiede, allerdings weisen die Arten oder Formen im männlichen Geschlecht Farbunterschiede auf, manchmal ist auch bei den Weibchen das Farbmuster verschieden. Trotz der von manchen Autoren vorgenommenen Anstrengungen zur Klärung der Konfusion in dieser Gruppe (Seegers, 1986; Wildekamp, Romand und Scheel, 1986; Amiet, 1987; Scheel, 1990 und Sonnenberg, 2000), bestehen weiterhin Fragen hinsichtlich der Validität einiger der beschriebenen Arten und bezüglich des taxonomischen Status einiger Populationen.

Charakteristische Farbmuster sind schwierig zu festzulegen, wenn die Arten einen hohen Grad von Variabilität aufweisen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist *A. splendopleure* (Brüning, 1929), für den verschiedene Phänotypen identifiziert wurden: Dizangue, Kopongo, Meme. Für andere Populationen, die ein einzigartiges Farbmuster aufweisen, dürfte es schwierig sein zu wissen, ob diese Unterschiede Artunterschiede signalisieren oder ob es sich um innerartliche Variationen handelt: *A. sp.* No 6 liegt sehr nahe bei *A. lugens* (Amiet, 1991), *A. sp.* Rio Muni, *A. sp.* Likado oder *A. sp.* Mboro und sind alle verschieden, scheinen aber *A. splendopleure* nahe zu stehen.

Einige beschriebene Taxa sind auch unsicher: *A. volcanum* (Radda und Wildekamp, 1977) wird manchmal als jüngeres Synonym von *A. splendopleure* und *A. pappenheimi* (Ahl, 1924) als Synonym von *A. loennbergii* (Boulenger, 1903) betrachtet.

Neben dieser hohen Stufe phänotypischer Unterschiede bestehen auch starke karyotypische Differenzen. Es wurde berichtet, dass Chromosomenzahl und Chromosomen – Morphologie nicht nur zwischen den Arten, sondern auch innerhalb von Populationen der gleichen nominalen Art variieren (Scheel, 1990, Völker et al., 2005).

Zum Beispiel reichen diploide Zahlen von $2n = 20$ bis zu $2N = 40$. Populationen von *A. riggenbachi* zeigen unterschiedliche Karyotypen, die von $2N = 20$ bis zu $2N = 38$ variieren.

Die bemerkenswerte phänotypische und karyotypische Variabilität macht die UG *Chromaphyosemion* zu einem sehr gut geeigneten Modell für evolutionäre Studien. Nur sechs Arten sind zweifelsfrei erkannt worden: *A. alpha* (Huber, 1998), *A. bivittatum* (Loennberg, 1895), *A. riggenbachi* (Ahl, 1924), *A. bitaeniatum* (Ahl, 1924), *A. kouamense* (Legros, 1999) und *A. loennbergii*. Gegenwärtig wurden 2 neue Arten auf Grund von farbigen und genetischen Unterschieden beschrieben (mtDNA Analysen), *A. melanogaster* (Legros, Zentz und Agnèse, 2005), früher *A. sp.* No7 angesehen und *A. punctulatum* (Legros, Zentz und Agnèse, 2005), früher *A. sp.* No 4 bezeichnet.

Schließlich werden einige Arten von manchen Autoren als dubios betrachtet oder als Kandidaten für eine Revision: *A. multicolor* (Brüning, 1929), *A. pappenheimi*, *A. poliaki* (Amiet, 1991), *A. splendopleure* und *A. volcanum*.

Unzureichende Kenntnisse der Taxonomie und der phylogenetischen Beziehungen der *Chromaphyosemion* behindern Schlussfolgerungen und evolutionäre Studien, die an Hand dieser besonderen Gruppe vorgenommen werden könnten, beträchtlich.

Mitochondriale DNA Sequenzen sind bereits erfolgreich zu Ermittlungen phylogenetischer Beziehungen bei Fischen, einschließlich *Cyprinodontidae* (Duvernell and Turner, 1998; Murphy and Collier 1999b; Hrbek und Meyer, 2003; Lüssen et al., 2004; Hrbek et al., 2005) eingesetzt worden. In der vorliegenden Studie analysierten wir die bekanntesten Arten und Formen von *Chromaphyosemion*, um genetische Daten zur Klärung des taxonomischen Status der unterschiedlichen Arten, Formen und Populationen zu erhalten; (2) demonstriert den monophyletischen Status von *Chromaphyosemion*, (3) gibt einen Einblick in die Phylogeographie der Gruppe, (4) bringt ihren chromosomalen Entwicklungstrend zum Ausdruck.

2. Material und Methoden

2.1. Fischmuster von 61 natürlichen Populationen für DNA Extraktionen wurden in Kamerun im Januar 2005 gesammelt (Erlaubnis für das Fischen und Export lt. Erlaubnis Nr. 0020 /ASE/MINEPIA/ DIRPEC/ SDARA) unter Verwendung von Tauchnetzen. Die Fische wurden mit Phenoxyethanol betäubt und dann in 90% Alkohol präpariert. Zusätzliche Exemplare, entweder Wildfänge oder aus Aquariestämmen von Hobbyfreunden, wurden in die Analysen einbezogen. Die Sammelorte und die taxonomische Identifizierung der Muster ist in Fig. 1 und Tabelle 1 ausgewiesen.

Belegstücke der natürlichen Populationen wurden dem Royal Museum of Central Afrika in Tervuren (Belgien) übergeben und unter den Nummern 2005-16-P-01 bis 2005-16-P-104 und 2005-11-P-01 bis 2005-11-P-35 registriert.

2.2. DNA amplification and sequencing

Total DNA was extracted from muscle tissues preserved in alcohol using GenElute mammalian GENOMIC DNA Miniprep Kit from Sigma. Amplification protocols were identical for the mtDNA D-Loop, 12S rRNA and cytochrome oxidase I (COI) regions fragments: 35 cycles beginning with 3min at 93°C for initial denaturation followed by cycles of 30 sec at 93°C, 30 sec at 52°C for annealing, 30 sec at 72°C for extension, with a final 5min extension step at 72°C. Primers used for the amplification of the Dloop region were ACCCCTAGCTCCCAAAGCTA (forward) and CCTGAAGTAGGAACCAGATG (reverse) while TTTTGTATCCCCTGGGGGA (forward) and CCAGAGAATAGAGGGGAATCAGTG (reverse) were used to amplify COI and CAAACTGGGATTAGATACCCC (forward) and AGGGTGACGGGCGGTGTGT (reverse) were used to amplify 12S rRNA. Primers used for COI and 12s RNA were adapted from Murphy et al., 1999. The primers used enabled the amplification of three different fragments 430 bp (305 to 309 bp sequenced) for Dloop, 530 bp (459 bp sequenced) for COI and 400 bp (325 or 326 bp sequenced) for 12S rRNA. These fragments were purified with the ExoSAP-IT kit (Amersham Biosciences) and sequenced with the original primers using Big Dye Terminator reaction Mix (Applied Biosystems). Sequencing reactions were electrophoresed on an ABI 3130 XL automated sequencer (Applied Biosystems). Chromatograms were visually checked and sequences were aligned manually using BioEdit. According to the phylogenetic relationships of African Killifishes in the Genera *Aphyosemion* and *Fundulopanchax* proposed by Murphy and Collier, 1999, *Aphyosemion ahli* (Myers, 1933) from Sole (ABC 05/16, corresponding to number 10 on the map) was used as an out-group. Two specimens of each wild population were sequenced (when adequate individuals were available). When different haplotypes were observed between two specimens from the same location, then, two additional specimens (when available) were sequenced.

2.3. Sequence analysis

Saturation was analyzed by plotting the absolute number of transitions and transversions against patristic distance values. The aligned sequences were analyzed independently with Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) Distance Method (DM) and Bayesian inference analysis (BI). For ML DM and BI inference analyses a the Akaike Information Criterion (AIC) approach was used to find the best model of evolution that fit our data using the program ModelTest 3.7 (Posada and Crandall, 1998). ML test was carried out with the PHYML program (Guindon and Gascuel, 2003), MP with Phylip 3.57 (Felsenstein, 1993) DM with PAUP 4.0 (Swofford, 2001) using the Neighbor-joining method (NJ; Saitou and Nei, 1987) and BI with MrBayes 3.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Bootstrap analysis (500 replicates) was used (for ML, Mp and DM) to assess the relative robustness of branches (Felsenstein, 1985). Consensus trees were obtained using PHYLIP 3.57 (Felsenstein, 1993).

3. Results

3.1. Sequence variation

A total of 160 specimens representing 88 sampled populations belonging to 18 species or forms have been successfully analyzed. A 459 bp fragment of the COI gene was consistently sequenced. The *Chromaphyosemion* dataset contained 163 variable sites, 131 of which were parsimony informative. The most variable sites were found in third codon position (147, i.e., 90%), 4 (2%) in second codon positions and 12 (8%) in first codon positions. These variations led to 10, non parsimony informative, amino acid substitutions. The Dloop fragments sequenced were variable in size ranging from 305 to 309 bp due to several indels. A total of 82 putative mutations were scored from which 51 were parsimony informative. One indel was also observed in the 325-326 bp long 12S rRNA fragments in which 53 putative mutations were scored (30 were parsimony informative). All the new sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers DQ267261 to DQ267418 for COI, DQ278264 to DQ278418 and DQ286834 for 12S rRNA and DQ284591 to DQ284749 for Dloop. Sequences of the three genes were aligned (Dloop Aligned sequences were registered in the EMBL database: ALIGN_000981) and merged resulting in 102 different haplotypes of 1153 bp (total length after alignment and including indels). Empirical attempts were made to detect putative saturation within *Chromaphyosemion* sequences. The observed numbers of transitions were plotted against the observed numbers of transversions for all pairs of sequences. The observed numbers of transitions or transversions were also plotted against all pair-wise distances (P distances). All plots indicated relatively linear relationships between substitution rates and genetic distances (not shown). This suggested that transitions and

transversions were not saturated.

3.2. Monophyletic status of the *Chromaphyosemion* subgenus

In order to assess the monophyletic status of *Chromaphyosemion*, 12 partial sequences of the 12S rRNA gene (325 bp) representing all the 12 *Chromaphyosemion* species commonly considered as valid were aligned and compared with other *Aphyosemion* and *Fundulopanchax* sequences obtained from GenBank (from analyses of Murphy and Collier 1999a). The *Aphyosemion* species represented all defined species groups in this genus (Scheel, 1990): *calliurum* group (CAL), *cameronense* group (CAM), *coeleste* group (COL), *elegans* group (ELE), *exiguum* group (EXI), *georgiae* group (GEO), *striatum* group (STR) and one species remaining ungrouped (UG). *Aphyosemion hera* Huber, 1998, not studied in Murphy and Collier (1999a), was included because this species seems to be close to *Chromaphyosemion* species when taking into account meristic data (Huber, 1998). Only two *Fundulopanchax* species were retained because *Fundulopanchax* is a monophyletic genus and sister to *Aphyosemion* (Murphy and Collier, 1999a). These two species have been introduced in the analyses in order to root the trees.

Table 2 summarizes the pairwise divergence values (Kimura 2 genetic distances; Kimura, 1980) among all species of Killifish studied. Values between *Fudlopanchax* species and *Aphyosemion* species were ranged between 0.1009 and 0.2680 (mean= 0.1649) while distances between *Aphyosemion* species (including species from the subgenus *Chromaphyosemion*) were ranged from 0.0031 and 0.1256 (mean=0.0783). Inside the subgenus *Chromaphyosemion*, pairwise divergences never exceeded 0.0540 (mean=0.0255). The General Time Reversible model with among site heterogeneity (GTR+I+G) was selected as the best fit for our data using ModelTest (Posada and Crandall, 1998). Rate matrix parameters were R(a)=1551.2255, R(b)=4210.1299, R(c)=3014.7166, R(d)=201.8017, R(e)=13949.0020. Among site variation was approximated with the gamma distribution shape parameter alpha=0.5439. These parameters were used for subsequent phylogenetic analyses. The analyses based on MP, ML DM and BI produced congruent topologies. Fig. 2 shows the consensus tree obtained with the three different methods. The two *Fundulopanchax* species clustered together as previously described in Murphy and Collier (1999a), and were used to root the trees. As earlier observed the species groups within *Aphyosemion* were generally strongly supported while the relationships between the groups were weaker (Murphy and Collier, 1999a). Species from the CAL group: *A. celiae*, *A. calliurum*, *A. ahli*, *A. australe* were clustered together with the *Chromaphyosemion* species but *Chromaphyosemion* species appeared clearly as a monophyletic assemblage (Bootstrap values –bv– ranged from 67% to 75%). *A. hera* was related to *A. ogoense* and *A. louessense* (striatum group) and not to any *Chromaphyosemion* species. Meristic similarities between *Chromaphyosemion* species and *A. hera* are then only due to convergence and have no phylogenetic significance. Species phylogenetic relationships within *Chromaphyosemion* could not be resolved in this analysis but *A. alpha*, *A. lugens* and *A. bitaeniatum* appeared to occupy a basal position inside the *Chromaphyosemion* cluster. This is congruent with Murphy and Collier (1999a) observations where *A. alpha* (LEC 93/26 but erroneously referred to as LEC 93/27 in their article) occupied a basal position in the BIV (= *Chromaphyosemion*) group compared with *A. bivittatum* and *A. volcanum*. To further resolve relationships within *Chromaphyosemion*, additional sequence data were necessary.

3.3. Species characterization

The three sequence fragments (Dloop, COI, 12S rRNA) were combined because they were linked on a single mtDNA molecule and because no incongruence existed between topologies obtained with each of the three sequences (topologies not shown). The highest genetic divergences (*P* distance, excluding indels) were observed, as expected, between the outgroup species *Aphyosemion ahli* and the *Chromaphyosemion* species: *P* distances ranges from 0.0972 to 0.1579 between these two groups while pairwise *P* distances between *Chromaphyosemion* species never exceeded 0.1134.

The Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) with among site heterogeneity (TN+I+G) was selected as the best fit for our data using ModelTest (Posada and Crandall, 1998). Rate matrix parameters were R(a)=1.0000, R(b)=10.4125, R(c)=1.0000, R(d)=1.0000, R(e)=14.2876, R(f)=1.0000. Among site variation was approximated with the gamma distribution shape parameter alpha=0.6753. These parameters were used for subsequent phylogenetic analyses. The analyses based on MP, ML, DM and BI produced congruent topologies. Fig. 3 shows the consensus tree obtained with the three different methods. Seven species were clearly genetically defined: *A. alpha* (bv ranged from 83 to 100%), *A. bitaeniatum* (98% to 100%), *A. bivittatum* (100%), *A. melanogaster* (99% to 100%), *A. riggenbachi* (96% to 100%), *A. punctulatum* (100%) and *A. loennbergii* (82% to 100%). *A. kouamense* appeared separated from all other species. *A. sp.* Rio Muni (GEMHS 00/32) was clustered with *A. melanogaster* (these two species can be easily separated on a color pattern basis). *A. volcanum*, *A. poliaki* and *A. splendopleure* were grouped together (bv between 54% and 80%). The first two species were clustered together with a high bootstrap value of 100%. In this cluster, all samples belonging to *A. poliaki* were grouped together (bv between 46% to 71%).

Several populations with ambiguous taxonomic status were analyzed in this study. *A. cf. lugens* (62) was grouped together with *A. lugens* (bv varied from 95% to 100%). These two species have extremely similar phenotypes. It is very likely that the population of *A. cf. lugens* (also called *A. sp.* No6) belong to *A. lugens*. *Aphyosemion aff. Splendopleure* CBL 01/10, CBL 01/11 (45, 46), *A. sp.* Sipe (41), *A. sp.* Koukoue (42), *A. sp.* Bioko GEMHS 00/43 (20) and *A. sp.* Bimbia Camp (21) are clearly clustered with all *A. splendopleure* populations and should be considered as belonging to this species. Samples 70, 71 on one hand and 73, 74, 75, 76 on the other hand correspond to what was referred as to *A. sp.* Mboro and *A. sp.* Likado respectively. These two forms should also be considered as belonging to *A. splendopleure*.

Aphyosemion aff. poliaki ABC 05/8 (13) present at “Mile 29” is clustered with *A. volcanum* populations. Amiet (1991) when describing *A. poliaki*, left this population with an undetermined taxonomic status because its color pattern was quite different from the other *A. poliaki* populations pattern. Moreover it is not impossible that at “Mile 29” two different species or forms exist. Amiet (1991) noted that pictures of *Chromaphyosemion* captured at “Mile 29” at different times looked different. The present results demonstrated that the “Mile 29” population studied belongs to *A. volcanum* and not to *A. poliaki*. In this study, only one population could not be unambiguously identified to a known species: *A. sp.* Rio Muni GEMHS 00/32 (86). Specimens studied clustered with *A. melanogaster* but can be easily distinguished from this species by color pattern. It is then very likely that *A. sp.* Rio Muni GEMHS 00/32 represents an undescribed species.

3.4. Phylogenetische Beziehungen innerhalb *Chromaphyosemion*

Das phylogenetische Netzwerk (Fig. 3) hat seine Wurzel, früheren Beobachtungen (Murphy and Collier 1999a) und den vorliegenden Studien folgend, in *Aphyosemion ahli*. Ergebnisse, bei denen alle Genteile herangezogen wurden, waren mit solchen kongruent, die mit Hilfe des 12S rRNA Fragments allein erzielt worden sind (Fig. 2). *Aphyosemion alpha* und *A. lugens* erscheinen eng beieinander an der Wurzel, gefolgt von *A. bitaeniatum*. Alle anderen Arten lagen büschelförmig zusammen, aber diese Zusammendrängung wurde nur dürftig abgestützt (bv reichte von 33% bis 63%).

Nichtsdestoweniger ist es in dieser unzureichend definierten Gruppe möglich, einige Büschel zu identifizieren.

Aphyosemion sp. Rio Muni ist verwandt mit *A. melanogaster*; *A. volcanum*, *A. poliaki*, *A. splendopleure*, *A. punctulatum* und *A.*

loennbergii. Sie bilden eine monophyletisch Gruppe (bv reichte von 93% bis 100%). In dieser Gruppe ist einesteils *A. punctulatum* verwandt mit *A. loennbergii* und andererseits *A. splendopleure* verwandt mit *A. volcanum* und *A. poliaki*. Diese beiden letzteren Arten waren gebündelt (bv = 100%) in einer paraphyletischen Gruppe. Phylogenetische Beziehungen der anderen Arten (*A. melanogaster*, *A. riggenbachi*, *A. kouamense* und *A. bivittatum*, *A. sp.* Rio Muni) konnten nicht komplett gelöst werden. *A. melanogaster* und *A. sp.* Rio Muni wurden nichtsdestoweniger oft in der Analyse zusammen gruppiert

5. Diskussion

5.1. Was ist eine Art in der Untergattung *Chromaphyosemion*?

Bis heute wird zur Unterscheidung der *Chromaphyosemion*-Arten als Hauptkriterium das Färbungsmuster verwendet. Dieses Kriterium ergibt in einigen Fällen gute Resultate, wie bei *A. bitaeniatum*, *A. riggenbachi*, *A. bivittatum*. In vielen anderen Fällen führten kleine Unterschiede oder Übergangsformen zu ziemlicher Konfusion und haben zur Schöpfung mehrerer unbeschriebener Formen geführt.

Kürzlich (Legros et al., 2005), wurden genetische Merkmale zusammen mit Farbmustern zur Beschreibung von zwei neuen Arten herangezogen, *A. melanogaster* (einst *A. sp.* No 7) und *A. punctulatum* (einst *A. sp.* No 4). Die vorliegenden Studien bestätigen den Nutzen der genetischen Werkzeuge zur Bestimmung des taxonomischen Status von verschiedenen Formen.

Einige unbestimmte Formen waren unsicher einigen Arten zugeschrieben worden: *A. sp.* Mboro (70,71), *A. sp.* Likado (73-76), *A. sp.* Bimbia Camp (21), *A. sp.* Bioko Island (20), *A. sp.* Sipe (41), *A. sp.* Koukoue (42) wurden zu *A. splendopleure* gestellt; *A. cf. lugens* (*A. sp.* NO6) konnte als zu *A. lugens* gehörend betrachtet werden, *A. sp.* Rio Muni (86) ist wahrscheinlich eine unbeschriebene Art. Andererseits gibt es keinen Beweis für die Validität von *A. pappenheimi* in unserem Sortiment. Zwei Populationen könnten dieser Art zugewiesen werden (57, 58), betrachtet man ihren Fundort nahe Bipindi, der Terra typica von *A. pappenheimi*. Beide Populationen konnten jedoch als zu *A. loennbergii* gehörend erkannt werden. Das stimmt mit der Ansicht einiger Autoren (Huber, 1981; Wildekamp, 1993) überein, die *A. pappenheimi* als jüngeres Synonym von *A. loennbergii* betrachten. Der spezifische Status einiger anderer zweifelhafter Arten wurde bestätigt: *A. volcanum*, *A. splendopleure*. Es ist bemerkenswert, dass die letztere Art den höchsten Grad von phänotypischer Variabilität innerhalb der UG aufweist. Man kann auch beobachten, dass diese Art paratypisch zu 8 *Chromaphyosemion*-Arten ist (3/4 der beschriebenen Arten) und dass ihre Verbreitung stark aufgesplittet ist (Bioko Island, Likado Region, Mboro Region, Hauptverbreitungsgebiet Kribi bis Tiko und wahrscheinlich Ekom falls).

Die Populationen von *A. splendopleure* bedürfen weiteren Untersuchungen, um erläutern zu können, was für diese hohe phänotypische Verschiedenheit verantwortlich ist.

Nur der Artstatus von *A. poliaki* (14-18) verbleibt noch unklar. Es gibt zwei alternative Hypothesen: *A. poliaki* ist eine valide Spezies oder *A. poliaki* repräsentiert nur eine Ökophänotype von *A. volcanum*.

Wenn *A. poliaki* eine valide Art ist, dann ist *A. volcanum* paraphyletisch (eine ähnliche Situation wurde für den Wels *Clarias gariepinus* und das *Bathyclarias* Arten-Büschel vom Lake Malawi dokumentiert (Agnèse and Teugels, 2001)). Vorliegende Ergebnisse reichen nicht aus, um zwischen einer der beiden Hypothesen zu wählen.

Aphyosemion poliaki ist die einzige *Chromaphyosemion*-Art, die in einer "ungewöhnlichen" Umgebung, nämlich am Mount Cameroon lebt: hochgelegen, Wasser mit einem pH Wert von > 7,2 und einer Temperatur von meist < 23°C, Bäche mit starker Strömung, oft außerhalb des Waldes auf dunklem Bodengrund (Lava) vorkommend. Unter diesen Bedingungen könnten die Fische einen schlankeren Körper und eine dunklere Färbung herausgebildet haben als auf den Küstenebenen. Diese wesentlichen phänotypischen Unterschiede bewirkten nach unseren Beobachtungen keine starke genetische Differenzierung. Dann wäre die Ökotypen – Hypothese anwendbar. Diesbezüglich sollten mehr Populationen von *A. poliaki* und *A. volcanum*, unter Verwendung sowohl der Kern- und mitochondrialen Marker unter besonderer Beachtung von „Mile 29“ (13), untersucht werden. Diese Population ist als phänotypisches Zwischenglied zwischen *A. poliaki* und *A. volcanum* durch Amiet (1991) betrachtet worden. In unserer Analyse gehört Mile 29 unzweideutig zu *A. volcanum*. In der Tat, der Bachlauf in dem Mile 29 vorkommt, könnte ein Mittelding hinsichtlich des Biotops zwischen den Bedingungen darstellen, die am Mount Cameroon (Biotope von *A. poliaki*) und den in der Küstenebene angetroffenen wurden, wo *A. volcanum* gefunden wurde.

Phänotypische intermediäre Populationen sind bei *Chromaphyosemion* nicht ungewöhnlich (Legros, 2000; Sonnenberg, 2000). Ein anderes Beispiel liegt bei *A. sp.* Sipe (41) und *A. sp.* Koukoue (42) vor, die unter der Koukoue - Phänotype eingruppiert wurden. (Legros, 2000). Diese Phänotype ist intermediär zwischen *A. splendopleure* und *A. loennbergii*.

In unserer Analyse wurden diese zwei Populationen in die anderen *A. splendopleure* – Muster eingeordnet.

Interessanterweise wurden Populationen der Koukoue Phänotype (41, 42) in einer Region gefunden, wo beide Arten (*A. splendopleure* und *A. loennbergii*) präsent sind. Diese Situation ist etwas identisch mit der von Mile 29, aber in diesem Falle besteht offenbar keine ökologische Differenzierung zwischen den Biotopen, in denen *A. splendopleure* und *A. loennbergii* gefunden wird. Wie weit sind diese phänotypisch intermediären Populationen verbreitet? Kommen sie hauptsächlich in den Kontaktzonen zwischen Arten vor? Woher stammen sie? Das sind Fragen, die wir in Zukunft anzusprechen hoffen.

5.2. Erfordernis taxonomischer Wiederbeschreibungen.

A. splendopleure und *A. loennbergii* sind zweifellos eine echte Art und wurde erstmals von Brüning 1929 auf der Basis von Exemplaren aus dem Gebiet um Tiko beschrieben. *A. splendopleure* und *A. loennbergii* erhielten ((are found gave?)) eine komplettere Beschreibung. Eine Lectotype und eine Paralectotype (ein Männchen und ein Weibchen) vom Tiko - Gebiet wurden im Berliner Museum hinterlegt.

Wir wissen jetzt, dass im Gebiet um Tiko drei *Chromaphyosemion* – Spezies vorkommen: *A. splendopleure*, *A. volcanum* und *A. poliaki*. Das war Brüning und Meinken nicht bekannt und es scheint angebracht, nun zu fragen, ob die Exemplare, die zur Beschreibung von *A. splendopleure* gedient haben, wirklich zu dieser Art gehören. Es ist unwahrscheinlich dass die Betrachtung präparierter Lectotypen vom Berliner Museum helfen könnten, das Problem zu lösen, weil die meisten Farbmuster, wie sie bei lebenden Tieren auftreten, verschwinden, wenn die Fische in Alkohol eingelegt werden und weil sich die Typen dadurch zu sehr ähneln. Eine andere Alternative besteht darin, sorgfältig die Beschreibung zu studieren, die durch Brüning von den lebenden Fischen angefertigt wurden. Diese Autor beschrieb einen Fisch mit purpurbau bis smaragdgrün an den Seiten. Diese Beschreibung scheidet *A. poliaki* als möglichen Kandidaten aus (*A. poliaki* hat eine dunkle Färbung, die zu braun, violett oder bronzefarben tendiert). Es gibt in der Originalbeschreibung keinen Hinweis über die Farbe des Schwanzstiels, der bei *A. volcanum* blassrosa ist.

Es ist deshalb ausgeschlossen, dass es sich bei der Lectotype von *A. splendopleure* von Berlin um ein Exemplar von *A. volcanum* handeln könnte. Notwendigerweise erscheint eine Wiederbeschreibung von *A. splendopleure* auf der Grundlage unserer heutigen Erkenntnisse über die Gruppe erforderlich.

5.3. Verbreitung der Arten

Nachdem das Meiste der Taxonomie geklärt ist, ist es möglich, die verschiedenen vorhandenen Faktoren zu betrachten, die die

Verbreitung der Arten erklären könnten. Gewöhnlich kann man einem Fisch ein Wassereinzugsgebiet zuordnen. In vielen Fällen ist es für Fische schwierig, sich von einem Becken zum andern zu bewegen und die Artverbreitungsgrenzen stimmen mit den Grenzen des Einzugsgebietes eines Flussbeckens überein. So kommen beispielsweise drei Arten in der Ntem - Drainage vor, *A. lugens*, *A. splendopleure* und *A. punctulatum*. Die Sanaga - Drainage wird ebenfalls von 3 Arten bevölkert, *A. splendopleure*, *A. loennbergii*, *A. riggenbachi*.

Große Flüsse könnten auch starke Barrieren gegen die Ausbreitung der Arten errichtet haben, weil *Chromaphyosemion* niemals in Tiefwasserzonen vorkommen oder dort, wo starke Strömung vorhanden ist. Dennoch ist leicht zu beobachten, dass große Flüsse öfter das Territorium von verschiedenen Arten durchschnitten haben: *A. riggenbachi*, *A. loennbergii*, *A. splendopleure* werden vom Sanaga River, *A. bitaeniatum* dem Niger River gekreuzt. Allerdings beobachtete Scheel (1968) bei *A. bitaeniatum* eine karyotypische Differenzierung zwischen den Populationen westlich und östlich des Niger. Diese Beobachtung legt nahe, dass diese großen Flüsse, selbst wenn sie nicht unpassierbar sind, den Genfluss reduzieren können.

Die Höhenlage ist ein anderer Faktor, der oft zur Ausbreitung der Arten herangezogen wird. *Chromaphyosemion* sind niemals oberhalb einer Höhenlage von 400 m anzutreffen, mit Ausnahme von *A. poliaki*, der in 600 m Höhe vorkommt. Mit zunehmender geographischer Höhenlage erhöht sich der Betrag der Tag – und Nachtschwankung der Temperatur, und auch die Stärke der Wasserströmung nimmt zu.

In größeren Höhenlagen wird *Chromaphyosemion* durch andere *Rivulinen* in diesen Biotopen ersetzt, wie der UG *Kathetys* im Kamerun (Scheel 1974, Amiet, 1987).

Die Vegetation könnte ein anderer Faktor sein, der die Artausbreitung beeinflusst. *Chromaphyosemion* kommen in Waldbiotopen vor, obwohl sie auch Flüsse und Bäche in abgeholzten Gebieten eingenommen haben, wie in Benin und Togo. Fische sind unter diesen Bedingungen in der Lage zu überleben, solange Wasservegetation vorhanden ist. Wir können deshalb feststellen, dass Waldbedeckung für *Chromaphyosemion* keine Voraussetzung ist.

Der Einfluss der Bodenzusammensetzung, - vulkanisch, sedimentär, Grundgebirge -, wurde von Scheel (1974) als Einflussfaktor betrachtet, aber diese Hypothese ist wiederholt widerlegt worden. *A. poliaki* wird nur auf vulkanischem Boden gefunden, das trifft aber auch für *A. volcanum* und für *A. splendopleure* auf Bioko zu. *A. riggenbachi*, nachgewiesen auf dem Grundgebirgskomplex, kommt auch über Sedimentgestein vor (Nkapa Population). *A. splendopleure* wird sowohl über Sedimenten, Vulkangestein oder über dem Grundgebirge nachgewiesen.

Der letzte gegebene Faktor, der die Artausbreitung erklären könnte, ist die Wettbewerbssituation. Außerhalb des Verbreitungsgebietes der *Chromaphyosemion* sind die Bäche und Gräben von *Aphyosemion* - Arten der Untergattungen *Paraphyosemion* (*A. gardneri* (Boulenger 1991)) im Norden und durch Arten der UG *Kathetys* ostwärts in Kamerun und in Rio Muni besetzt.

Scheel (1974) betrachtete diese Arten als ökologische Entsprechungen von *Chromaphyosemion*.

Innerhalb des Verbreitungsgebietes der *Chromaphyosemion* ist bemerkenswerter Weise zu beobachten, dass Nur eine parapatrische Verbreitung vorliegt. Wenn zwei verschiedene *Chromaphyosemion* - Arten in der gleichen Drainage vorkommen, findet man sie selten am gleichen Ort (sie bewohnen verschiedene Wasserläufe in der gleichen Drainage).

Vier vermeintliche Fälle von Sympatrie sind nur in Reiseberichten von Hobbyisten in Webseiten (<http://chromaphyosemion.killi.org>, <http://www.chromaphyosemion.com>) erwähnt worden.

Zwei wurden in der Somakak Region betreffend *A. riggenbachi* und *A. loennbergii*, in einem anderen Fall bei *A. riggenbachi* und *A. splendopleure* in der Kopongo Region genannt. Ein weiterer Fall ist von der Kribi – Bipindi Region hinsichtlich *A. cf. lugens* (*A. sp.* No6) und *A. loennbergii* (KEK 98/12, Toko Gebiet) bekannt. In vorliegender Studie ist ein Fall genannt von *A. loennbergii* und *A. splendopleure* bei Bissiang, ABC 05/32 (53). Verdacht auf natürliche Hybridisation liegt nicht vor.

Zieht man in Betracht, dass zwei oder mehr verschiedene Arten oft in der gleichen Drainage vorkommen, aber niemals in denselben Wasserläufen, so können Fälle von Sympatrie doch als extrem selten bezeichnet werden und zeigen das Auftreten einer starken Konkurrenz zwischen diesen Arten an. Das wurde bereits von Amiet (1987) hypothetisch angenommen, der solche Verbreitungsmuster beobachtete und sie „verwickelte (komplizierte) Parapatrische“ nannte. Er konnte auch die Stellvertretung der Arten untereinander (in der cameronense Gruppe) über einen Zeitraum von einem Jahr beobachten. Es ist wahrscheinlich, dass der Hauptfaktor bezüglich der Artausbreitung der innerartliche Wettbewerb ist. Diese Idee wird durch die Tatsache gestützt, dass alle *Chromaphyosemion* – Arten die gleichen Biotope bewohnen (mit Ausnahme von *A. poliaki*) und morphologisch ziemlich ähnlich sind. Die Arten unterscheiden sich hauptsächlich in der Färbung der Männchen. Es ist bekannt, dass diese Färbung sehr wichtig für den Prozess der Werbung (Balz) ist (Haesler and Seehausen, 2005) und erklärt die Tatsache, dass Hybridisation nicht auftritt. Wenn die gegenwärtige Verwandtschaft zwischen den *Chromaphyosemion* - Arten durch den Konkurrenzkampf vorangetrieben wird, so muss doch zugestanden werden, dass in der historischen Vergangenheit andere Faktoren die Hauptursache für Ausbreitung der Arten gewesen sein dürften.

5.4. Evolutionäre Geschichte der Chromaphyosemion Arten

Da die *Chromaphyosemion* Arten morphologisch so gleichartig sind, könnte man annehmen, dass sie sich erst in jüngerer geologischer Zeit entwickelt haben. Man könnte das z. B. mit den Cichliden vom Lake Victoria vergleichen, deren hauptsächlich morphologische und ethologische Differenzierung sich erst in den letzten Zehntausenden Jahren vollzogen hat (Verheyen et al., 2002). Diese extrem morphologisch divergierenden *Cichliden* - Arten sind genetisch so eng beieinander, dass es in manchen Fällen nicht möglich ist, exakt den Artstatus eines Exemplars mit genetischen Mitteln zu bestimmen (Verheyen et al., 2003). Die hier beobachteten Ergebnisse weisen darauf hin, dass selbst eindeutige (conspecific) *Chromaphyosemion* - Populationen öfters genetisch verschieden sind. Bei Nichtkenntnis von entsprechenden geologischen Daten zum Abstimmen eines molekularen Taktes (clock), ist es nicht möglich, einen Zeitrahmen für den Artbildungsprozess präzise zu bestimmen.

Trotz alledem, wenn wir die Differentiationsrate der mtDNA mit einem Bereich von 0.5 and 3% per Millionen Jahre (Hrbek and Meyer, 2003; Echelle et al., 2005) ansetzen, kann man den Ursprung des Auftretens der *Chromaphyosemion* - Arten zwischen 4 und 24 Millionen Jahren schätzen.

Die am Nahesten zur Wurzel liegenden Haplotypen (Fig. 2) sind jene, die bei *A. alpha* and *A. lugens* (einschließlich *A. cf. lugens*) beobachtet wurden. Diese Arten kommen gegenwärtig im Nordteil von Gabun sowie im Süden von Kamerun vor. Diese Gegend kann als die Wiege der Untergattung betrachtet werden.

Jedoch ist diese Hypothese zu bestätigen, weil *A. alpha* and *A. lugens* Schwestergruppen von allen anderen *Chromaphyosemion* - Arten in Fig. 3 zu sein scheinen, wenn man nur *A. ahli* als Wurzel des Baumes verwendet. Aus dieser Region hat *Chromaphyosemion* wahrscheinlich eine große Expansionsphase erfahren, die die Arten bis ins heutige Togo gebracht hat, wo *A. bitaeniatum* die nächstliegende Art im Baum verkörpert. Vor jüngerer Zeit sind die monophyletischen Arten, zusammengesetzt aus

A. punctulatum, *A. loennbergii*, *A. splendopleure*, *A. volcanum* und *A. poliaki* höchstwahrscheinlich in Kamerun entstanden. *A. punctulatum* und *A. loennbergii* sind im südlichen Teil verbreitet, während die drei anderen Arten nördlich davon vorkommen. Diese zwei monophyletischen Gruppen könnten durch Vikarianz entstanden sein. *A. volcanum* und *A. poliaki* haben sich erst in jüngerer Zeit in der Geschichte der *Chromaphyosemion* differenziert, da die *A. poliaki* – Haplotypen nicht komplett von den Haplotypen der *A. volcanum* differenziert sind (diese Gruppe ist paraphyletisch). *A. poliaki* könnte von Populationen des *A. volcanum* abstammen, der in der Lage war, sich an die Biotope am Mount Cameroon anzupassen.

Alle *Chromaphyosemion* - Arten sind Flachlandfische, so erklärt sich die Kolonisation vom Flachland zum Gebirge hin. Da die sexual selection (Geschlechterauswahl?) bei den *Chromaphyosemion* wahrscheinlich sehr intensiv erfolgt, besteht die einfachste Hypothese für die Erklärung der Artbildung in vicarianten Ereignissen.

Während klimatischer Trockenperioden konnten Populationen in voneinander getrennte Reliktpopulationen aufgegliedert werden. In dieser Zeit der Trennung kann sich möglicherweise die Färbung der Männchen im Vergleich zur gewöhnlichen Type zufällig verändert haben und wenn diese Populationen wieder in Kontakt zueinander kamen, kann das eine Durchmischung beider Populationen verhindert haben.

Während der letzten 800 000 Jahre erfuhr Afrika trocken - kalte und warm - humide Perioden (Maley, 1996a).

Afrikas Wälder waren sehr stark aufgesplittert und überlebten nur in einer Reihe relativ kleiner Refugien, die über das ursprüngliche Waldgebiet verteilt waren. Einige Refugien bestanden hypothetisch während der späten Trockenperioden des Quartär in der Region Kamerun – Gabun (Maley, 1996b). Die Mehrzahl dieser Refugien waren Gebirgswälder, weil in größeren Höhenlagen die Feuchtigkeit besser erhalten geblieben sein dürfte. Es ist unwahrscheinlich, dass die *Chromaphyosemia* in diesen Refugien überdauerten, weil sie in diesen Höhenlagen nicht überlebensfähig gewesen sein dürften.

Chromaphyosemia dürften hauptsächlich in Niederungen überlebt haben. Falls solche Refugien bestanden haben, wiesen sie höchstwahrscheinlich einen hohen Grad von Endemismus auf. Wenn wir die gegenwärtige Verbreitung der Arten und Populationen betrachten, stellt man fest, dass die Region, die sich 2 und 3 Grad N erstreckt, wenigstens 6 Arten enthält: (*A. splendopleure*, *A. loennbergii*, *A. melanogaster*, *A. punctulatum*, *A. lugens* sowie eine unbeschriebene Art *A. sp.* Rio Muni). Sie repräsentieren die Hälfte der *Chromaphyosemion* - Arten. Eine Schlussfolgerung daraus ist, dass diese Region eine Zone von Refugien der *Chromaphyosemion* während der letzten Trockenperiode und wahrscheinlich über mehrere Trockenphasen über die letzten 800 000 Jahren hinweg gewesen ist. Die Aufeinanderfolgen von trockenen und humiden Phasen waren zahlreich und führten zu vielen ausgedehnten Regressionsphasen (Rückzug des Wassers) mit Einfluss auf die Arten. Das erklärt, warum, einige Arten, wie *A. splendopleure* gegenwärtig eine diskontinuierliches Vorkommen haben, das entlang der Südküste mit *A. melanogaster* alterniert, oder die isolierte Population *A. aff. splendopleure* Ekom falls, nördlich der gegenwärtigen Verbreitung von *A. riggenbachi* (Fig. 1).

5.5 Chromosomale Evolution bei *Chromaphyosemion*.

Scheel (1972, 1974, 1990) folgend, haben sich Karyotypen von *Aplocheiloiden* durch perizentrische Inversionen und zentrische Fusionen entwickelt. Ein metazentrisches Chromosom kann durch perizentrische Inversionen in ein akrozentrisches transformiert werden. Zwei akrozentrische Chromosomen können zentrischer Fusion unterworfen sein und das reduziert die Gesamtzahl der Chromosomen. Falls diese Hypothese korrekt ist, müssten die basalen Taxa höhere Chromosomenzahlen und mehr akrozentrische Elemente aufweisen, während abgeleitete Taxa niedrigere haploide Zahlen mit symmetrischen (metazentrisch) Chromosomen besitzen müssten. Bis jetzt existieren nur Beschreibungen von *Chromaphyosemion* - Karyotypen, die lediglich aus deren Anzahl bestehen, sowie Größe und Form der Chromosomen (Scheel 1972, 1974, 1990). Völker et al. (2005) waren die „banding techniken“ verwendeten (4', 6-diamidino-2-phenylindole, Chromomycin A3, C banding, AgNO₃ staining). Selbst wenn noch einige Arten zu untersuchen sind, sollte es nun möglich sein, den Trend der Entwicklung der *Chromaphyosemion* - Karyotypen Evolution aufzuzeigen. In Fig. 4 sind die haploiden Zahlen der Chromosomen (Scheel, 1990; Völker et al., 2005) aufgezeichnet und dem Prozentsatz der zwei -armigen Chromosomen gegenüber gestellt worden (alle außer akrozentrische Chromosomen) für *A. alpha* (haploid Zahl N= 19; Zahl der Arme 26), *A. bitaeniatum* (20; 26), *A. bivittatum* (16-18; 21-23), *A. loennbergii* (17-18 (vielleicht 19); 25-27), *A. kouamense* (19;24), *A. lugens* (18; 24), *A. melanogaster* (18; 27), *A. poliaki* (19; 20), *A. riggenbachi* (10-19; 19-22), *A. splendopleure* (19; 20), *A. sp.* from Rio Muni (13-17; 22- 25), *A. volcanum* (18-19; 20). Die 17 haploiden Chromosomenzahlen reichen von 10 (*A. riggenbachi*) bis 20 (*A. bitaeniatum*), aber 15 Werte liegen zwischen 15 and 20. Proportionen von bi-armigen Chromosomen variieren von 100% (*A. riggenbachi*) bis 69% (*A. sp.* from Rio Muni). Die gleiche Trendlinie $y = -0.091x + 1.9091$ ($R^2 = 0.6497$). Ein Spearman Reihentest zeigte an, dass eine negative Korrelation zwischen der Zahl der Chromosomen und dem Prozentsatz der bi-armigen Chromosomen ($R_s = -0.570$) besteht. Somit ist die Hypothese von Scheel (1990) über die Karyotypen - Evolution in dieser Gruppe von Arten kongruent mit diesen Beobachtungen. Allerdings wird es schwierig sein, aus Karyotypendaten zu schlussfolgern auf die phyletische Verwandtschaft der *Chromaphyosemion*, weil man ursprüngliche Arten und abgeleitete nicht durch ihre Karyotypbeschreibung trennen kann. Außerdem weisen einige Arten einen hohen Grad von karyotypischer Variabilität auf, wie *A. riggenbachi* (N=10-19; Zahl der metazentrischen = 0-10) oder *A. loennbergii* (N=16-18 (vielleicht 19); Zahl der metazentrischen = 7- 11). Zieht man diese wichtige Variabilität in Betracht, sollte die karyotypische Evolution bei *Chromaphyosemion* auf intraspezifischen Level studiert werden und als komplexer Mechanismus betrachtet werden.

Bildunterschriften.

Fig. 1. Karte von Westafrika, zeigend das annähernde Verbreitungsgebiet der zwölf Arten der UG *Chromaphyosemion* (graue Zone in der kleinen Karte) mit Sammelpunkten. Weiße Kreise: Örtlichkeiten von Aufsammlungen in der Natur für diese Studie; Schwarze Kreise: Fundorte von Aquarienstämmen. Selbst wenn Vorkommensgebiete sich überlappen, sind die verschiedenen Arten nicht sympatrisch mit Ausnahme von 5 Lokalitäten (nicht angezeigt in der Karte). Die isolierte Population von *A. aff. splendopleure* Ekom falls (hier nicht studiert) ist durch einen Stern angegeben. Das Fragezeichen weist auf eine Zone hin, wo *Chromaphyosemion* wahrscheinlich vorkommt, wo aber noch niemals infolge des Fehlens von Straßen aufgesammelt wurde. Die hypothetische Refugiumszone ist schwarz gezeichnet.

Fig. 2. Consensus tree based on distance, maximum likelihood, maximum parsimony, and Bayesian inference methods. Numbers above the branches are percentages of bootstrap values based on 500 replicates for each method (except for Bayesian inferences where the numbers represent the percentage of trees with best likelihood scores in which the particular node was found). Values below 50% are not shown. *Fundulopanchax* species (a monophyletic genus according to Murphy and Collier 1999a) were used to root the trees. *Chromaphyosemion* species formed a monophyletic group (bootstrap values ranged from 67% to 75%). *Aphyosemion* (excepted *A. hera*) and *Fundulopanchax* sequences used are the same than those used in Murphy and Collier (1999) and are available in GenBank., CAL, *calliurnum* group; CAM, *cameronense* group; COL, *coeleste* group; ELE, *elegans* group; EXI, *exiguum* group; GEO, *georgiae* group; STR, *striatum* group; UG, ungrouped species.

Fig. 3. Consensus tree based on distance method, maximum likelihood, maximum parsimony and Bayesian inference methods. Numbers above or below the branches are percentages of bootstrap values based on 500 replicates for each method (except for

Bayesian inferences where the numbers represent the percentage of trees with best likelihood scores in which the particular node was found). Only bootstrap values with maximum parsimony method are given for intra-species nodes. Values below 50% are not shown. *Aphyosemion ahli* was used to root the different networks. Numbers correspond to sample location on the map (Fig. 1). When more than one specimen were sequenced from the same location, they have been noted a,b,c, etc. References of specimens collected at location 53 where two different species have been identified are underlined.

Fig. 4. scatter plot of the number of chromosomes versus the percentage of bi-armed chromosomes for the 17 *Chromaphyosemion* karyotypes that have been studied (Scheel 1974, 1990, Völker et al., 2005). Species identifications for Scheel (1974, 1990) karyotypes do not necessarily follow this author as taxonomy has changed since 1990. In most of the cases it was possible to precisely determine what species Scheel (1974, 1990) did karyotype. When it was not possible to unambiguously determine the species, data are presented with a question mark. ALP *A. alpha*, BIT *A. bitaeniatum*, BIV *A. bivittatum*, KOU *A. kouamense*, LUG *A. lugens*, RIG *A. riggenbachi*, LOE *A. loennbergii*, LOE? doubtful status (*A. splendopleure* ?), MEL *A. melanogaster*, PLK *A. poliaki*, SPP *A. splendopleure*, SP? undescribed species from Rio Muni (not necessarily identical to GEMHS 00/32), VOL *A. volcanum*. The equation of the trend line is $y = -0.091x + 1.9091$. There is a statistically significant relationship (Spearman test) between these two variables.