

**Identification par barcode (séquences nucléotidiques d'un fragment du gène du cytochrome *b*) des larves de Lethrinidae capturées en baies de Dumbéa et Ouano (Nouvelle-Calédonie)**

**Philippe Borsa<sup>1,\*</sup>, Sarah Lemer<sup>1,2</sup>, Wei-Jen Chen<sup>3,4</sup>, Adeline Collet<sup>1</sup>,  
Laure Carassou<sup>1,2</sup>, Dominique Ponton<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institut de recherche pour le développement, UR 128, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

<sup>2</sup> Contrat ADéCal / ZoNéCo, Nouméa

<sup>3</sup> Department of Biology, Saint Louis University, St. Louis MO, U.S.A.

<sup>4</sup> Institute of Oceanography, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

\* Correspondance : philippe.borsa@ird.fr

Borsa P., Lemer S., Chen W.-J., Collet A., Carassou L., Ponton D. 2009. - Identification par barcode (séquences nucléotidiques d'un fragment du gène du cytochrome b) des larves de Lethrinidae capturées en baies de Dumbéa et Ouano (Nouvelle-Calédonie). Rapport d'opération ZoNéCo. IRD, Nouméa, 60 pp.

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| <b>Résumé</b> .....   | 5  |
| <b>Abstract</b> .....   | 5  |
| <b>1 Introduction</b> .....   | 6  |
| <b>2 Matériels et méthodes</b> .....  | 13 |
| 2.1 <i>Adultes de référence</i> .....   | 13 |
| 2.2 <i>Echantillonnage des juvéniles</i> .....  | 15 |
| 2.3 <i>Echantillonnage des larves</i> .....   | 15 |
| 2.4 <i>Extraction de l'ADN</i> .....  | 15 |
| 2.5 <i>Amplification de l'ADN mitochondrial</i> .....   | 15 |
| 2.6 <i>Analyse des données de séquence</i> .....  | 17 |
| <b>3 Résultats</b> .....  | 21 |
| 3.1 <i>Tri préalable des larves destinées aux analyses génétiques</i> .....   | 21 |
| 3.2 <i>Arbre des séquences</i> .....  | 21 |
| 3.3 <i>Identification des larves à l'espèce</i> .....   | 24 |
| <b>4 Discussion</b> .....   | 24 |
| 4.1 <i>Discussion des résultats acquis antérieurement</i> .....   | 24 |
| 4.2 <i>Propriétés des marqueurs mitochondriaux comme barcodes</i> .....   | 27 |
| 4.3 <i>Fiabilité des identifications à l'aide du marqueur cytb</i> .....  | 28 |
| 4.4 <i>Possibles espèces cryptiques chez les Lethrininae et confirmation d'espèces cryptiques chez les Monotaxinae</i> .. | 29 |
| 4.5 <i>Prospective de recherche et recommandations</i> .....  | 30 |
| <b>Remerciements</b> .....  | 31 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....  | 31 |
| <b>Annexes</b> .....  | 37 |
| <i>Annexe 1</i> .....   | 37 |
| <i>Annexe 2</i> .....   | 45 |
| <i>Annexe 3</i> .....   | 47 |
| <i>Annexe 4</i> .....   | 48 |



## Résumé

Identification par barcode (séquences nucléotidiques d'un fragment du gène du cytochrome *b*) des larves de Lethrinidae capturées en baies de Dumbéa et Ouano (Nouvelle-Calédonie). -

On ne dispose que de très peu de descriptions des larves de Lethrinidae, qui forment pourtant une famille d'importance écologique majeure dans les écosystèmes récifo-lagonaires de l'Indo-Pacifique tropical. Il s'agit aussi d'espèces commerciales recherchées pour la consommation humaine dans toute la région. Nous présentons ici les séquences nucléotidiques d'un fragment (315 paires de bases) du gène du cytochrome *b* utilisées comme barcodes pour 24 espèces de Lethrinidae présentes en Nouvelle-Calédonie. Une base de données de référence est établie à partir des séquences de spécimens adultes identifiés de façon formelle. La présence de trois espèces cryptiques chez les Monotaxinae est confirmée. Plusieurs espèces chez les Lethrininae montrent de très fortes différences mitochondriales selon leur origine géographique. Les identifications à l'espèce de 11 juvéniles de Lethrininae (*Lethrinus genivittatus*, *L. barak* et *L. variegatus*) collectés dans le lagon sud ouest sont validées. Tous les individus d'un échantillon de 31 larves de Lethrininae collectées à l'aide de pièges lumineux dans les baies de Dumbéa et Ouano sont identifiés par barcoding au locus du cytochrome *b*. Les six espèces suivantes ont ainsi été identifiées sans ambiguïté : *Lethrinus genivittatus*, *L. barak*, *L. miniatus*, *L. nebulosus*, *L. olivaceus* et *L. variegatus*. Le présent travail est une étape vers la détermination des caractères morphologiques le plus discriminants entre ces dernières.

## Abstract

Cytochrome-*b* barcoding of Lethrinidae larvae from the Dumbéa and Ouano bays, New Caledonia. – Very few descriptions of Lethrinidae larvae are available, although Lethrinidae are of high ecological importance in the reef and lagoon ecosystems of the tropical Indo-Pacific. They are also commercial species of importance to human consumption throughout the region. Here we present the nucleotide sequences of a fragment (315 base pairs) of the cytochrome *b* gene, used as barcode for 24 Lethrinidae species that occur in New Caledonia. A reference genetic database was established from the nucleotide sequences of adult specimens whose identification was certified. The occurrence of three cryptic Monotaxinae species was confirmed. Several Lethrininae species showed strong genetic differences according to their geographic origin. The identification to species of 11 juvenile Lethrinidae (*Lethrinus genivittatus*, *L. barak* et *L. variegatus*) collected in the South-West lagoon was validated. All individuals in a sample of 31 larvae sampled using light traps in the Dumbéa and Ouano bays were identified by cytochrome *b* barcoding. The following 6 species were identified without ambiguity: *Lethrinus genivittatus*, *L. barak*, *L. miniatus*, *L. nebulosus*, *L. olivaceus* and *L. variegatus*. The present work is a step toward determining the morphological characters that best discriminate among the latter species.

## 1 Introduction

Les poissons Lethrinidae (« bossus » et « becs de cane ») sont représentés en Nouvelle-Calédonie par une vingtaine d'espèces (Tableau 1), reconnues selon la dernière révision en date (Carpenter & Allen 1989). Ces poissons occupent l'ensemble des habitats des écosystèmes récifo-lagonaires, des petits fonds de baies abritées au front du récif, jusqu'à 100 m de profondeur ou davantage. Plusieurs types trophiques sont représentés, comme l'indiquent la dentition et la forme du corps, liées au régime alimentaire et au comportement de prédation (Lo Galbo et al 2002). Pour la plupart des espèces, il s'agit de poissons de grande taille, certains très appréciés des pêcheurs à la ligne (Coleman 1981 ; Allen 1997). Les Lethrinidae comptent parmi les principales espèces récifo-lagonaires commercialisées pour leur chair : ils sont communs sur les étals des marchés aux poissons dans tout l'Indo-Pacifique [Carpenter & Allen 1989 ; Carpenter 2001 ; Ebisawa & Ozawa 2009 ; P. Bearez (MNHN) comm. pers. ; P. Boblin (SPC) comm. pers. ; P.B. obs. pers.]. Au marché de Nouméa, les Lethrinidae comptent parmi les principales espèces proposées à la vente : il s'agit principalement du bec de cane (*Lethrinus nebulosus*), mais aussi du gueule-rouge (*L. miniatus*), du bec de cane malabar (*L. olivaceus* selon la taxonomie actuelle), des bossus blancs *Gymnocranius euanus* et *G. grandoculis*, de la brème olive (*Wattsia mossambica*) et accessoirement du bossu d'herbe (*L. baraké*), du bossu doré (*L. atkinsoni*), du gueule-d'acier (*L. xanthochilus*) et du bossu gros-yeux (*Monotaxis grandoculis* selon la taxonomie actuelle), ainsi que d'autres espèces plus rares [Borsa et al. 2009 ; X. Capecchi, D. Deschamps, P. Morlet, P. Ollivier et L. Olonde (marché de Nouméa) comm. pers. ; J.-L. Justine (IRD) comm. pers. ; P.B. et A.C. obs. pers.].

Face à la surexploitation par la pêche, déjà soupçonnée, en particulier, chez le bec de cane en Nouvelle-Calédonie (Labrosse et al. 2000 ; Poignonec 2007 ; Borsa et al. 2009), il est souhaitable de mettre en place des mesures de gestion. Pour cela, il est nécessaire d'acquérir une connaissance approfondie de la biologie et de l'écologie des espèces exploitées, non seulement au stade adulte, mais aussi au stade larvaire. En effet, les exigences écologiques des larves sont généralement très différentes de celles des adultes, avec une utilisation différente des habitats. La gestion raisonnée des espèces exploitées passe donc aussi par une connaissance approfondie de leur écologie, à tous les stades du cycle vital. Or, qu'il s'agisse de l'étude des espèces au cas par cas ou de l'analyse écologique des communautés, qui est une autre approche souhaitable en préalable à la prise de décision, il est indispensable de pouvoir identifier chaque individu échantillonné à l'espèce (voir Valentini et al. 2008). Bien que les Lethrinidae soient reconnus comme un groupe taxonomiquement difficile (Smith 1959 ; Sato 1978, 1986 ; Carpenter & Allen 1989 ; Carpenter & Randall 2003), l'identification des adultes à l'espèce est considérablement facilitée depuis la dernière révision en date, celle de Carpenter & Allen (1989). En revanche, on ne dispose que de très peu de descriptions de leurs larves (Wilson 1998 ; Leis & Carson-Ewart 2000 ; Borsa et al. 2005). Si les larves de Lethrinidae étudiées par Borsa et al. (2005) ont pu être identifiées à l'espèce sur la base de leurs empreintes génétiques multi-locus, les quelques descriptions de larves faites par Wilson (1998) n'avaient fait l'objet d'aucune validation formelle, si bien que les clés d'identification les plus récentes (Leis & Carson-Ewart 2000) ne descendent toujours pas plus bas que la sous-famille.

Les résultats que nous avons acquis à ce jour sur l'identification des larves de Lethrinidae à l'aide de marqueurs génétiques ont été publiés sous la forme de rapports ZoNéCo (Borsa et al. 2005 ; 2006b ; Tableaux 2 et 3) ainsi que d'un poster présenté au colloque BioDec (Nouméa, 30 octobre -04 novembre 2006) (Fig. 1). Ils concernaient la première série d'échantillons de larves, piégées en 2002 - 2003 dans les

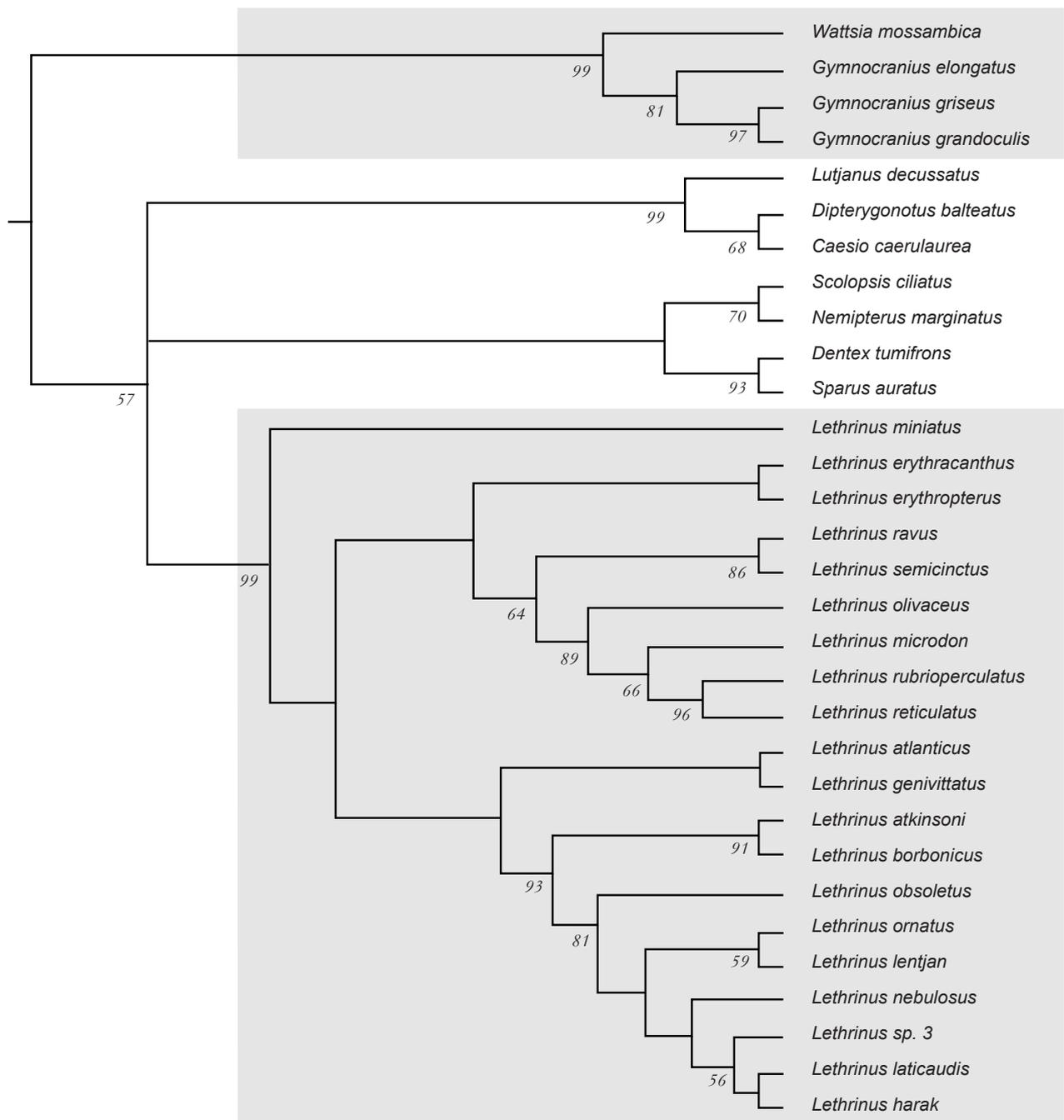
baies autour de Nouméa. Les empreintes génétiques sur la base des génotypes multi-locus à un locus mitochondrial et 4-5 locus introniques avaient abouti à des caractères diagnostiques pour la plupart des espèces testées et à l'identification de trois espèces de Lethrinidae au stade larvaire, avec une série de tailles relativement complète pour *L. genivittatus*, la plus abondante d'entre elles dans les échantillons (Borsa et al. 2005).

Les travaux présentés ici sont une continuation des travaux réalisés précédemment pour ZoNéCo (Borsa et al. 2005 ; 2006b), cette fois-ci sur la nouvelle série de larves piégées en baie de Ouano et en baie de Dumbea entre septembre 2005 et février 2006 (Carassou et al. 2008). Entre-temps, nous avons décidé d'abandonner les techniques de génotypage initialement utilisées au laboratoire de génétique de l'IRD Nouméa, par deux d'entre nous (P.B., A.C.), au profit des séquences de l'ADN mitochondrial. Les techniques initiales comprenaient une étape d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide vertical avec des temps de migration compris entre 4 heures et 10 heures consécutifs à une phase de préparation du gel et de chargement d'une paire d'heures au minimum, et une phase de coloration délicate ( $\text{AgNO}_3$ ), qui pouvait prendre jusqu'à plus d'une heure, ce qui conduisait à des journées de travail de 10 à 15 heures voire davantage lorsqu'il fallait recommencer la coloration. L'autre possibilité était de commencer l'expérience en début de soirée, laisser migrer les ADN durant la nuit et récupérer le gel le lendemain, sans avoir toutefois la possibilité de surveiller le bon déroulement de la migration ni d'être en mesure d'intervenir en cas de problème (arc électrique p. ex.). Fastidieuses, ces expériences étaient aussi dangereuses pour la santé, puisque certains des produits manipulés, comme l'acrylamide, la formamide, le formaldéhyde et le méthanol sont reconnus comme nocifs, s'agissant les uns de neurotoxiques, les autres de mutagènes et de cancérigènes (Solomons & Cochrane 1984 ; Kruse 1992 ; Deng et al. 1993 ; Anonyme 2002). Pour cette nouvelle opération de recherche, nous avons choisi d'analyser les séquences nucléotidiques d'un fragment du gène du cytochrome *b*. Le choix de ce marqueur était motivé, comme nous l'expliquons ci-après, par l'existence des travaux de Lo Galbo et al. (2002), basés sur la séquence complète du gène, ainsi que par l'expérience que nous en avons chez d'autres groupes de poissons, comme les Berycidae, les Carangidae, les Siganidae et les Soleidae (Hoarau & Borsa 2000 ; Borsa & Quignard 2001 ; Perrin & Borsa 2001 ; Borsa 2003 ; Rohfritsch & Borsa 2005 ; Akimoto et al. 2006 ; Lemer et al. 2007) : dans tous les cas, ce marqueur s'était avéré être diagnostique des espèces, tout en restant suffisamment polymorphe au niveau infra-spécifique pour être utile dans l'analyse de la variabilité géographique. Le gène du cytochrome *b* est par ailleurs très informatif pour la phylogénie au sein des familles chez les perciformes (Allegrucci et al. 1999 ; Lo Galbo et al. 2002 ; Orrell et al. 2002 ; Klanten et al. 2004 ; Kuriwa et al. 2007), ce qui en faisait un bon candidat pour le barcoding.

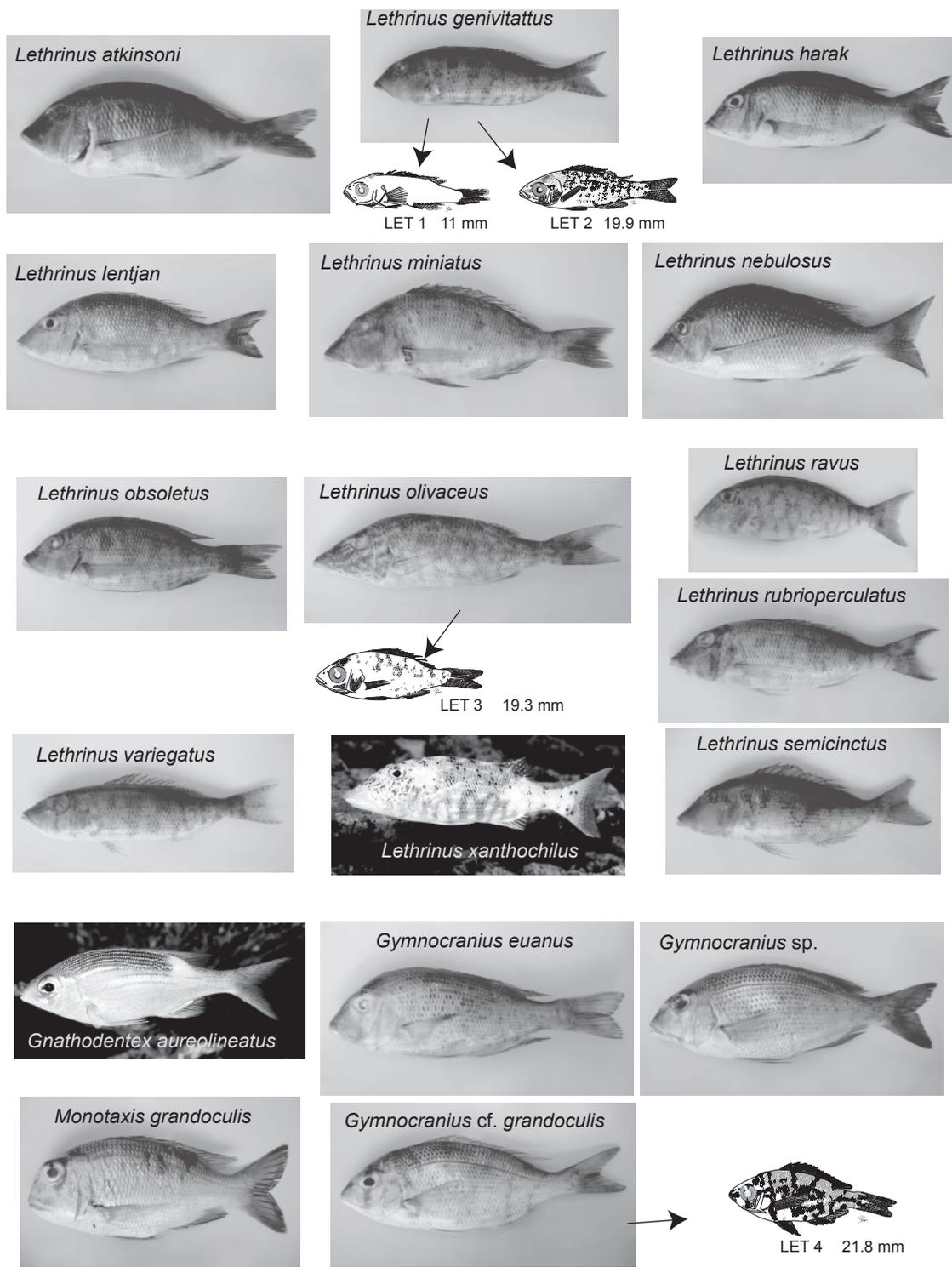
Au même moment, le programme mondial de barcoding des poissons, FishBOL, était lancé (Ward et al. 2005 ; 2009). Le marqueur choisi pour FishBOL s'est trouvé ne pas être le gène du cytochrome *b* mais un autre gène mitochondrial, celui de la cytochrome-oxydase I (*cox-I*). Bien que des échanges par mail avec R.D. Ward (CSIRO, Hobart) nous aient convaincus de l'intérêt de se lancer dans l'aventure FishBOL, les acquis relatifs à la phylogénie des Lethrinidae, publiée peu avant par Lo Galbo et al. (2002) sur la base des séquences du gène du cytochrome *b* (Fig. 1), imposaient logiquement de conserver ce dernier marqueur pour notre étude sur cette famille. Notre idée était en effet de pouvoir comparer les séquences obtenues sur les Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie, à celles obtenues ailleurs dans l'Indo-Pacifique par Lo Galbo et al. (2002) et d'initier des recherches sur la phylogéographie des différentes espèces de ce groupe à l'échelle de l'Indo-Pacifique. Ceci ne pouvait être fait avec le marqueur *cox-I*, insuffisamment variable au

**Tableau 1** Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie : liste des espèces [nommées selon Carpenter & Allen (1989) et Carpenter & Randall (2003)], types trophiques et distribution géographique (Carpenter & Allen 1989 ; Carpenter & Randall 2003 ; Fricke & Kulbicki 2007). Note : à ce jour, nous n'avons observé ni *Gymnocranius elongatus*, ni *Lethrinus erythracanthus*, ni *L. laticaudis* en Nouvelle-Calédonie

| Espèce                            | Auteur                    | Régime alimentaire                        | Distribution connue   |
|-----------------------------------|---------------------------|---|---|
| <i>Gnathodentex aureolineatus</i> | (Lacepède, 1802)          | Invertébrés benthiques                    | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines (à l'exclusion de la Mer Rouge) au Pacifique central (à l'exclusion des îles Hawaïi)  |
| <i>Gymnocranius audleyi</i>       | Ogilby, 1916              | Invertébrés benthiques                    | Mer de Corail, du récif de la Grande Barrière aux îles Chesterfield   |
| <i>Gymnocranius elongatus</i>     | Senta, 1973               | Invertébrés benthiques                    | Indo-ouest Pacifique tropical, des côtes africaines (à l'exclusion de la Mer Rouge et de la mer d'Oman) au Pacifique ouest, du Japon à la mer de Corail   |
| <i>Gymnocranius euanus</i>        | Günther, 1879             | Petits gastéropodes benthiques            | Nord-ouest australien et Pacifique tropical ouest, du sud du Japon à la mer de Chine du sud et de la mer de Sulu aux Tonga  |
| <i>Gymnocranius grandoculis</i>   | (Valenciennes, 1830)      | Petits poissons et invertébrés benthiques | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines (à l'exclusion de la Mer Rouge) au Pacifique central (à l'exclusion des îles Hawaïi) et sud-est   |
| <i>Gymnocranius</i> sp.           | -                         | Petits mollusques benthiques              | Anti-équatoriale : sud du Japon et du nord-ouest australien au récif de la Grande Barrière et à la Nouvelle-Calédonie   |
| <i>Lethrinus atkinsoni</i>        | Seale, 1909               | Poissons et invertébrés                   | Indo-Pacifique équatorial, de Sumatra aux Tuamotu et Pacifique ouest tropical, du sud du Japon à la Nouvelle-Calédonie  |
| <i>Lethrinus erythracanthus</i>   | Valenciennes, 1830        | Invertébrés                               | Disjointe : côtes est-africaines et Maldives-Chagos et ouest-Pacifique tropical, des Ryukyu à la mer de Chine du sud, la mer de Banda et la Micronésie et du nord-ouest australien aux Tuamotu            |
| <i>Lethrinus genivittatus</i>     | Valenciennes, 1830        | Petits poissons et crustacés              | Zone centrale Indo-ouest Pacifique, d'Aceh à l'ouest australien et du sud du Japon à la Micronésie et la Nouvelle-Calédonie   |
| <i>Lethrinus harak</i>            | (Forsskål, 1775)          | Petits poissons et invertébrés            | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines aux Samoa   |
| <i>Lethrinus laticaudis</i>       | Alleyne & Macleay, 1877   | Poissons et crustacés                     | Moitié sud de la zone centrale Indo- ouest Pacifique, de la mer de Timor à l'ouest australien et de la mer des Salomon à la Nouvelle-Calédonie  |
| <i>Lethrinus lentjan</i>          | (Lacepède, 1802)          | Poissons et invertébrés                   | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines aux Tonga   |
| <i>Lethrinus miniatus</i>         | (Schneider, 1801)         | Poissons et invertébrés                   | Anti-équatoriale : Ryukyu - Philippines et moitié nord de l'Australie, de la côte ouest-australienne à la mer de Corail (du sud du récif de la Grande Barrière à la Nouvelle-Calédonie)                   |
| <i>Lethrinus nebulosus</i>        | (Forsskål, 1775)          | Invertébrés et poissons                   | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines aux Samoa   |
| <i>Lethrinus obsoletus</i>        | (Forsskål, 1775)          | Invertébrés                               | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines aux Samoa   |
| <i>Lethrinus olivaceus</i>        | Valenciennes, 1830        | Poissons, crustacés et céphalopodes       | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines aux Tuamotu-Gambier   |
| <i>Lethrinus ravus</i>            | Carpenter & Randall, 2003 | -   | Anti-équatoriale dans l'Indo-ouest-Pacifique tropical : des Ryukyu à la mer de Sulu et du nord-ouest australien aux îles Loyauté  |
| <i>Lethrinus rubrioperculatus</i> | Sato, 1978                | Poissons et invertébrés                   | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines (à l'exclusion de la Mer Rouge) au Pacifique central (à l'exclusion des îles Hawaïi)  |
| <i>Lethrinus semicinctus</i>      | Valenciennes, 1830        | Invertébrés benthiques et petits poissons | Sri Lanka et zone centrale Indo- ouest Pacifique, de la mer de Chine du sud au nord-ouest australien et des Ryukyu à la Micronésie et à la Nouvelle-Calédonie   |
| <i>Lethrinus variegatus</i>       | Valenciennes, 1830        | Petits invertébrés benthiques             | Disjointe : Océan Indien ouest et Sri Lanka ; zone centrale Indo- ouest Pacifique, des Ryukyu au nord-ouest australien et des Ryukyu à Palau et à la Nouvelle-Calédonie                                   |
| <i>Lethrinus xanthochilus</i>     | Klunzinger, 1870          | Poissons et invertébrés                   | Disjointe : Océan Indien ouest et Indo- ouest Pacifique, des Ryukyu à la mer de Java et la mer de Timor et le long de l'équateur, de l'Indo-Malaisie à la Micronésie et de la mer de Corail aux Marquises |
| <i>Monotaxis grandoculis</i>      | (Forsskål, 1775)          | Invertébrés benthiques                    | Indo-Pacifique tropical, des côtes africaines au Pacifique central (y compris Hawaïi)   |
| <i>Wattisia mossambica</i>        | (Smith, 1957)             | Invertébrés benthiques et petits poissons | Indo-ouest Pacifique tropical, des côtes africaines à l'Indo-Malaisie et du sud du Japon à la Nouvelle-Calédonie  |



**Fig. 1.** Phylogénie mitochondriale (locus du cytochrome *b*) des espèces de la famille des Lethrinidae : arbre de parcimonie des séquences (modifié d'après Lo Galbo et al. 2002). Les nombres désignent les pourcentages d'occurrence des noeuds en vis-à-vis, après ré-échantillonnage par bootstrap. Les plages grisées correspondent aux deux sous-familles des Lethrinidae, les Monotaxinae (représentés par 4 espèces des genres *Wattsia* et *Gymnocranius*) et les Lethrininae (représentées par 20 espèces du genre *Lethrinus*). Les autres espèces utilisées pour la construction de l'arbre représentent les Lutjanidae, Nemipteridae et Sparidae, choisis comme groupes externes. L'arbre est raciné par deux espèces du genre *Morone*, représentant la famille des Moronidae



**Fig 1** Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie : présentation des espèces et dessins des larves identifiées à l'aide de marqueurs génétiques lors de la première année de l'opération ZoNéCo "Jeunes poissons". Cette planche a été présentée sous forme de poster lors du colloque BioDec (Borsa et al. 2006a)

niveau infra-spécifique (Ward et al. 2008a ; 2009). De plus, l'échantillonnage de Lo Galbo et al. (2002) comprenait plusieurs espèces qu'alors nous n'avions pu encore échantillonner en Nouvelle-Calédonie (*Gymnocranius elongatus*, *Lethrinus laticaudis*, *Wattsia mossambica*) ni ailleurs dans l'Indo-Pacifique. Les séquences obtenues sur ces espèces par Lo Galbo et al. (2002), ainsi que d'autres auteurs (Orrell & Carpenter 2004 ; Yamanoue et al. 2007) permettaient avantageusement de compléter le jeu de séquences de la présente étude.

Les fréquences des phénotypes SSCP au locus de l'ARNr 16S, ainsi que les fréquences alléliques à cinq locus introniques sur 21 espèces de Lethrinidae analysées précédemment (Borsa et al. 2005 ; 2006b) sont présentées aux Tableaux 2 et 3. Trois espèces cryptiques de *Gymnocranius* avaient été détectées à partir de la distribution des génotypes aux locus nucléaires et des corrélations entre génotypes à différents locus. Celles-ci sont maintenant désignées ici sous les noms provisoires *Gymnocranius* sp. A, sp. B et sp. C. En nous basant sur les clés d'identification disponibles (Sato 1986 ; Carpenter & Allen 1989), nous (Borsa et al. 2006a, b) avons initialement confondu l'espèce *G.* sp. A avec *G. grandoculis* et les espèces *G.* sp. B et *G.* sp. C avec le « *Gymnocranius* sp. » de Sato (1986), qui reste, à ce jour, non décrit. La description formelle de *Gymnocranius* sp. A et sp. B, sur la base de spécimens collectés en Nouvelle-Calédonie, est en cours (Borsa et al., en préparation b). La description formelle de *Gymnocranius* sp. C ne peut être entreprise pour le moment, du fait de l'absence de spécimens de référence.

La présente étude porte sur un échantillon de 24 espèces de Lethrinidae présentes dans les eaux littorales de la Nouvelle-Calédonie. Cet échantillon inclut les 21 espèces analysées antérieurement par Borsa et al. (2005 ; 2006a, b).

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Adultes de référence

L'échantillon de référence pour la présente étude comprend des spécimens adultes ou sub-adultes de 24 espèces de Lethrinidae, incluant les 21 espèces analysées antérieurement (Tableau 4). Au total, toutes les espèces rapportées de Nouvelle-Calédonie sont représentées dans notre échantillon de référence. Pour la plupart des espèces, les spécimens proviennent du marché de Nouméa où ils ont été échantillonnés par P.B. et A.C. Trois espèces (*Gymnocranius elongatus*, *Lethrinus erythracanthus* et *L. laticaudis*), que la littérature mentionne comme présentes dans les eaux de la Nouvelle-Calédonie (Carpenter & Allen 1989 ; Carpenter 2001 ; Bearez 2003 ; Fricke & Kulbicki 2007), n'ont jamais été observées sur les étals ou lors de pêches expérimentales ou en plongée autour de la Nouvelle-Calédonie, par aucun de nous. Nous avons utilisé, pour *L. erythracanthus*, un spécimen adulte originaire de la région de Makassar (Célèbes, Indonésie). Des spécimens utilisés par Lo Galbo et al. (2002), Orrell & Carpenter (2004) et Yamanoue et al. (2007) permettent de compléter la liste. Plusieurs des spécimens de référence originaires de la Nouvelle-Calédonie ont été déposés au Museum national d'histoire naturelle, Paris (Tableau 4). D'autres spécimens de référence utilisés ici, dont les séquences ont été obtenues via GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sont en collection dans diverses institutions en Australie et aux Etats-Unis (Tableau 4).



**Tableau 2** (suite et fin)

| Locus,<br>Haplotype | Species |      |                   |      |      |       |       |      |                   |      |      |      |      |      |
|---------------------|---------|------|-------------------|------|------|-------|-------|------|-------------------|------|------|------|------|------|
|                     | Latk    | Lera | Lgen <sup>a</sup> | Lhar | Llen | Lmin  | Lneb  | Lobs | Loli <sup>a</sup> | Lrav | Lrub | Lsem | Lvar | Lxan |
| <i>Met-1</i>        |         |      |                   |      |      |       |       |      |                   |      |      |      |      |      |
| 842                 | nd      | nd   | -                 | nd   | nd   | 0.05  | -     | nd   | -                 | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 964                 | nd      | nd   | -                 | nd   | nd   | -     | -     | nd   | -                 | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 1000                | nd      | nd   | -                 | nd   | nd   | 0.95  | -     | nd   | -                 | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 1011                | nd      | nd   | 1.00              | nd   | nd   | -     | -     | nd   | -                 | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 1013                | nd      | nd   | -                 | nd   | nd   | -     | 1.00  | nd   | -                 | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 1014                | nd      | nd   | -                 | nd   | nd   | -     | -     | nd   | 1.00              | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| ( <i>n</i> )        | nd      | nd   | (40)              | nd   | nd   | (114) | (202) | nd   | (34)              | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| <sup>^b</sup>       | nd      | nd   | 0.00              | nd   | nd   | 0.10  | 0.00  | nd   | 0.00              | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |

<sup>a</sup> Comprend 136 (Lgen) et une (Loli) larves identifiées a posteriori à l'espèce, à partir de leurs génotypes multi-locus

**Tableau 3** Récapitulatif des résultats antérieurs (Borsa et al. 2005 ; 2006b) : fréquences haplotypiques au locus mitochondrial de l'ARN 16S (polymorphisme SSCP) et à trois locus nucléaires introniques (polymorphismes de longueur) chez sept espèces de Monotaxinae présentes en Nouvelle-Calédonie. Abréviations : Gaur *Gnathodentex aureolineatus* ; Geua *Gymnocranius euanus* ; Ggra *G. grandoculis* ; GspA *Gymnocranius* sp. A ; GspB *Gymnocranius* sp. B ; GspC *Gymnocranius* sp. C ; Mgra *Monotaxis grandoculis*. *n* taille de l'échantillon d'haplotypes (entre parenthèses) ;  $\hat{h}$  diversité génétique, estimée à partir des fréquences haplotypiques ( $x_i$ ) :  $\hat{h} = n/(n-1).(1-\sum_i x_i^2)$  ; *nd* données absentes

| Locus,<br>Haplotype | Species |      |      |                      |      |                   |      |
|---------------------|---------|------|------|----------------------|------|-------------------|------|
|                     | Gaur    | Geua | Ggra | GspA <sup>a, b</sup> | GspB | GspC <sup>c</sup> | Mgra |
| <i>16S RNA</i>      |         |      |      |                      |      |                   |      |
| <i>M</i>            | 0.80    | -    | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>M2</i>           | 0.10    | -    | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>M3</i>           | 0.10    | -    | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>A''</i>          | -       | 1.00 | -    | 1.00                 | 0.94 | 1.00              | -    |
| <i>H</i>            | -       | -    | 1.00 | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>H3</i>           | -       | -    | -    | -                    | 0.06 | -                 | -    |
| <i>A</i>            | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 0.22 |
| <i>A2</i>           | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 0.11 |
| <i>A3</i>           | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 0.22 |
| <i>A4</i>           | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 0.11 |
| <i>A5</i>           | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 0.33 |
| ( <i>n</i> )        | (10)    | (12) | (5)  | (6)                  | (17) | (2)               | (9)  |
| $\hat{h}$           | 0.38    | 0.00 | 0.00 | 0.00                 | 0.12 | 0.00              | 0.87 |
| <i>Aldo-B fast</i>  |         |      |      |                      |      |                   |      |
| <i>1007</i>         | 1.00    | 1.00 | 1.00 | -                    | 1.00 | 1.00              | 1.00 |
| <i>1017</i>         | -       | -    | -    | 1.00                 | -    | -                 | -    |
| ( <i>n</i> )        | (18)    | (20) | (10) | (12)                 | (32) | (4)               | (14) |
| $\hat{h}$           | 0.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00                 | 0.00 | 0.00              | 0.00 |
| <i>CK-6</i>         |         |      |      |                      |      |                   |      |
| <i>140</i>          | -       | -    | -    | 1.00                 | -    | 0.25              | -    |
| <i>142</i>          | -       | -    | 0.38 | -                    | 1.00 | 0.75              | -    |
| <i>144</i>          | -       | 1.00 | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>145</i>          | -       | -    | 0.63 | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>147</i>          | -       | -    | -    | -                    | -    | -                 | 1.00 |
| <i>190</i>          | 0.20    | -    | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| <i>200</i>          | 0.80    | -    | -    | -                    | -    | -                 | -    |
| ( <i>n</i> )        | (20)    | (24) | (8)  | (12)                 | (34) | (4)               | (14) |
| $\hat{h}$           | 0.34    | 0.00 | 0.52 | 0.00                 | 0.00 | 0.50              | 0.00 |
| <i>GnRH-1</i>       |         |      |      |                      |      |                   |      |
| <i>968</i>          | -       | -    | 0.20 | -                    | 0.12 | -                 | -    |
| <i>984</i>          | -       | -    | 0.10 | -                    | 0.06 | -                 | -    |
| <i>992</i>          | -       | -    | 0.10 | 0.42                 | 0.18 | 0.50              | -    |
| <i>1000</i>         | -       | 0.50 | 0.50 | -                    | 0.26 | -                 | -    |
| <i>1008</i>         | 1.00    | 0.50 | 0.10 | 0.58                 | 0.38 | 0.50              | 1.00 |
| ( <i>n</i> )        | (20)    | (20) | (10) | (12)                 | (34) | (4)               | (14) |
| $\hat{h}$           | 0.00    | 0.53 | 0.76 | 0.53                 | 0.76 | 0.67              | 0.00 |
| <i>Met-1</i>        |         |      |      |                      |      |                   |      |
| <i>926</i>          | -       | 1.00 | -    | -                    | -    | 1.00              | -    |
| <i>935</i>          | -       | -    | 1.00 | -                    | 1.00 | -                 | 1.00 |
| <i>949</i>          | 1.00    | -    | -    | 1.00                 | -    | -                 | -    |
| ( <i>n</i> )        | (20)    | (24) | (10) | (12)                 | (34) | (4)               | (18) |
| $\hat{h}$           | 0.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00                 | 0.00 | 0.00              | 0.00 |

<sup>a</sup> Comprend une larve identifiée a posteriori à l'espèce, à partir de son génotype multi-locus

<sup>b</sup> Individus de cette espèce distingués a posteriori de ceux de *G. grandoculis* par leur composition génotypique aux locus *ARNr 16S* et *Aldo-B fast*

<sup>c</sup> Distingué a posteriori de *Gymnocranius* sp. B par sa composition génotypique au locus *Met*

## 2.2 Echantillonnage des juvéniles

Les juvéniles ont été capturés à l'aide de différentes techniques (Carassou & Ponton 2007 ; Ponton & Mellin 2007). Ils ont été immédiatement conservés dans de l'alcool à 95 %. De retour au laboratoire, les poissons ont été triés et photographiés le jour même, puis mesurés au mm près à l'aide d'un pied à coulisse ou à partir d'images digitales. L'identification (Tableau 5) s'est basée sur des critères de formes, de patrons de coloration et, lorsque nécessaire, sur les clés d'identification liées au nombre de rayons et d'épines sur les nageoires (Randall 2005) complétés par les critères fournis par Wilson (1998).

## 2.3 Echantillonnage des larves

Les larves ont été capturées à l'aide de différentes techniques (Carassou et al. 2009) dans les baies de Dumbea et Ouano. Elles ont été anesthésiées immédiatement après capture dans une solution de benzocaïne, puis conservées dans de l'alcool à 95 %. De retour au laboratoire, les larves ont été triées, identifiées et mesurées au mm près à l'aide d'un pied à coulisse. Les larves ont été identifiées jusqu'au plus bas niveau taxonomique possible en utilisant les clés d'identification de Leis & Trnski (1989) et Leis & Carson-Ewart (2000), ainsi que la base de données électronique FISHPASTE développée par P.J. Doherty (Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australie, données non publiées).

## 2.4 Extraction de l'ADN

L'ADN génomique total de chaque individu a été extrait à partir de fragments de 5-20 mg de nageoire ou de muscle conservés dans de l'éthanol, soit selon un protocole adapté de la méthode du phénol-chloroforme (Sambrook et al. 1989), soit à l'aide du kit "DNeasy® Tissue Kit" (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) selon le protocole fourni par le fabricant. L'ADN a été conservé en solution dans l'eau ultrapure à -20 °C dans des tubes numérotés.

## 2.5 Amplification de l'ADN mitochondrial

Avant d'être séquencés, les ADN sont préalablement amplifiés par la réaction de polymérisation cyclique (PCR). L'étude phylogénétique de la famille des Lethrinidae de Lo Galbo et al. (2002) nous a permis de définir deux paires d'amorces PCR spécifiques aux Lethrinidae, situées dans les régions conservées du gène du cytochrome *b* (Tableau 5). Le premier de ces deux jeux d'amorces permet d'amplifier un fragment de 371 pb situé dans la moitié 5' du gène (« *CytSar* ») ; le second permet d'amplifier un fragment de 324 pb qui chevauche le premier dans sa partie 3' (« *HaLb* »). Les amorces du fragment *CytSar* ont été désignées à partir de l'alignement des séquences du gène du cytochrome *b* chez 14 espèces du genre *Lethrinus* (*L. atkinsoni*, GENBANK AF381255 ; *L. genivittatus*, GENBANK AF381272 ; *L. harak*, GENBANK AF381258 ; *L. lentjan*, GENBANK AF 381267 ; *L. microdon*, GENBANK AF381265 ; *L. miniatus*, GENBANK AF381266 ; *L. nebulosus*, GENBANK AF381269 ; *L. obsoletus*, GENBANK AF381271 ; *L. olivaceus*, GENBANK AF381252 ; *L. ornatus*, GENBANK AF381254 ; *L. reticulatus*, GENBANK AF381253 ; *L. rubrioperculatus*,

**Tableau 4** Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie : échantillons de référence utilisés lors du présent travail. Les trois *Gymnocranius* non décrits sont ceux du Tableau 3. Numéros de séquences du gène du cytochrome *b* obtenues via GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). *IRDN* IRD, Nouméa ; *MNHN* Museum national d'histoire naturelle, Paris ; *AMS* Australian Museum, Sydney ; *USNM* U.S. Natural History Museum, Washington ; *NC* Nouvelle-Calédonie. *N* taille d'échantillon

| Espèce                            | Abré-<br>viation | Spécimens de référence   | Origine<br>géographique           | (N) | N° d'accès<br>GenBank  |
|-----------------------------------|------------------|--|-----------------------------------|-----|------------------------|
| <i>Gnathodentex aureolineatus</i> | Gaur             | IRDN z286, z287 (MNHN 2009-0004), z288-z290  | NC                                | (5) | -                      |
| <i>Gymnocranius elongatus</i>     | Gelo             | AMS uncat. (Lo Galbo et al. 2002)  | Australie                         | (1) | AF381260               |
| <i>Gymnocranius enanus</i>        | Geua             | IRDN z147 (MNHN 2007-1610)   | NC                                | (1) | -                      |
| <i>Gymnocranius grandoculis</i>   | Ggra             | IRDN z177, z320 ; AMS uncat. (Lo Galbo et al. 2002)  | NC ; Australie                    | (3) | AF381275               |
| <i>Gymnocranius</i> sp. A         | GspA             | IRDN w351 (20080531B), z199 (MNHN 2009-0007), z293, z294   | NC                                | (4) | -                      |
| <i>Gymnocranius</i> sp. B         | GspB             | IRDN z246 (MNHN 2009-0010), z269 (MNHN 2009-0011), z306  | NC                                | (3) | -                      |
| <i>Gymnocranius</i> sp. C         | GspC             | IRDN z305  | NC                                | (1) | -                      |
| <i>Lethrinus atkinsoni</i>        | Latk             | IRDN z11 ; USNM 346713   | NC ; Philippines                  | (2) | AF381255               |
| <i>Lethrinus erythracanthus</i>   | Lera             | IRDN z217 ; USNM 340524  | Makassar ;<br>Philippines         | (2) | AF381257               |
| <i>Lethrinus genivittatus</i>     | Lgen             | IRDN z38-z40 (MNHN 2006-1297, 2006-1298, 2007-1609) ; AMS uncat. (Lo Galbo et al. 2002)                              | NC ; Philippines                  | (4) | AF381272               |
| <i>Lethrinus harak</i>            | Lhar             | IRDN z15, IRDN z247-249 (MNHN 2006-1310, 2006-1303, 2007-1615) ; USNM 346850   | NC ; Philippines                  | (5) | AF381258               |
| <i>Lethrinus laticaudis</i>       | Llat             | AMS I.36447-006  | Australie                         | (1) | AF381251               |
| <i>Lethrinus lentjan</i>          | Llen             | IRDN z277-279 (MNHN 2006-1312, 2007-1616, 2006-1313) ; AMS uncat. (Lo Galbo et al. 2002)                             | NC ; Australie                    | (4) | AF381267               |
| <i>Lethrinus miniatus</i>         | Lmin             | IRDN z119, IRDN z03 (MNHN 2007-1606), z94-z96, z125, USNM 345991   | NC ; Philippines                  | (7) | AF381266               |
| <i>Lethrinus nebulosus</i>        | Lneb             | IRDN z06 (MNHN 2006-1293), z44, z46, z227 (MNHN 2007-1611) ; AMS I.36447-010   | NC ; Australie                    | (5) | AF381269               |
| <i>Lethrinus obsoletus</i>        | Lobs             | Uncat. (Yamanoue et al. 2007) ; USNM 347032  | Japon ? ;<br>Philippines          | (2) | AP009165 ;<br>AF381271 |
| <i>Lethrinus olivaceus</i>        | Loli             | IRDN z09 (MNHN 2009-0015), z10 (MNHN 2006-1294), z184, z256, z262, w349 (Loli39) ; USNM 345988                       | NC ; Philippines                  | (8) | AF381252               |
| <i>Lethrinus ravus</i>            | Lrav             | IRDN z148, z239-243 (MNHN 2007-1612, 2007-1613, 2006-1308, 2007-1614, 2006-1309) ; AMS uncat. (Lo Galbo et al. 2002) | NC ; Australie                    | (7) | AF381262               |
| <i>Lethrinus rubrioperculatus</i> | Lrub             | IRDN z340-z343 ; USNM 346714 ; CSIRO uncat. (Orrell & Carpenter 2004)  | NC ; Philippines ;<br>W Australia | (6) | AF240752 ;<br>AF381263 |
| <i>Lethrinus semicinctus</i>      | Lsem             | IRDN z87, z88, z310, z311 (MNHN 2006-1300, 2006-1301, 2006-1314, 2006-1315) ; USNM 346753                            | NC ; Philippines                  | (5) | AF381276               |
| <i>Lethrinus variegatus</i>       | Lvar             | IRDN z33 (MNHN 2007-1608)  | NC                                | (1) | -                      |
| <i>Lethrinus xanthochilus</i>     | Lxan             | IRDN z187-z191   | NC                                | (5) | -                      |
| <i>Monotaxis grandoculis</i>      | Mgra             | IRDN w352 (20080531A) ; uncat. (Yamanoue et al. 2007)  | NC ; Japon ?                      | (2) | AP009166               |
| <i>Wattsia mossambica</i>         | Wmos             | AMS I.36447-005  | Australie                         | (1) | AF381261               |

GENBANK AF381263 ; *L. semicinctus*, GENBANK AF381276 ; *L. sp2*, GENBANK AF381262), 2 espèces du genre *Gymnocranius* (*G. grandoculis*, GENBANK AF381275 ; *G. griseus*, GENBANK AF381259) et l'unique représentant du genre *Wattisia* (*W. mossambica*, GENBANK AF381261).

Les réactions d'amplification par PCR du fragment *CytSar* ont été réalisées dans des plaques de polypropylène de 96 puits (Thermo-Fast® 96, Skirted : ABgene, Epsom, UK) contenant chacun 25 µl de mélange réactionnel [2.5 µl d'ADN, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de chacune des amorces *CytSarF* (5' – TMG YAT CGC CAC AGC CTT CTC - 3') et *CytSarR* (5' – AGG AAG TGG AAR GCG AAG AA – 3') (M = A ou C ; Y = C ou T ; R = A ou G) et 0.5 µl de *Taq* polymérase (Sigma-Aldrich, St Louis MO, U.S.A.) dans son tampon 1X (Sigma-Aldrich), le volume final étant complété par de l'eau Nanopure™ (Millipore, Molsheim, France)], dans un thermocycleur Robocycler 96 Gradient (Stratagene, La Jolla CA, U.S.A.). Le programme de PCR consistait en 3 min de dénaturation (94 °C), suivies de 35 cycles de 1 min de dénaturation (94 °C) / 45 secondes d'hybridation (60 °C) / 1 minute d'élongation (72 °C), suivis d'une phase finale d'élongation (10 min à 72 °C). La qualité (abondance et spécificité) de l'amplification a été vérifiée par migration des produits amplifiés (4 µl) dans un gel d'agarose à 1.5 % [0.75 g d'agarose, 50 ml de tampon TAE 1X (Sambrook et al. 1989), 2 µl de bromure d'éthidium]. La migration se faisait à 100 V pendant 50 min dans du tampon TAE 1X. Le résultat de la migration était ensuite observé par fluorescence sous lampe UV. Des témoins négatifs (mélanges réactifs sans ajout d'ADN soumis simultanément aux mêmes cycles de température) permettaient de vérifier l'absence de contaminations.

Les réactions d'amplification par PCR du fragment *HaLb* ont été réalisées selon le même protocole, dans 20 µl de mélange réactionnel [2 µl d'ADN, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM de chacune des amorces *L15171b* (5' – GAG GAC AAA TRT CYT TCTGAG G - 3' ; Reed et al. 2001) et *H15314a* (5' – GTT GTC CGG GTC TCC GAG AAG – 3' ; Lo Galbo et al. 2002), avec une température d'hybridation programmée à 57 °C.

Les ADN amplifiés ont été expédiés par courrier à MacroGen (Séoul, Corée du Sud) pour y être séquencés. Les séquences ont été obtenues par polymérisation à partir des amorces *CytSarF* et *L15171b*, pour, respectivement, les fragments *CytSar* et *HaLb*. Les chromatogrammes et les séquences ont été récupérés sur le site internet de MacroGen (<http://www.dna.macrogen.com/>).

## 2.6 Analyse des données de séquence

Outre les séquences obtenues à la suite des analyses détaillées ci-dessus, le jeu de données final comprenait des séquences de Lethrinidae obtenues sur GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) à partir des numéros d'accèsion AF240752, AF381251, AF381252, AF381255, AF381257, AF381258, AF381262, AF381263, AF381266, AF381267, AF381269, AF381271, AF381272, AF381276, AP009165 et NC009855 (Lethrininae) et AF381260, AF381261, AF381275 et AP009166 (Monotaxinae). Une partie des séquences produites lors de la présente étude ont été elles-mêmes déposées dans GENBANK (numéros d'accèsion FJ158816-FJ158839).

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel BIOEDIT (Hall 1999) et exportées vers MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007). L'arbre de Neighbor-Joining (NJ : Saitou & Nei 1987) des séquences a été construit à partir de la matrice des distances nucléotidiques de Kimura 2-paramètres, en assumant une distribution gamma des taux de mutation (gamma= 1.0), à l'aide de MEGA 4.0. La robustesse des nœuds de l'arbre a

**Tableau 5** Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie : échantillons de juvéniles analysés lors du présent travail

| Espèce                        | (N) | Numéro de collection de l'individu                            | Numéro de l'échantillon de tissu | Origine         |
|-------------------------------|-----|---|----------------------------------|-----------------|
| <i>Lethrinus genivittatus</i> | (5) | S0365 007<br>S0365 011<br>S0618 005<br>S0229 021<br>S0229 022 | j084 à j088                      | Lagon sud-ouest |
| <i>Lethrinus harak</i>        | (1) | CSSM A  | j077                             | Lagon sud-ouest |
| <i>Lethrinus variegatus</i>   | (5) | CSSM U<br>CSSM I<br>CSSM E<br>CSSM G<br>CSSM W                | j078 à j082                      | Lagon sud-ouest |

**Tableau 6** Critères morphologiques et de pigmentation pour la distinction des larves de Lethrininae échantillonnées dans les baies de Ouémo et Dumbéa, Nouvelle-Calédonie. Les caractères méristiques correspondent au nombre d'épines (en chiffres romains) et de rayons mous (en chiffres arabes) to the number of spines (in roman letters) and soft rays (in arabic letters) on the dorsal, anal, and caudal fins. Pigmentation and general shape patterns are described for specimens conserved in 70 % ethanol. Particular morphological structures (e.g., spinations) are also indicated.

| Morpho-<br>espèce | Nombre de rayons des<br>nageoires |         |         | Pigmentation   |   |   | Forme                            |                                | Structures particulières                                     |
|-------------------|-----------------------------------|---------|---------|--|---|---|----------------------------------|--------------------------------|--|
|                   | Dorsale                           | Anale   | Caudale | Corps  | Nageoires   | Tête  | Corps                            | Tête                           |  |
| LETR 1            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | pigments brun clair formant de légères bandes verticales   | pigments sur les épines des nageoires dorsale et anale  | tache sombre sur le dessus de la tête, quelle que soit la taille ; pigments sur le museau et la bouche  | allongé                          | pointu                         | supraoccipital crest and preopercular spine slightly visible |
| LETR 2            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | comme LETR 1   | comme LETR 1  | tache sombre sur le dessus de la tête, quelle que soit la taille ; pigments sur le museau et la bouche ; pigments sombres, étoilés, autour de l'œil | allongé                          | pointu                         | comme LETR 1   |
| LETR 3            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | comme LETR 1   | pigments sur les épines et les rayons de la nageoire dorsale, et sur les épines des nageoire pelvienne et anale | comme LETR 1  | allongé                          | pointu                         | comme LETR 1   |
| LETR 4            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | pas de pigment, excepté une ligne noire de la base des rayons dorsaux jusqu'au pédoncule caudal  | pigments sur les épines des nageoires dorsale et anale et sur les rayons de la nageoire caudale                 | tache sombre sur le dessus de la tête, quelle que soit la taille ; pigments sur le museau et la bouche  | allongé                          | pointu                         | comme LETR 1   |
| LETR 5            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | pas de pigment, excepté une ligne noire de la base des rayons dorsaux jusqu'au pédoncule caudal ; petite tache au milieu du pédoncule caudal | pigments sur les épines de la nageoire dorsale et le long de la base des rayons de la nageoire caudale          | comme LETR 4  | allongé                          | pointu                         | comme LETR 1   |
| LETR 6            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | Body pigmented with large dark horizontal band from mouth to caudal fin, which crosses eye and operculum                                     | pigments sur les épines de la nageoire dorsale seulement  | pas de pigments sur le museau et la bouche  | plus allongé que LETR 1 à LETR 5 | pointu                         | comme LETR 1   |
| LETR 7            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | Dark brown pigments forming sharp vertical bands; small spot at basis of pectoral fins   | nageoires dorsale, anale, pelviennes et pectorales très pigmentées (épines et rayons mous)                      | Sharp black horizontal band extending from mouth to operculum and crossing eye  | plus haut que LETR 1 à LETR 6    | museau très pointu             | Supraoccipital crest conspicuous                             |
| LETR 8            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | Close to LETR7 but plainer pigments on body vs. slighter horizontal band   | comme LETR 7  | comme LETR 7 mais pigmentation du museau moins intense  | plus allongé que LETR 7          | museau moins pointu que LETR 7 | comme LETR 7   |
| LETR 9            | X + 9                             | III + 8 | 9 + 8   | pas de pigmentation  | pas de pigmentation   | pas de pigmentation   | ?                                | pointu                         | comme LETR 1   |

**Tableau 7** Moyennes des distances par paires [Kimura 2-paramètres ; MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007)] entre 9 espèces de Monotaxinae présentes en Nouvelle-Calédonie

| Espèce | Espèce |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | Mgra   | Wmos  | Gaur  | Geua  | Gelo  | Ggra  | GspA  | GspB  |
| Wmos   | 0.134  |       |       |       |       |       |       |       |
| Gaur   | 0.192  | 0.234 |       |       |       |       |       |       |
| Geua   | 0.173  | 0.169 | 0.208 |       |       |       |       |       |
| Gelo   | 0.199  | 0.220 | 0.252 | 0.162 |       |       |       |       |
| Ggra   | 0.162  | 0.140 | 0.223 | 0.179 | 0.234 |       |       |       |
| GspA   | 0.167  | 0.144 | 0.181 | 0.146 | 0.137 | 0.080 |       |       |
| GspB   | 0.169  | 0.167 | 0.241 | 0.186 | 0.196 | 0.093 | 0.113 |       |
| GspC   | 0.157  | 0.166 | 0.226 | 0.168 | 0.159 | 0.067 | 0.093 | 0.085 |

**Tableau 8** Moyennes des distances par paires [Kimura 2-paramètres ; MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007)] entre 15 espèces de Lethrininae présentes en Nouvelle-Calédonie

| Espèce | Espèce |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        | Latk   | Lera  | Lgen  | Lhar  | Llat  | Llen  | Lmin  | Lneb  | Lobs  | Loli  | Lrav  | Lrub  | Lsem  | Lvar  |
| Lera   | 0.187  |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Lgen   | 0.221  | 0.210 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Lhar   | 0.155  | 0.192 | 0.181 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Llat   | 0.186  | 0.170 | 0.214 | 0.157 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Llen   | 0.109  | 0.175 | 0.188 | 0.134 | 0.141 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Lmin   | 0.200  | 0.224 | 0.263 | 0.256 | 0.258 | 0.212 |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Lneb   | 0.146  | 0.159 | 0.212 | 0.141 | 0.133 | 0.127 | 0.246 |       |       |       |       |       |       |       |
| Lobs   | 0.155  | 0.141 | 0.190 | 0.132 | 0.142 | 0.122 | 0.248 | 0.107 |       |       |       |       |       |       |
| Loli   | 0.185  | 0.194 | 0.225 | 0.239 | 0.227 | 0.205 | 0.195 | 0.221 | 0.195 |       |       |       |       |       |
| Lrav   | 0.188  | 0.204 | 0.160 | 0.203 | 0.193 | 0.198 | 0.238 | 0.221 | 0.196 | 0.175 |       |       |       |       |
| Lrub   | 0.196  | 0.160 | 0.262 | 0.183 | 0.169 | 0.176 | 0.212 | 0.167 | 0.142 | 0.164 | 0.210 |       |       |       |
| Lsem   | 0.218  | 0.174 | 0.234 | 0.213 | 0.202 | 0.206 | 0.205 | 0.212 | 0.184 | 0.138 | 0.150 | 0.167 |       |       |
| Lvar   | 0.228  | 0.195 | 0.208 | 0.293 | 0.236 | 0.266 | 0.224 | 0.231 | 0.239 | 0.178 | 0.209 | 0.232 | 0.200 |       |
| Lxan   | 0.189  | 0.201 | 0.230 | 0.180 | 0.183 | 0.161 | 0.237 | 0.161 | 0.155 | 0.166 | 0.187 | 0.150 | 0.225 | 0.249 |

été testée par la méthode du bootstrap (Efron 1982 ; Felsenstein 1985). Pour cela, 1000 pseudo-matrices de séquences ont été obtenues par ré-échantillonnage aléatoire des colonnes, à l'aide de MEGA 4.0 et le score de chaque nœud de l'arbre de NJ sur les données réelles a été obtenu comme étant la fréquence de ce nœud dans le pseudo-échantillon de 1000 pseudo-arbres créés à partir des pseudo-matrices. La racine du sous-arbre phylogénétique correspondant à chacune des deux sous-familles est donnée par l'autre sous-famille, considérée comme groupe externe (Lo Galbo et al. 2002).

### 3 Résultats

#### 3.1 Tri préalable des larves destinées aux analyses génétiques

Les larves ont été identifiées comme appartenant à la sous-famille des Lethrininae à partir des comptages des rayons des nageoires (Tableau 6). Huit groupes morphologiques ou morpho-espèces ont été distinguées d'après la forme du corps et la pigmentation (LETR 1 à LETR 8). Le neuvième groupe (LETR 9) est un fourre-tout des autres morpho-espèces présentes dans les échantillons.

#### 3.2 Arbre des séquences

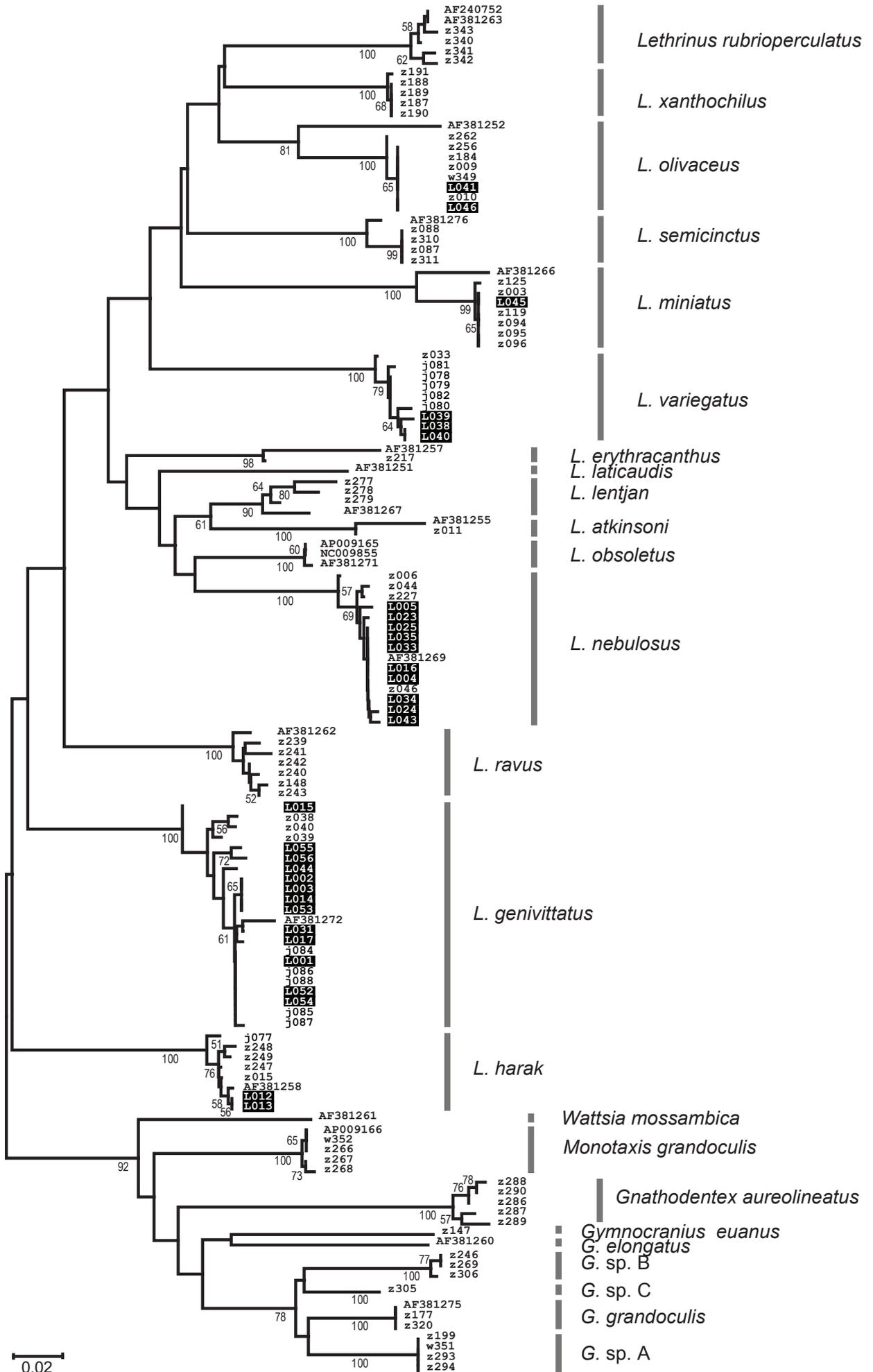
Les séquences du fragment *CytSar* ont été alignées sur une longueur commune de 315 pb. La matrice des séquences nucléotidiques comprend ainsi 130 lignes et 315 colonnes. Les distances nucléotidiques moyennes par paire d'espèces (qui sont, dans le principe, des mesures standardisées du nombre de sites mutés par unité de longueur de séquence) sont présentées aux Tableaux 7 et 8.

De la matrice des distances découle l'arbre des haplotypes mitochondriaux présenté Figure 3. Lorsque plus d'un haplotype a été échantillonné par espèce, ceux-ci se regroupent en extrémité de branche. Chaque groupe ainsi formé est généralement séparé de son voisin par une distance de l'ordre de 3 à 10 fois la distance maximale intra-groupe.

L'arbre présenté en Fig. 3 montre des divergences génétiques importantes entre lignées mitochondriales au sein de chacune des espèces nominales *L. lentjan*, *L. miniatus*, *L. olivaceus* et *L. semicinctus*. La séquence no. AF381266, qui est celle d'un individu *L. miniatus* originaire des Philippines (Lo Galbo et al. 2002) diverge de toutes les autres, originaires de Nouvelle-Calédonie (Tableau 2), par environ 2.5 % de divergence nucléotidique. De même, la séquence no. AF381252, d'un individu *L. olivaceus* originaire des Philippines (Lo Galbo et al. 2002) diverge de toutes les autres, originaires de Nouvelle-Calédonie (Tableau 2), par environ 5 % de divergence nucléotidique. Les haplotypes représentatifs des 9 espèces de Monotaxinae échantillonnées forment autant de clades distincts (Fig. 3).

On peut constater qu'il n'y a eu aucune erreur d'identification des juvéniles (Tableau 6).

**Fig. 3** Arbre des distances nucléotidiques [*Neighbour-Joining* ; Kimura 2-paramètres ; MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007)] des lignées mitochondriales (séquences nucléotidiques d'un fragment de 315 pb du gène du cytochrome *b*) pour 24 espèces de la famille des Lethrinidae représentées en Nouvelle-Calédonie. Les chiffres placés à proximité des noeuds correspondent à la fréquence (%) de leur observation sur 1000 pseudo-arbres générés par bootstrap ; seuls les scores >50 % ont été représentés. Trait d'échelle : 2 % de divergence nucléotidique. Les séquences des spécimens adultes ou sub-adultes de référence (voir Tableau 2) sont désignées par la lettre *w* ou *z*, suivie d'un numéro à trois chiffres ; les séquences des autres spécimens de référence sont désignées par leur numéro d'accèsion dans GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ; la lettre *j* désigne les séquences des juvéniles ; la lettre *L* désigne les séquences des larves à déterminer à l'espèce. Une partie des séquences nucléotidiques obtenues au cours du présent travail ont été déposées dans GENBANK sous les numéros d'accèsion FJ158816-FJ158839



### 3.3 Identification des larves à l'espèce

Les haplotypes inconnus (ceux des 31 larves) se distribuent dans les groupes d'haplotypes suivants : *Lethrinus genivittatus* (N = 13), *L. barak* (N = 2), *L. miniatus* (N = 1), *L. nebulosus* (N = 10), *L. olivaceus* (N = 2) et *L. variegatus* (N = 3) (Fig. 3).

Les séquences du fragment *HaLb* confirment l'identification à l'espèce de 7 larves et de 2 juvéniles : L001, L014, L015, L044, L056 (*L. genivittatus*) ; L046 (*L. olivaceus*) ; L038, j078, j080 (*L. variegatus*).

Les larves identifiées lors de la précédente action de recherche « Jeunes poissons » (Borsa et al. 2005 ; 2006a, 2006b ; Fig. 2) n'ont pas été ré-utilisées dans la présente série d'analyses au locus du cytochrome *b*. Cependant, le cas de la larve LET 4, identifiée provisoirement comme *Gymnocranius* cf *grandoculis* (Borsa et al. 2006a ; Fig. 2) restait en suspens. Son identification est maintenant possible, du fait qu'un certain nombre d'adultes de référence des deux espèces cryptiques initialement identifiées comme *G. grandoculis* ont été analysés simultanément avec la série de marqueurs développés par Borsa et al. (2006b) et au locus du cytochrome *b* : il s'agissait d'une larve de *Gymnocranius* sp. A (Tableau 9).

## 4 Discussion

### 4.1 Discussion des résultats acquis antérieurement

Les résultats de Borsa et al. (2005 ; 2006a, b) portaient sur 21 espèces de la famille des Lethrinidae présentes en Nouvelle-Calédonie. Ce chiffre représente 72 % du nombre total des espèces de cette famille recensées dans le Pacifique sud-ouest tropical (Carpenter 2001 ; présente étude), 62 % de celles recensées dans le Pacifique et 53 % de celles rapportées pour tout l'Indo-Pacifique [voir Carpenter (2001) pour les distributions des espèces]. Du fait de leur grand pouvoir de discrimination lorsqu'ils sont utilisés de façon combinée, les marqueurs SSCP 16S et introniques que nous avons développés sont utiles pour l'identification à l'espèce aux échelles locale et même, probablement, régionale. Des études complémentaires seraient néanmoins nécessaires pour généraliser ces méthodes à l'ensemble des Lethrinidae de l'Indo-Pacifique.

Le marqueur SSCP 16S discrimine toutes les espèces néo-calédoniennes du genre *Lethrinus*, à l'exception du triplet (*L. ravyus*, *L. rubrioperculatus*, *L. semicinctus*). Au passage, la résolution incomplète des différences génétiques entre ces trois espèces suggère qu'elles sont génétiquement proches et permet de proposer l'hypothèse d'un éventuel complexe d'espèces. Tester ces hypothèses demanderait un travail en plusieurs étapes. Premièrement, il serait nécessaire de séquencer le fragment du gène ARN 16S qui apparaît comme identique par SSCP chez les trois espèces, afin de voir si l'identité des phénotypes correspond bien à une identité de séquence. En effet, un petit pourcentage des mutations ponctuelles (<10 % pour un fragment de 300 à 450 pb, moins que cela encore pour un fragment de taille inférieure) échappent à la détection par SSCP (Lessa & Applebaum 1993) : il convient donc de vérifier qu'il y a bien identité de séquence. Cependant, l'identité de séquence ne signifie pas nécessairement qu'il s'agit d'haplotypes identiques par ascendance. Il est d'abord nécessaire d'exclure l'hypothèse d'homoplasie. Pour cela, un fragment plus long, ou d'une région plus variable du génome mitochondrial, devrait être séquencé. Si l'hypothèse selon

laquelle les trois espèces partagent pro parte la même lignée mitochondriale, alors seule une étude approfondie de la variabilité génétique nucléaire permettrait d'analyser le degré d'échanges génétiques entre les trois espèces. Il peut paraître contradictoire de maintenir la distinction d'espèces nominales alors qu'on évoque la possibilité d'échanges génétiques entre ces dernières (Samadi & Barberousse 2006), mais le fait d'observer des différences génétiques en sympatrie est pour nous un critère suffisant pour confirmer cette distinction, quand bien même des échanges génétiques (nécessairement restreints, puisque des différences importantes sont observées) auraient lieu. Le marqueur SSCP 16S était de peu d'utilité pour discriminer entre elles les espèces du genre *Gymnocranius*. Ceci suggère, au sein de ce genre, un degré de divergence inter-spécifique plus faible que chez *Lethrinus*. Pour une discrimination sans ambiguïté des espèces chez *Gymnocranius*, il était nécessaire d'utiliser les génotypes nucléaires à plusieurs locus introniques et le marqueur mitochondrial, de façon combinée.

Les données génotypiques multi-locus (Annexe 1) montrent l'absence d'hétérozygotes à certains locus nucléaires, ainsi qu'une corrélation forte entre génotype nucléaire et haplotype mitochondrial. Ceci indique l'absence de panmixie (= reproduction au hasard) entre groupes d'individus sympatriques (= partageant le même habitat géographique) dont nous concluons ainsi qu'ils représentent des espèces biologiques distinctes (i.e. selon le critère de l'isolement reproducteur ; Mayr 1963 ; Samadi & Barberousse 2006). Trois espèces non identifiées du genre *Gymnocranius*, ici provisoirement appelées '*Gymnocranius* sp. A', '*Gymnocranius* sp. B' et '*Gymnocranius* sp. C' (Tableaux 3 et 4) ont ainsi été distinguées à la suite des analyses génétiques. Initialement, nous avons identifié les individus de l'espèce A comme étant *G. grandoculis*, conformément aux clés d'identification de Sato (1986) et Carpenter & Allen (1989). L'examen a posteriori de la morphologie du seul spécimen dont nous disposons alors pour l'espèce *Gymnocranius* sp. A (MNHN 2009-0007) a permis de le séparer sans ambiguïté de *G. grandoculis* : chez *Gymnocranius* sp. A, le rapport de la longueur standard sur la hauteur du corps est supérieur à celui chez *G. grandoculis*, le corps montre une plus grande symétrie dorso-ventrale et la nageoire caudale est plus allongée. De même, nous avons initialement identifié les individus des deux espèces *Gymnocranius* sp. B et *Gymnocranius* sp. C comme étant de l'espèce désignée sous le nom de « *Gymnocranius* sp. » par Sato (1986) et Carpenter & Allen (1989), ceci sur la base des patterns de coloration et de la forme de la nageoire caudale. En effet, les espèces *Gymnocranius* sp. B et *Gymnocranius* sp. C possèdent toutes deux des nageoires rouges, ce qui est un caractère diagnostique de *Gymnocranius* sp. (Sato 1986 ; Carpenter & Allen 1989). Toutefois, les spécimens-témoins de *Gymnocranius* sp. B diffèrent de cette dernière espèce par leur rapport longueur standard / hauteur du corps plus élevé et par une nageoire caudale moins arrondie ; ils sont semblables au « *G. griseus* » (non Temminck & Schlegel 1844) photographié par Coleman (1981). Les caractères distinctifs des espèces *Gymnocranius* sp. A et *Gymnocranius* sp. B ont été présentés dans l'étude des monogènes parasites des espèces du genre *Gymnocranius* par Justine & Briand (sous presse). Les descriptions formelles de *Gymnocranius* sp. A et *Gymnocranius* sp. B sont envisagées (P. Béarez, P.B., W.-J.C., manuscrits en préparation). Malheureusement, nous n'avons conservé aucun spécimen de *Gymnocranius* sp. C.

L'objectif pratique de ces recherches était de disposer d'outils permettant effectivement l'identification à l'espèce des larves de Lethrinidae inconnues du lagon de Nouvelle-Calédonie. Le jeu de marqueurs utilisé par Borsa et al. (2005 ; 2006a, b) a effectivement permis d'identifier sans ambiguïté toutes les larves des échantillons d'alors, y compris la larve d'une espèce (*Gymnocranius* sp. A) qui n'est elle-même pas encore décrite et pour laquelle il n'existe encore aucune clé d'identification. Ces résultats illustrent la puissance de l'approche génétique moléculaire.

**Tableau 9** Phénotypes électrophorétiques multi-locus d'individus de référence initialement identifiés comme *Gymnocranius grandoculis*, phénotype d'une larve de Monotaxinae (LET 4 : Borsa et al. 2005) et comparaison avec les séquences au locus du cytochrome *b*. La présence de deux espèces biologiques (" sp. 1 ", " sp. 2 ") au sein de cet échantillon avait été déduite de l'absence d'hétérozygotes 1007/1017 au locus *Aldo-B fast*, 935/949 au locus *MetCcSs*, et de la corrélation des phénotypes à ces deux locus avec ceux aux autres locus. La présente comparaison permet d'établir que l'espèce provisoirement appelée " sp. 1 " était bien *G. grandoculis* (et ceci, malgré l'absence de spécimen-témoin) et que l'espèce " sp. 2 " est *Gymnocranius* sp. A

| Individu no. | Locus    |                    |                    |               |            | Identification   |                       |
|--------------|----------|--------------------|--------------------|---------------|------------|------------------|-----------------------|
|              | SSCP 16S | <i>Aldo-B fast</i> | <i>Aldo-B slow</i> | <i>GnRH-1</i> | <i>Met</i> | Electro-phorèses | Séquence cyt <i>b</i> |
| z 32         | H        | 1007               | 0                  | 1008 968      | 935        | sp. 1            | -                     |
| z 177        | H        | 1007               | 0                  | 1000 984      | 935        | sp. 1            | <i>G. grandoculis</i> |
| z 178        | H        | 1007               | 0                  | 1000 992      | 935        | sp. 1            | -                     |
| z 199 *      | A"       | 1017               | 0                  | 992           | 949        | sp. 2            | <i>G. sp. A</i>       |
| z 245        | H        | 1007               | 0                  | 1000 968      | 935        | sp. 1            | -                     |
| z 293        | A"       | 1017               | 0                  | 1008 992      | 949        | sp. 2            | <i>G. sp. A</i>       |
| z 294        | A"       | 1017               | 0                  | 1008 992      | 949        | sp. 2            | <i>G. sp. A</i>       |
| z 295        | A"       | 1017               | 0                  | 1008          | 949        | sp. 2            | -                     |
| z 296        | A"       | 1017               | 0                  | 1008 992      | 949        | sp. 2            | -                     |
| z 320        | H        | 1007               | 0                  | 1000          | 935        | sp. 1            | <i>G. grandoculis</i> |
| LET 4        | A"       | 1017               | 0                  | 1008          | 949        | sp. 2            | -                     |

\* Spécimen-témoin, déposé au Museum national d'histoire naturelle, Paris, sous le numéro MNHN 2009-0007

#### 4.2 Propriétés des marqueurs mitochondriaux comme barcodes

L'objectif du *barcoding* est l'identification d'un individu à l'espèce à partir d'un marqueur universel. Deux propriétés supplémentaires sont désirées : que ce marqueur soit simple et qu'il soit fiable. Le marqueur choisi par les initiateurs du projet « *Barcoding of Life* » (CBOL ; <http://barcoding.si.edu/>) a été *cox-1*, qui est un fragment de ~650 paires de bases (pb) de la première moitié du gène de la sous-unité I de la cytochrome-oxydase. Ce gène est présent chez toutes les espèces vivantes : il répond donc au critère d'universalité. Chez les Eucaryotes (l'un des trois grands phylums du monde vivant), ce gène est porté par le génome mitochondrial. Le *barcoding* à l'aide du marqueur *cox-1* a conduit à la distinction claire des espèces chez différents groupes animaux (Hebert et al. 2004a, b ; Hogg & Hebert 2004 ; Hajibabaei et al. 2006a ; Costa et al. 2007 ; Lefebvre et al. 2006 ; Yoo et al. 2006 ; Clare et al. 2007 ; Waugh 2007), y compris les poissons (Ward et al. 2005 ; Ward & Holmes 2007 ; Ward et al. 2007 ; Hubert et al. 2008 ; Ward et al. 2008b ; Ward et al. 2009). Son pouvoir de discrimination d'espèces proches est essentiellement dû à la présence de mutations synonymes (Ward & Holmes 2007).

Les propriétés du marqueur *cytb* [celui que nous (Hoarau & Borsa 2000 ; Borsa & Quignard 2001 ; Perrin & Borsa 2001 ; Borsa 2003 ; Rohfritsch & Borsa 2005 ; Akimoto et al. 2006) avons le plus fréquemment utilisé jusqu'ici chez les poissons était un fragment de 307 pb situé entre les sites oligonucléotidiques *CB1-L* et *CB2-H* de Palumbi et al. (1991)] sont semblables à celles du marqueur *cox-1*, à ceci près que le fragment *CB1-L/CB2-H* étant plus court, il peut être amplifié plus facilement sur du matériel dégradé. Ceci est avantageux car jusqu'à une époque récente, les ADN des spécimens de collection ou celui de matériels récoltés de façon opportuniste (i.e. en dehors de missions où la préservation d'échantillons de tissus est planifiée de façon adéquate) n'étaient généralement pas préservés dans des conditions optimales. Inversement, le marqueur *CB1-L/CB2-H* semble montrer davantage de variabilité infra-spécifique que le marqueur *cox-1*, ce qui peut être un handicap technique (moindre reconnaissance du site d'amorçage à cause de mutations ponctuelles). Cependant, le polymorphisme infra-spécifique est intéressant pour l'étude de la variabilité géographique.

Qu'il s'agisse du marqueur *cox-1* ou du marqueur *CB1-L/CB2-H* ou de tout autre fragment du gène *cytb*, nous discutons ici des propriétés de marqueurs mitochondriaux. Les marqueurs mitochondriaux présentent, en théorie, un certain nombre de problèmes pour l'identification des espèces chez les Eucaryotes, qui compromettent leur fiabilité en tant que barcodes. La reproduction essentiellement clonale et la transmission maternelle de l'ADN mitochondrial font que celui-ci est un marqueur de lignée maternelle, sauf cas de transmission biparentale ou doublement uniparentale. Chez les espèces qui, au cours de leur histoire évolutive, ont été en contact reproductif (hybridation) avec des espèces proches, ceci peut conduire au phénomène d'introgression (Ballard & Whitlock 2004) : l'événement d'hybridation, s'il est suivi de backcrosses, permet le passage des lignées mitochondriales d'une espèce dans l'autre espèce. Si l'introgression est récente, le marqueur mitochondrial ne peut être considéré comme marqueur de l'espèce qui l'héberge puisqu'alors il sera impossible de la distinguer par *barcoding* mitochondrial de l'espèce avec laquelle elle s'est hybridée au cours de son histoire évolutive récente. L'introgression par les lignées mitochondriales d'espèces proches peut aussi être fortement liée à l'infection bactérienne (*Wolbachia*) des gonades femelles, phénomène extrêmement répandu chez les arthropodes (Hurst & Jiggins 2005 ; Raychoudhury et al. 2009). Le phénomène d'introgression mitochondriale interspécifique est connu depuis longtemps (Powell 1983 ; Avise & Saunders 1984 ; Spolsky & Uzzell 1984) et l'utilisation généralisée du

*barcoding* sur la base du seul marqueur mitochondrial a ravivé le problème (Hurst & Jiggins 2005 ; Dasmahapatra & Mallet 2006).

Un autre problème potentiel est celui de l'existence de pseudogènes mitochondriaux dans le génome nucléaire des eucaryotes, susceptibles de générer des séquences différentes pour un individu d'une espèce donnée (Thalman et al. 2004 ; Sword et al. 2007), ce qui est contradictoire avec l'idée de marquage spécifique (à moins de ne considérer le jeu des deux séquences observées comme, lui-même, spécifique). De plus, plusieurs étapes supplémentaires sont nécessaires pour isoler le gène mitochondrial du pseudogène nucléaire avant l'étape de séquençage.

Malgré tous ses handicaps, avérés ou potentiels, Ward et al. (2009) observent qu'à ce jour, aucun pseudogène n'a encore été détecté à partir des amplifications standard de barcode *cox-1* chez les poissons ; cet auteur affirme également que dans la très grande majorité des cas chez les poissons, l'hybridation est un phénomène si marginal qu'il compromet rarement l'aptitude du *barcoding* à générer une identification exacte. Cependant, des contre-exemples ont été rapportés chez d'autres groupes animaux (Meyer & Paulay 2005 ; Elias et al. 2007). Bien que pour la grande majorité des genres animaux, il soit ainsi possible de diagnostiquer les espèces par l'utilisation du marqueur *cox-1*, « *species identification based on a single DNA sequence will always produce some erroneous results. Efforts should therefore be made to develop nuclear barcodes to complement the barcoding region currently in use. As the advantages and limitations of barcoding become apparent, it is clear that taxonomic approaches integrating DNA sequencing, morphology and ecological studies will achieve maximum efficiency at species identification.* » (Dasmahapatra & Mallet 2006).

#### 4.3 Fiabilité des identifications à l'aide du marqueur *cytb*

Le fragment du gène du cytochrome *b* utilisé ici chez les Lethrinidae donne des résultats en apparence proches de ceux obtenus chez d'autres groupes de poissons à l'aide du marqueur *cox-1* (Ward et al. 2009), en ceci qu'il y a regroupement des haplotypes d'une espèce donnée au bout d'une longue branche les séparant de ceux de l'espèce voisine. Les haplotypes des larves se positionnent au sein des groupes ainsi individualisés, ce qui aboutit à leur identification à l'espèce. La fiabilité de cette identification repose sur l'hypothèse de non hybridation ou de non-introgression inter-spécifique.

Cette hypothèse serait falsifiée s'il s'avérait que les données mitochondriales étaient en désaccord avec les données des locus nucléaires – ou la morphologie qui en est l'expression phénotypique. Avons-nous des éléments permettant de rejeter l'hypothèse de non hybridation / non-introgression inter-spécifique chez les Lethrinidae ? La réponse est non en ce qui concerne les adultes de référence, puisque ceux-ci ont été déterminés à l'espèce à partir de clés morphologiques (Sato 1986 ; Carpenter & Allen 1989) et que nous n'avons observé aucune discordance entre l'identification morphologique et le type mitochondrial. La réponse est encore non en ce qui concerne les données produites par Borsa et al. (2005 ; 2006a, b) sur 21 espèces. Les incertitudes concernant le triplet (*L. ravus*, *L. rubrioperculatus*, *L. semicinctus*) ainsi que les espèces du genre *Gymnocranius* partageant le même phénotype SSCP du fragment ADNr 16S (voir ci-dessus) sont levées par les présents résultats de séquence du fragment *cytb*. Un cas d'hybridation / introgression entre deux espèces du genre *Gymnocranius* a néanmoins été détecté, depuis, par nous (P.B. et W.-J. Chen, en préparation).

En conclusion, seul l'emploi simultané d'un marqueur mitochondrial et d'un voire, idéalement, plusieurs marqueurs nucléaires, permet de tester l'hypothèse de non hybridation / non-introgression inter-

spécifique et ainsi d'obtenir une identification par barcode absolument fiable. Dans la pratique, on peut se contenter du seul marqueur mitochondrial pour le barcoding des lethrinidae, puisque les cas d'hybridation / introgression apparaissent comme étant exceptionnels.

#### 4.4 Possibles espèces cryptiques chez les Lethrininae et confirmation d'espèces cryptiques chez les Monotaxinae

Par espèces cryptiques, nous entendons des espèces distinctes qui sont, ou qui ont été : « *classified as a single nominal species because they are at least superficially morphologically indistinguishable. Some authors further stipulate that species designated as 'cryptic' should be recently diverged, separable only with molecular data, occur in sympatry, or be reproductively isolated; however, we do not regard these as essential features of cryptic species* » (Bickford et al. 2007). Nos résultats (Fig. 3) montrent de fortes différences génétiques entre lignées mitochondriales au sein de chacune des quatre espèces nominales *L. lentjan*, *L. miniatus*, *L. olivaceus* et *L. semicinetus*. Ceci indique la possibilité d'autant d'espèces cryptiques chez les Lethrininae. Deux autres espèces (*L. obsoletus* et *L. erythracanthus*) pourraient être concernées de la même façon.

Une analyse approfondie de la variabilité géographique des cas mentionnés ci-dessus serait nécessaire. Ainsi, une étude menée à l'échelle de la distribution de *L. miniatus* (Tableau 1) permettrait de tester l'hypothèse de deux clades mitochondriaux distincts chez cette espèce, sans doute à mettre en rapport avec sa distribution géographique disjointe. Le cas échéant, des marqueurs nucléaires permettraient de tester l'hypothèse de panmixie dans les zones géographiques où coexistent des lignées mitochondriales distinctes. Les données dont nous disposons d'ores et déjà sur la variabilité géographique de *L. olivaceus* (Borsa et al. 2009 ; P.B., non publié), suggèrent l'existence de deux entités génétiquement et morphologiquement distinctes au sein de cette espèce nominale, l'une présente dans la partie ouest de l'archipel indo-malais, l'autre dans sa partie est et dans le Pacifique sud. Les populations du Pacifique ouest pourraient former une espèce jumelle de celle représentée par les populations de l'océan Indien. Le nom *L. waigiensis* (A. Valenciennes, in Cuvier & Valenciennes 1830) mériterait éventuellement d'être réhabilité pour désigner les populations du Pacifique ouest, celui de *L. olivaceus* (A. Valenciennes, in Cuvier & Valenciennes 1830) étant alors conservé pour celles de l'océan Indien. Cependant, la forte divergence observée entre l'individu des Philippines et ceux de Nouvelle-Calédonie (présents résultats) complique le problème. Une étude à l'échelle de l'Indo-Pacifique s'avère nécessaire pour préciser la phylogéographie de *L. olivaceus* et un effort d'échantillonnage dans la zone de contact dans l'archipel indo-malais, suivi d'analyses de marqueurs nucléaires, permettraient, le cas échéant, de tester l'hypothèse nulle de panmixie en sympatrie.

Chez les Monotaxinae, les résultats obtenus antérieurement au locus mitochondrial de l'ARNr 16S (Tableau 3) permettaient de distinguer *G. grandoculis* de 4 autres espèces du genre *Gymnocranius* présentes en Nouvelle-Calédonie (i.e. *G. euanus*, *Gymnocranius* sp. A, *Gymnocranius* sp. B, *Gymnocranius* sp. C), mais pas ces dernières entre elles. Le statut spécifique de chacune de ces formes mitochondriales avait été établi du fait de leur isolement reproducteur, mis en évidence par l'absence de panmixie en sympatrie. La distinction entre *Gymnocranius* sp. A et *G. grandoculis*, espèce avec laquelle *Gymnocranius* sp. A avait été initialement confondue (Borsa et al. 2006b), est ici confirmée. De plus, les haplotypes mitochondriaux échantillonnés chez les cinq espèces que nous venons de mentionner forment des clades séparés, qui sont eux-mêmes distincts de l'haplotype représentant *G. elongatus*, la sixième espèce du genre rapportée de Nouvelle-

Calédonie et qui n'avait pas été échantillonnée lors des travaux précédents (Borsa et al. 2005, 2006a, 2006b et manuscrit en préparation).

#### 4.5 Prospective de recherche et recommandations

Le fait de disposer d'un échantillon substantiel de larves de Lethrinidae identifiées à l'espèce par barcoding moléculaire devrait permettre de définir les critères morphologiques pertinents pour leur identification. Une étude préliminaire de ce type, basée sur l'analyse interindividuelle des positions relatives de points remarquables dans un plan (Zelditch et al. 2004), a été confiée à une étudiante de l'Université de Nouvelle-Calédonie, S. Raillard, lors de son stage de licence encadré par L.C. et D.P. Le dépouillement des données est en cours.

Les travaux réalisés ces dernières années sur l'écologie des larves de poissons dans le lagon de la Nouvelle-Calédonie (Carassou 2008) avaient pour objectifs d'identifier les principaux facteurs environnementaux déterminant la présence, l'abondance et la structure des communautés de larves de poissons en différents habitats du lagon. Les larves étaient pour la plupart identifiées à la famille, faute de critères suffisants pour descendre au niveau spécifique. Cependant, vu les différences trophiques existant d'une espèce à l'autre au sein d'une même famille, il semble que le niveau taxonomique pertinent pour ce genre d'études doive être, autant que possible, l'espèce. Avec la possibilité de déterminer à l'espèce des larves de deux familles parmi les plus abondantes dans les échantillons, les Lethrinidae et les Siganidae (Borsa et al. 2005, 2006b ; Lemer et al. 2007 ; présent travail), il est désormais possible de revenir sur les échantillons acquis lors de la thèse de Carassou (2008), déterminer à l'espèce les larves restant indéterminées et reprendre les analyses de données écologiques correspondantes. Le même type d'analyses pourrait être entrepris sur d'autres familles abondantes dans les échantillons de larves, comme les Apogonidae et les Pomacentridae, ou intéressantes pour la pêche, comme les Siganidae, les Lutjanidae et les Serranidae. Cela pourrait être le sujet d'une thèse comportant un important volet analyses moléculaires et pour laquelle la partie échantillonnage serait déjà largement assurée, puisqu'il s'agirait d'utiliser, pour l'essentiel, les échantillons de Carassou (2008). Les analyses moléculaires peuvent désormais être réalisées à Nouméa, puisque les instituts de recherche qui y sont implantés ont maintenant accès à une plateforme commune dédiée aux sciences du vivant, opérationnelle depuis fin 2008 (de Garine-Wichatitsky et al. 2005 ; Lebrun 2007 ; Majorel-Loulergue et al. 2009). Celle-ci comprend un ensemble d'équipements parmi lesquels il y a un thermocycleur à gradient et un séquenceur à capillaires de la dernière génération, qui sont indispensables aux types d'analyses qui nous concernent s'il s'agit de les réaliser localement.

Très récemment, les provinces de la Nouvelle-Calédonie ont adopté une réglementation visant à la protection de certaines espèces marines dites « emblématiques » et de leurs habitats (Assemblée de la Province Nord 2008 ; Assemblée de la Province Sud 2009). Parmi celles-ci, on trouve plusieurs espèces de poissons récifo-lagonaires : les loches à taches oranges (*Epinephelus coioides*), carite (*E. lanceolatus*) et mère-loche (*E. malabaricus*) (Serranidae) et le napoléon (*Cheilinus undulatus* ; Labridae). La protection de ces espèces passe, en toute logique, par la protection des habitats essentiels qu'elles utilisent au cours de leur vie. Or, leur cycle de vie comprend une phase larvaire dont il convient, de ce fait, d'étudier les préférences écologiques. L'identification au stade larvaire est donc nécessaire, ce qui requiert le marquage génétique.

Le recours aux marqueurs génétiques reste nécessaire pour étudier, de la même façon, la biologie et l'écologie des larves des espèces commerciales : d'autres grands Serranidae comme la loche bleue (*E.*

*cyanopodus*), la loche tachetée (*E. fuscoguttatus*) ou la saumonée (*Plectropomus leopardus*), des Scaridae comme le perroquet bleu (*Scarus microrhinos*), le bec de cane et la plupart des grands Lethrinidae, ainsi que les poissons qui subissent une pression de pêche intense tout en étant vulnérables du fait qu'ils vivent en bancs sur petits fonds : les mullets ou Mugilidae (*Liza* spp., *Valamugil* spp., entre autres), les picots ou Siganidae, dont le picot rayé (*Siganus lineatus*), le perroquet à bosse (*Bolbometopon muricatum* ; Scaridae), etc.

Enfin, les travaux visant au marquage génétique des larves ont des retombées en taxonomie et en systématique puisqu'ils permettent de signaler l'existence éventuelle d'espèces cryptiques. Le travail effectué sur les Lethrinidae dans le cadre des opérations de recherche ZoNéCo (Borsa et al. 2005, 2006b ; présent travail) en est l'illustration. Des travaux préliminaires montrent qu'il en est de même chez les Mugilidae [J.-D. Durand (IRD) et P.B., observations personnelles]. Ces deux familles constituent, avec les Siganidae et les Acanthuridae, l'essentiel des prises commerciales ou de subsistance par les pêcheurs côtiers en Nouvelle-Calédonie (Letourneur et al. 2000 ; Léopold et al. 2004 ; Labrosse et al. 2006 ; Guillemot et al. 2009). La taxonomie des espèces de ces familles doit être approfondie en préalable au suivi et à la gestion de leur exploitation en Nouvelle-Calédonie.

**Remerciements** – Les spécimens adultes de référence ont été déposés dans les collections du MNHN (Paris) : merci à Romain Causse et Patrice Pruvost du laboratoire d'Ichtyologie du MNHN pour leur aide. Les spécimens juvéniles ont été capturés par Camille Mellin dans le cadre de son projet de thèse et identifiés à l'espèce par elle et Gérard Mou-Tham. Les séquençages ont été confiés à MacroGen Inc. (Séoul, Corée), que nous remercions ici. Une partie des séquences nucléotidiques ont été déposées dans GENBANK (National Institute of Health, Bethesda MD, U.S.A.). Des échanges approfondis, par e-mail, avec Bob Ward (CSIRO, Hobart) ont stimulé notre réflexion sur le barcoding. Enfin, nous remercions Adrien Rivaton et Pablo Chavance (ZoNéCo) pour leur aide et leur confiance. Contributions des co-auteurs : le projet de recherches sur l'identification des larves, dans lequel s'inscrit la présente action de recherche sur les Lethrinidae, a été proposé par P.B. et D.P. ; la collection de spécimens de référence de Nouvelle-Calédonie a été constituée de 2002 à 2009 par P.B. et A.C. ; les échantillonnages et les tris des larves ont été réalisés par L.C. et D.P. ; les analyses moléculaires ont été faites par A.C. (VCAT, IRD – UR081) et S.L. (CDD ZoNéCo) au laboratoire de génétique des populations de l'IRD Nouméa, sous la direction de P.B. ; des compléments d'analyses ont été réalisés par W.-J.C. au laboratoire de Richard L. Mayden à l'université de Saint-Louis du Missouri (U.S.A.) ; P.B. a effectué la mise en forme et l'analyse des données et rédigé le présent rapport. Ceci est une contribution de l'unité de recherche CoReUs - « Biocomplexité des écosystèmes récifaux » (UR 128 – IRD) dirigée par Jocelyne Ferraris.

## Références bibliographiques

- Akimoto S., Itoi S., Sezaki S., Borsa P., Watabe S. 2006. Identification of alfonso *Beryx* species collected in Japan based on the mitochondrial cytochrome *b* gene and their comparison with those collected in New Caledonia. *Fisheries Science* 72, 202-207.
- Allegrucci G., Caccone A., Sbordoni V. 1999. Cytochrome *b* sequence divergence in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and phylogenetic relationships among some Perciformes species. *J Zool Syst Evol Research* 37, 149–156.

- Allen G. 1997. Marine fishes of tropical Australia and Southeast Asia, 3rd revised edn. Western Australian Museum, Perth, 292 p.
- Anonyme 2002. Material safety data sheets – Formamide. Southeast Fisheries Science Center, National Oceanic and Atmospheric Administration, Miami (<http://www.sefsc.noaa.gov/HTMLdocs/Formamide.htm>).
- Assemblée de la Province Nord 2008. Délibération n° 2008-306/APN du 24 octobre 2008 relative au code de l'environnement de la province Nord. Journal Officiel de la Nouvelle-Calédonie 8269, 8578-8664.
- Assemblée de la Province Sud 2009. Délibération n° 25-2009/APS du 20 mars 2009 relative au code de l'environnement de la province Sud. Journal Officiel de la Nouvelle-Calédonie 8308, 2590-2739.
- Avise J.C., Saunders N.C. 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*) – Analysis by mitochondrial-DNA and allozyme markers. *Genetics* 108, 237-255.
- Ballard J.W.O., Whitlock M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729–744.
- Bearez P. 2003. First record of *Scolopsis taeniopterus* (Nemipteridae) and *Gymnocranius elongatus* (Lethrinidae) from New Caledonia. *Cybium* 27, 61-62.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148-155.
- Borsa P. 2003. Genetic structure of round scad mackerel *Decapterus macrosoma* (Carangidae) in the Indo-Malay archipelago. *Marine Biology* 142, 575-581.
- Borsa P., Carassou L., Collet A., Ponton D. 2005. Les premiers stades de vie des poissons de Nouvelle-Calédonie : diversité des espèces et rôle des zones côtières pour leur croissance et leur survie. Rapport pour Zonéco, IRD, Nouméa, 116 p.
- Borsa P., Collet A., Carassou L., Ponton D. 2006a. Multiple-locus fingerprints identify emperor larvae (Teleostei : Lethrinidae). Poster, Forum Biodiversité des écosystèmes coralliens, Nouméa, 30 octobre – 4 novembre 2006.
- Borsa P., Collet A., Carassou L., Ponton D., Chen W.-J., en préparation. Utility of multiple nuclear gene genotyping and mitochondrial 16S rDNA SSCP in identifying emperors and large-eye brems (Teleostei: Perciformes: Lethrinidae) with comments on new large-eye bream species from New Caledonia.
- Borsa P., Collet A., Lemer S. 2006b. Les premiers stades de vie des poissons de Nouvelle-Calédonie : identification des habitats lagonaires pour les stades pré- et post-installation. Volet thématique 3 : Identification des jeunes stades. Rapport de fin de contrat, Zonéco 2005. IRD, Nouméa, 23 p.
- Borsa P., Kulbicki M., Collet A., Lemer S., Mou Tham G. 2009. Biologie et écologie du bec-de-cane, *Lethrinus nebulosus* (Forsskål), en Nouvelle-Calédonie. Rapport d'opération ZoNéCo. IRD, Nouméa, 67 p.
- Borsa P., Quignard J.-P. 2001. Systematics of the Atlantic-Mediterranean soles *Pegusa impar*, *P. lascaris*, *Solea aegyptiaca*, *S. senegalensis*, and *S. solea* (Pleuronectiformes: Soleidae). *Canadian Journal of Zoology* 79, 2297-2302.
- Carassou L. 2008. Les assemblages de larves de poissons dans le lagon de Nouvelle-Calédonie : structure spatio-temporelle et relations avec les facteurs abiotiques et biotiques de l'environnement. Thèse de Doctorat, spécialité océanologie biologique, École Pratique des Hautes Études, Perpignan, 292 p.
- Carassou L., Mellin C., Ponton D. 2009. Assessing the diversity and abundances of larvae and juveniles of coral reef fish: a review of six sampling techniques. *Biological Conservation* 18, 355-371
- Carassou L., Ponton D. 2007. Les premiers stades de vie des poissons de Nouvelle-Calédonie : identification des habitats lagonaires pour les stades pré- et post installation. Volet thématique 1 : stades pré-installation. Rapport d'opération ZoNéCo. IRD, Nouméa, 73 p.
- Carassou L., Ponton D., Mellin C., Galzin D. 2008. Predicting the structure of larval fish assemblages by a hierarchical classification of meteorological and water column forcing factors. *Coral Reefs* 27, 867-880.

- Carpenter K.E. 2001. Lethrinidae - Emperors (emperor snappers). Pp. 3004-3050 in Carpenter K.E., Niem V.H. (eds) FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western central Pacific. Volume 5: Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae). FAO, Rome.
- Carpenter K.E., Allen, G.R. 1989. FAO Species Catalogue. Vol. 9. Emperor fishes and large-eye breams of the world (family Lethrinidae). An annotated and illustrated catalogue of lethrinid species known to date. FAO Species Synopsis 125, 118 p.
- Carpenter K.E., Randall J.E. 2003. *Lethrinus rarus*, a new species of emperor fish (Perciformes: Lethrinidae) from the western Pacific and eastern Indian oceans. *Zootaxa* 240, 1-8.
- Clare E.L., Lim B.K., Engstrom M.D., Eger J.L., Hebert P.D.N. 2007. DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7, 184–190.
- Coleman N. 1981. Australian sea fishes north of 30°S. Doubleday, Sydney, 297 p.
- Costa F.O., deWaard J.R., Boutillier J., Ratnasingham S., Dooh R.T., Hajibabaei M., Hebert P.D.N. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64, 272–295.
- Cuvier G.L.C.F.D., Valenciennes A. 1830. Histoire naturelle des poissons, tome sixième, livre sixième. Partie I. Des Sparoïdes ; Partie II. Des Ménides. *Hist. Nat. Poiss. v. 6*. F.G. Levrault, Paris, pp. i-xxiv + 6 + 1-559, pls. 141-169.
- Dasmahapatra K.K., Mallet J. 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97, 254-255.
- de Garine-Wichatitsky M., Amir H., Borsa P., Bouraima S., Cassar O., Goarant C., Marini J.-F., Touzain F. 2005. – Caractérisation génétique et approches moléculaires de la gestion du vivant en Nouvelle-Calédonie. Projet de plate forme de recherche pour les sciences du vivant, troisième version, juillet 2005. Institut agronomique calédonien, Port-Laguerre, 30 p.
- Deng H., He F., Zhang S., et al. 1993. Quantitative measurements of vibration threshold in healthy adults and acrylamide workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 65: 53-56.
- Ebisawa A., Ozawa T. 2009. Life-history traits of eight *Lethrinus* species from two local populations in waters off the Ryukyu Islands. *Fisheries Science* 75, 553-566.
- Fricke R., Kulbicki M. 2007. Checklist of the shore fishes of New Caledonia. *Documents Scientifiques et Techniques (IRD, Nouméa), Sér. II 7*, 2nd edn.: 357-401.
- Guillemot N., Léopold M., Cuif M., Chabanet P. 2009. Characterization and management of informal fisheries confronted with socio-economic changes in New Caledonia (South Pacific). *Fisheries Research* 98, 51-61.
- Hajibabaei M., Janzen D.H., Burns J.M., Hallwachs W., Hebert P.D.N. 2006a. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 103, 968–971.
- Hall T.A. 1999. BIOEDIT: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101, 14812–14817.
- Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PloS Biology* 2, 1657–1663.
- Hoarau G., Borsa P. 2000. Extensive gene flow within sibling species in the deep-sea fish *Beryx splendens*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III* 323, 315-325.
- Hogg I.D., Hebert P.D.N. 2004. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, 749–754.

- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., BurrIDGE M., Watkinson D., Dumont P., Curry A., Bentzen P., Zhang J., April J., Bernatchez L. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plos One* 3, e2490. doi: 10.1371/journal.pone.0002490
- Hurst G.D.D., Jiggins F.M. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. R. Soc. Lond. B* 272, 1525–1534.
- Justine J.-L., Briand M.J. sous presse. Three new species, *Lamellodiscus tubulicornis* n. sp., *L. magnicornis* n. sp. and *L. parvicornis* n. sp. (Monogenea: Diplectanidae) from *Gymnocranius* spp. (Lethrinidae: Monotaxinae) off New Caledonia, with proposal of the new morphological group 'tubulicornis' within *Lamellodiscus* Johnston & TiegS, 1922. *Syst. Parasitol.*
- Klanten S.O., van Herwerden L., Choat H.J., Blair D. 2004. Patterns of lineage diversification in the genus *Naso* Acanthuridae). *Mol. Phyl. Evol.* 32, 221–235.
- Kruse J.A. 1992. Methanol poisoning. *Intensive Care Medicine* 18, 391-397.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Kuriwa K., Hanzawa N., Yoshino T., Kimura S., Nishida M. 2007. Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes (Teleostei: Siganidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Mol. Phyl. Evol.* 45, 69-80.
- Labrosse P., Letourneur Y., Kulbicki M., Paddon J. 2000. Commercial demersal fish stock assessment of the Northern New Caledonian Lagoon: 3 - Links between field data and socio-economic aspects. *Aquatic Living Resources* 13, 91-98.
- Labrosse P., Ferraris J., Letourneur Y. 2006. Assessing the sustainability of subsistence fisheries in the Pacific: the use of data on fish consumption. *Ocean and Coastal Management* 49, 203-221.
- Lebrun M. (coordinateur) 2007. – Plateforme régionale du vivant en biologie moléculaire. Projet n° 1/2007 déposé auprès du Fonds de coopération économique, sociale et culturelle pour le Pacifique. IRD, Nouméa, 22 p.
- Lefebure T., Douady C.J., Gouy M., Gibiert J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 435-447.
- Leis J.M., Carson-Ewart B.M. (eds.) 2000. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes: an identification guide to marine fish larvae. Brill, Leiden, 850 p.
- Leis J.M., Trnski T. 1989. The larvae of Indo-Pacific shorefishes. New South Wales University Press, Kensington, 371 p.
- Lemer S., Aurelle D., Vigliola L., Durand J.-D., Borsa P. 2007. Cytochrome *b* barcoding, molecular systematics and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *Comptes Rendus Biologies* 330, 86-94.
- Léopold M., Ferraris J., Labrosse P. 2004. Assessment of the reliability of fish consumption as an indicator of reef fish catches in small Pacific islands: the example of Ouvéa Island in New Caledonia. *Aquatic Living Resources* 17, 119–127.
- Lessa E.P., Applebaum G. 1993. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Molecular Ecology* 2, 119-139
- Lo Galbo A., Carpenter K.E., Reed D.L. 2002. Evolution of trophic types in emperor snappers (*Lethrinus*, Lethrinidae, Percoidae) based on cytochrome *b* gene sequence variation. *Journal of Molecular Evolution* 54, 754-762.
- Majorel-Louergue C., Maggia L., Wabete N., Goarant C., Lebrun M., Hamid A., Angue J.-C. 2009. The regional genomic core research facilities for life science in New-Caledonia. In Mery P. (ed.) : Proceedings, Pacific Science Intercongress, Papeete.

- Mayr E. 1970. Populations, species and evolution. Harvard University Press, Cambridge MA.
- Meyer C.P., Paulay G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3, 2229–2238.
- Orrell T.M., Carpenter K.E. 2004. A phylogeny of the fish family Sparidae (porgies) inferred from mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 425–434.
- Orrell T.M., Carpenter K.E., Musick J.A., Graves J.E. 2002. A phylogenetic and biogeographic analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidae) based on cytochrome *b* sequences. *Copeia* 2002, 618–631.
- Palumbi S., Martin A., Romano S., McMillan W.O., Stice L., Grabowski G. 1991. The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, 47 p.
- Perrin C., Borsa P. 2001. Mitochondrial DNA analysis of the geographic structure of Indian scad mackerel, *Decapterus russelli* (Carangidae) in the Indo-Malay archipelago. *Journal of Fish Biology* 59, 1421–1426.
- Poignonec D. 2007. Apport de la combinaison cartographie cognitive/ontologie dans la compréhension de la perception du fonctionnement d'un écosystème récifo-lagonaire de Nouvelle-Calédonie par les acteurs locaux. Thèse Docteur-ingénieur. ENSA Rennes
- Ponton D., Mellin C. 2007. Les premiers stades de vie des poissons de Nouvelle-Calédonie : identification des habitats lagonaires pour les stades pré- et post installation. Volet thématique 2 : stades post-installation. Rapport d'opération ZoNéCo. IRD, Nouméa, 110 p.
- Powell J.R. 1983. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow – Evidence from *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 80, 492–495.
- Randall, J.E. 2005. Reef and shore fishes of the South Pacific New Caledonia to Tahiti and the Pitcairn Islands. University of Hawai'i Press, Honolulu.
- Raychoudhury R., Baldo L., Oliveira D.C.S.G., Werren J.H. 2009. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution* 63, 165–183.
- Reed D.L., de Gravelle M.J., Carpenter K.E. 2001. Molecular systematics of *Selene* (Perciformes: Carangidae) based on cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21, 468–475
- Rohfritsch A., Borsa P. 2005. Genetic structure of Indian scad mackerel *Decapterus russelli*: Pleistocene vicariance and secondary contact in the central Indo-West Pacific seas. *Heredity* 95, 315–326.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–425.
- Samadi S., Barberousse A. 2006. The tree, the network, and the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 89, 509–521.
- Sato T. 1978. A synopsis of the sparoid fish genus *Lethrinus* with the description of a new species. *Univ. Mus., Univ. Tokyo Bull.* 15, 1–70.
- Sato T. 1986. A systematic review of the sparoid fishes of the subfamily Monotaxinae. In: Uyeno T., Arai R., Taniuchi T., Matsuura K. (eds.), *Indo-Pacific fish biology: proceedings of the second international conference on Indo-Pacific fishes*, Ichthyological Society of Japan, Tokyo, pp. 602–612.
- Smith J.L.B. 1959. Fishes of the family Lethrinidae from the western Indian Ocean. *Ichth. Bull. Rhodes Univ.* 17, 285–295, pls 20–25
- Solomons K., Cochrane J.W. 1984. Formaldehyde toxicity. Part II. Review of acute and chronic effects on health. *South African Medical Journal* 66, 103–6.
- Spolsky C., Uzzell T. 1984. Natural interspecies transfer of mitochondrial-DNA in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 81, 5802–5805.

- Sword G.A., Senior L.B., Gaskin J.F., Joern A. 2007. Double trouble for grasshopper molecular systematics: intra-individual heterogeneity of both mitochondrial 12S-valine-16S and nuclear internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences in *Hesperotettix viridis* (Orthoptera; Acrididae). *Systematic Entomology* 32, 420–428.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Thalmann O., Hebler J., Poinar N., Pääbo S., Vigilant L. 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Molecular Ecology* 13, 321–335.
- Valentini A., Pompanon F., Taberlet P. 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24, 110-117.
- Ward R.D., Holmes B.H. 2007. An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes* 7, 899–907.
- Ward R.D., Costa F.O., Holmes B.H., Steinke D. 2008a. DNA barcoding shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa but a likely two species for both *Zeus faber* (John dory) and *Lepidopus caudatus* (silver scabbardfish). *Aquatic Biology* 3, 71–78.
- Ward R.D., Holmes B.H., White W.T., Last P.R. 2008b. DNA barcoding Australian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59, 57–71.
- Ward R.D., Holmes B.H., Yearsley G.K. 2008c. DNA barcoding reveals a likely second species of Asian seabass (barramundi) (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Biology* 72, 458–463.
- Ward R.D., Hanner R., Hebert P.D.N. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* 74, 329–356.
- Ward R.D., Zemlak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N. 2005. Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1847–1857.
- Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29, 188–197.
- Wilson G.G. 1998. A description of the early juvenile colour patterns of eleven Lethrinus species (Pisces: Lethrinidae) from the Great Barrier Reef, Australia. *Records of the Australian Museum* 50, 55-83.
- Yamanoue Y., Miya M., Matsuura K., Yagishita N., Mabuchi K., Sakai H., Katoh M., Nishida M. 2007. Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 89-101.
- Yoo H.S., Eah J.Y., Kim J.S., Kim Y.J., Min M.S., Paek W.K., Lee H., Kim C.B. 2006. DNA barcoding Korean birds. *Molecules and Cells* 22, 323–327.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier, Amsterdam, 443 pages.

**Annexe 1** Lethrininae de Nouvelle-Calédonie : géotypes multi-locus individuels

| Espèce,<br>Individu n°   | Identification initiale  | Locus    |             |             |          |      |
|--------------------------|--------------------------|----------|-------------|-------------|----------|------|
|                          |                          | 16S rRNA | Aldo B fast | Aldo B slow | GnRH 1   | Met  |
| <i>L. atkinsoni</i>      |                          |          |             |             |          |      |
| Z 04                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 11                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 992      | –    |
| Z 14                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D2       | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 16                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 23                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 992      | –    |
| Z 29                     | <i>L. atkinsoni</i>      | D3       | –           | –           | 1000     | –    |
| Z 158                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 1000     | –    |
| Z 159                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D2       | 1007        | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 160                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 161                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 992      | –    |
| Z 218                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 219                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 220                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 221                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 222                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 223                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 224                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007 1017   | 937         | 992      | –    |
| Z 225                    | <i>L. atkinsoni</i>      | –        | 1007 1017   | 937         | 1000 992 | –    |
| Z 226                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | 1007        | 937         | 1000     | –    |
| Z 235                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D        | –           | –           | 1000     | –    |
| Z 308                    | <i>L. atkinsoni</i>      | –        | –           | –           | –        | –    |
| Z 348                    | <i>L. atkinsoni</i>      | D*       | 1007 1017   | 937         | 1000     | –    |
| <i>L. erythracanthus</i> |                          |          |             |             |          |      |
| Z 217                    | <i>L. erythracanthus</i> | E*       |             |             | 984      |      |
| <i>L. genivittatus</i>   |                          |          |             |             |          |      |
| Z 26                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | –           | 976      | 1011 |
| Z 27                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | –           | 976      | 1011 |
| Z 34                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | 937         | 976      | –    |
| Z 35                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | –           | 976      | 1011 |
| Z 36                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | –           | 976      | –    |
| Z 37                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | –           | 976      | 1011 |
| Z 38                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | 937         | 976      | 1011 |
| Z 39                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | –           | 937         | 976      | 1011 |
| Z 40                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | 1007        | 937         | 976      | 1011 |
| Z 41                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | –           | –           | 976      | –    |
| Z 42                     | <i>L. genivittatus</i>   | G        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 01                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 02                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 03                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 04                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 05                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 06                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 07                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 08                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 09                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 10                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 11                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 12                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 13                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 14                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 15                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 16                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | –        | –    |
| Zj 17                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 18                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 19                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 20                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 21                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |
| Zj 22                    | Lethrininae              | –        | –           | –           | 976      | –    |

|       |             |   |   |   |     |   |
|-------|-------------|---|---|---|-----|---|
| Zj 23 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 24 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 25 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 26 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 27 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 28 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 29 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 30 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 31 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 32 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 33 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 34 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 35 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 36 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 37 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 38 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 39 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 40 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 41 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 42 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 43 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 44 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 45 | Lethrininae | - | - | - | -   | - |
| Zj 46 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 47 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 48 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 49 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 50 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 51 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 52 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 53 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 54 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 55 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 56 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 57 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 58 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 59 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 60 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 62 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 63 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 64 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 65 | Lethrininae | - | - | - | -   | - |
| Zj 66 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 67 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 68 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 69 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 70 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 71 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 72 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 73 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 74 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 75 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 76 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 77 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 78 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 79 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 80 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 81 | Lethrininae | - | - | - | -   | - |
| Zj 82 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 83 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 84 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 85 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 86 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 87 | Lethrininae | - | - | - | 976 | - |
| Zj 88 | Lethrininae | - | - | - | -   | - |

|                 |                 |   |      |     |          |      |
|-----------------|-----------------|---|------|-----|----------|------|
| Zj 89           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 90           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 91           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 92           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 93           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 94           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 95           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 96           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 97           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 98           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 99           | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 100          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 101          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 102          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 103          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 104          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 105          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 106          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 107          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 108          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 109          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 110          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 111          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 112          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 113          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 114          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 115          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 116          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 117          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 118          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 119          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 120          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 121          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 122          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 123          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 124          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 125          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| Zj 126          | Lethrininae     | — | —    | —   | 976      | —    |
| LET_1_01        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_02        | Lethrininae     | G | —    | —   | 976      | 1011 |
| LET_1_03        | Lethrininae     | G | —    | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_04        | Lethrininae     | G | —    | —   | 976      | 1011 |
| LET_1_05        | Lethrininae     | G | —    | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_06        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_07        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_08        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_09        | Lethrininae     | G | —    | —   | 976      | —    |
| LET_1_10        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_11        | Lethrininae     | G | —    | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_12        | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET_1_13        | Lethrininae     | G | —    | —   | 976      | —    |
| LET 2 Zj 61     | Lethrininae     | G | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| LET 2 (new)     | Lethrininae     | — | 1007 | 937 | 976      | 1011 |
| <i>L. barak</i> |                 |   |      |     |          |      |
| Z 07            | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 08            | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 13            | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 15            | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 229           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 247           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 248           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 249           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 250           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 984      | —    |
| Z 309           | <i>L. barak</i> | E | 1007 | 937 | 1000 984 | —    |

|                    |                    |     |      |         |          |          |
|--------------------|--------------------|-----|------|---------|----------|----------|
| <i>L. lentjan</i>  |                    |     |      |         |          |          |
| Z 02               | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 195              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | —       | 992      | —        |
| Z 205              | <i>L. lentjan</i>  | B2  | 1007 | 937     | 992 984  | —        |
| Z 206              | <i>L. lentjan</i>  | B4  | 1007 | 937     | 992 984  | —        |
| Z 207              | <i>L. lentjan</i>  | B2* | 1007 | 937     | 992 984  | —        |
| Z 208              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992 984  | —        |
| Z 210              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 212              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 213              | <i>L. lentjan</i>  | B2  | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 215              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 216              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 251              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 252              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 253              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 277              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 278              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| Z 279              | <i>L. lentjan</i>  | B   | 1007 | 937     | 992      | —        |
| <i>L. miniatus</i> |                    |     |      |         |          |          |
| Z 03               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 89               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000 842 |
| Z 90               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000     | 1000 842 |
| Z 91               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000     | 1000 842 |
| Z 92               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000 842 |
| Z 93               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000 984 | 1000 842 |
| Z 94               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 95               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 96               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 97               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 984      | 1000     |
| Z 98               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 99               | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 100              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 101              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 102              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 103              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | —       | 1000     | 1000     |
| Z 104              | <i>L. miniatus</i> | C2  | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 105              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 106              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 107              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 108              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 109              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 110              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 111              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 112              | <i>L. miniatus</i> | C   | —    | —       | 1000     | 1000     |
| Z 113              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 114              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 115              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 116              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000 984 | 1000     |
| Z 117              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000 984 | 1000     |
| Z 118              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 119              | <i>L. miniatus</i> | C   | —    | —       | 1000     | 1000     |
| Z 120              | <i>L. miniatus</i> | C   | —    | —       | 1000     | 1000     |
| Z 121              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000     | 1000     |
| Z 125              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | —       | 1000     | 1000     |
| Z 139              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 140              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 141              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000     | 1000     |
| Z 142              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 143              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | —       | 1000     | 1000     |
| Z 144              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 244              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000 984 | 1000 842 |
| Z 332              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 333              | <i>L. miniatus</i> | C   | 1000 | 945     | 1000 984 | 1000     |

|                     |                     |      |      |         |          |          |
|---------------------|---------------------|------|------|---------|----------|----------|
| Z 334               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 335               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 336               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | —       | 1000 984 | 1000     |
| Z 337               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937     | 1000 984 | 1000     |
| Z 338               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 339               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 345               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 945     | 1000     | 1000     |
| Z 346               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 945     | 1000 984 | 1000     |
| Z 347               | <i>L. miniatus</i>  | C4   | 1000 | 937 945 | 1000 984 | 1000     |
| Z 349               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937     | 1000     | 1000     |
| Z 350               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | —       | 1000     | 1000     |
| Z 351               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| Z 352               | <i>L. miniatus</i>  | C    | 1000 | 937 945 | 1000     | 1000     |
| <i>L. nebulosus</i> |                     |      |      |         |          |          |
| Z 06                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 43                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 44                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 45                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 46                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 47                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 48                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 49                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 50                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 51                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 52                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 53                | <i>L. nebulosus</i> | E'2* | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 54                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 55                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 56                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 57                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 58                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 59                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 60                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 61                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 62                | <i>L. nebulosus</i> | E'4* | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 63                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 64                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 65                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 66                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 67                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 68                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | —    | —       | 984      | 1013 965 |
| Z 69                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 70                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 71                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 72                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 73                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 74                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 75                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 76                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 77                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 78                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 79                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 80                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 81                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 82                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 83                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 84                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984      | 1013 965 |
| Z 85                | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984      | 1013 965 |
| Z 122               | <i>L. nebulosus</i> | E'   | —    | —       | 984      | 1013 965 |

|       |                     |      |      |         |     |          |
|-------|---------------------|------|------|---------|-----|----------|
| Z 123 | <i>L. nebulosus</i> | E'2* | 1007 | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 124 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 127 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 128 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 129 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 130 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 131 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 132 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 133 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 134 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 135 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 136 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 137 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 138 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 162 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 163 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 164 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 165 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 166 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 167 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 168 | <i>L. nebulosus</i> | E'3* | –    | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 169 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | –    | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 170 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | –    | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 171 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 172 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 173 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | –    | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 174 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | –    | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 175 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 176 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | –    | –       | –   | 1013 965 |
| Z 182 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 197 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 198 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 200 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 227 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 228 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 230 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 231 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 232 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 233 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 234 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 236 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 237 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 238 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 255 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 321 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 322 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 937     | 984 | 1013 965 |
| Z 323 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | –       | 984 | 1013 965 |
| Z 324 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 325 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 326 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 327 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 328 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 329 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 330 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 331 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |
| Z 344 | <i>L. nebulosus</i> | E'   | 1007 | 930 937 | 984 | 1013 965 |

*L. obsoletus*

|                            |                            |    |           |     |      |      |
|----------------------------|----------------------------|----|-----------|-----|------|------|
| Z 12                       | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 145                      | <i>L. obsoletus</i>        | —  | —         | —   | —    | —    |
| Z 146                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 280                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 281                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 282                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 312                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 313                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| Z 314                      | <i>L. obsoletus</i>        | E" | 1007      | 937 | 984  | —    |
| <i>L. olivaceus</i>        |                            |    |           |     |      |      |
| Z 09                       | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 10                       | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 86                       | <i>L. olivaceus</i>        | L  | —         | —   | 1000 | 1014 |
| Z 183                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | —         | —   | 1000 | 1014 |
| Z 184                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | —         | —   | 1000 | 1014 |
| Z 196                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 254                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 256                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 257                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | —    |
| Z 258                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 259                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007 1008 | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 260                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 261                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 262                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 263                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007 1008 | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 264                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| Z 265                      | <i>L. olivaceus</i>        | L  | 1007 1009 | 937 | 1000 | 1014 |
| LET 3                      | Lethrininae                | L  | 1007      | 937 | 1000 | 1014 |
| <i>L. rarus</i>            |                            |    |           |     |      |      |
| Z 31                       | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 148                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 149                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 150                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 151                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 152                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 153                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 154                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 155                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 156                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 157                      | <i>L. rarus</i>            | K* | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 239                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 240                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 241                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 242                      | <i>L. rarus</i>            | K' | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 243                      | <i>L. rarus</i>            | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| <i>L. rubrioperculatus</i> |                            |    |           |     |      |      |
| Z 05                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 19                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 20                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K2 | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 21                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 22                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K2 | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 30                       | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 340                      | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 341                      | <i>L. rubrioperculatus</i> | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 342                      | <i>L. rubrioperculatus</i> | K2 | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 343                      | <i>L. rubrioperculatus</i> | K2 | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| <i>L. semicinctus</i>      |                            |    |           |     |      |      |
| Z 87                       | <i>L. semicinctus</i>      | F  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 88                       | <i>L. semicinctus</i>      | F  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 310                      | <i>L. semicinctus</i>      | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |
| Z 311                      | <i>L. semicinctus</i>      | K  | 1007      | 945 | 1000 | —    |

|                             |                        |    |           |         |      |      |
|-----------------------------|------------------------|----|-----------|---------|------|------|
| <i>L. variegatus</i>        |                        |    |           |         |      |      |
| Z 28                        | <i>L. variegatus</i>   | I  | 988       | 937     | 1016 | –    |
| Z 33                        | <i>L. variegatus</i>   | I  | 988       | 937     | 1016 | –    |
| <i>L. xanthochilus</i>      |                        |    |           |         |      |      |
| Z 185                       | <i>L. xanthochilus</i> | J2 | 1007      | 945     | 1000 | –    |
| Z 186                       | <i>L. xanthochilus</i> | J  | –         | –       | –    | –    |
| Z 187                       | <i>L. xanthochilus</i> | J  | 1007      | 945     | 1000 | –    |
| Z 188                       | <i>L. xanthochilus</i> | J  | 1007      | 945     | 1000 | –    |
| Z 189                       | <i>L. xanthochilus</i> | J  | 1007      | 945     | 1000 | –    |
| Z 190                       | <i>L. xanthochilus</i> | J2 | 1007      | 945     | 1000 | –    |
| Z 191                       | <i>L. xanthochilus</i> | J  | –         | –       | 1000 | –    |
| <i>Lethrinus</i> sp. A      |                        |    |           |         |      |      |
| Z 209                       | <i>L. lentjan</i>      | B3 | 1007      | 937 945 | 1000 | –    |
| Z 211                       | <i>L. lentjan</i>      | B3 | 1007      | 937     | 1000 | –    |
| Z 214                       | <i>L. lentjan</i>      | B3 | 1007      | 937     | 1000 | –    |
| <i>Lethrinus</i> sp. B Bali |                        |    |           |         |      |      |
| Z 201                       | <i>L. olivaceus</i>    | L2 | 1007 1009 | 945     | 1000 | 1014 |
| <i>Lethrinus</i> sp. C Bali |                        |    |           |         |      |      |
| Z 202                       | <i>L. olivaceus</i>    | L3 | 1007 1008 | 937     | 1000 | 964  |
| Z 203                       | <i>L. olivaceus</i>    | L3 | 1007 1008 | 937     | 1000 | 964  |

- *L. miniatus*: pour estimer les fréquences alléliques dans l'échantillon, nous avons interprété les patterns de bandes faibles au locus *Aldo-B slow* comme hétérozygotes 945 937, mais nous ne pouvons exclure qu'il s'agissait d'homozygotes nuls ou quasi-nuls.

- *Lethrinus* sp. A : uniquement à Makassar. Initially identified as *L. lentjan* from morphology but distinguished a posteriori from *L. lentjan* by its genotypic composition at loci *16S RNA* and *GnRH-1*. On peut exclure que B3 = *L* d'après les gels SSCP : B3 et L ("LA") de z262 étant côte à côte sur le gel SSCP n° 92. En conséquence il n'y a pas eu de confusion avec *L. olivaceus*.

- *Lethrinus* sp. B : uniquement à Bali. Initially identified as *L. olivaceus* from morphology but distinguished a posteriori from *L. olivaceus* by its genotypic composition at loci *16S RNA* and *Aldo-B slow*. L2 est unique sur les SSCP. Association stricte avec l'allèle 945 au locus *Aldo-B slow* en fait une espèce distincte de *L. olivaceus*. Pourrait-il s'agir de *L. microdon* ? Les autres espèces avec *Aldo-B 945* sont *L. xanthochilus* (exclue par la SSCP), *L. rarus* (idem), *L. rubrioperculatus* (idem), *L. semicinctus* (idem) et *L. miniatus* (exclu par son génotype au locus *Met*)

- *Lethrinus* sp. C : uniquement à Bali. Initially identified as *L. olivaceus* from morphology but distinguished a posteriori from *L. olivaceus* by its genotypic composition at loci *16S RNA* and *Met-1*. L3 est unique sur les SSCP. Son association stricte avec l'allèle 964 au locus *Met* fait de *Lethrinus* sp. C une espèce distincte de *L. olivaceus*. Pourrait-il s'agir de *L. microdon* ?

**Annexe 2** Monotaxinae de Nouvelle Calédonie : géotypes multi-locus individuels

| Espèce,<br>Individu n°                   | Identification initiale | Locus           |                    |           |               |            |
|--|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------|---------------|------------|
|  |                         | <i>16S rRNA</i> | <i>Aldo B fast</i> | <i>CK</i> | <i>GnRH 1</i> | <i>Met</i> |
| <i>Gnathodentex aureolineatus</i>        |                         |                 |                    |           |               |            |
| Z 283                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200/190   | 1008          | 949        |
| Z 284                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200       | 1008          | 949        |
| Z 285                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200       | 1008          | 949        |
| Z 286                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200/190   | 1008          | 949        |
| Z 287                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200       | 1008          | 949        |
| Z 288                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200/190   | 1008          | 949        |
| Z 289                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M2              | –                  | 200       | 1008          | 949        |
| Z 290                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200       | 1008          | 949        |
| Z 291                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M3              | 1007               | 200       | 1008          | 949        |
| Z 292                                    | <i>G. aureolineatus</i> | M               | 1007               | 200/190   | 1008          | 949        |
| <i>Gymnocranius euanus</i>               |                         |                 |                    |           |               |            |
| Z 01                                     | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008          | 926        |
| Z 17                                     | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008/1000     | 926        |
| Z 18                                     | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008/1000     | 926        |
| Z 24                                     | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008/1000     | 926        |
| Z 25                                     | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008          | 926        |
| Z 126                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | –                  | 144       | 1000          | 926        |
| Z 147                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008          | 926        |
| Z 315                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | –                  | 144       | –             | 926        |
| Z 316                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1000          | 926        |
| Z 317                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1000          | 926        |
| Z 318                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | 1008 1000     | 926        |
| Z 319                                    | <i>G. euanus</i>        | A"              | 1007               | 144       | –             | 926        |
| <i>Gymnocranius grandoculis</i>          |                         |                 |                    |           |               |            |
| Z 32                                     | <i>G. grandoculis</i>   | H               | 1007               | 142       | 1008 968      | 935        |
| Z 177                                    | <i>G. grandoculis</i>   | H               | 1007               | 145       | 1000 984      | 935        |
| Z 178                                    | <i>G. grandoculis</i>   | H               | 1007               | –         | 1000 992      | 935        |
| Z 245                                    | <i>G. grandoculis</i>   | H               | 1007               | 145       | 1000 968      | 935        |
| Z 320                                    | <i>G. grandoculis</i>   | H               | 1007               | 145/142   | 1000          | 935        |
| <i>Gymnocranius</i> , sp. A indéterminée |                         |                 |                    |           |               |            |
| Z 199                                    | <i>G. grandoculis</i>   | A"              | 1017               | 140       | 992           | 949        |
| Z 293                                    | <i>G. grandoculis</i>   | A"              | 1017               | 140       | 1008 992      | 949        |
| Z 294                                    | <i>G. grandoculis</i>   | A"              | 1017               | 140       | 1008 992      | 949        |
| Z 295                                    | <i>G. grandoculis</i>   | A"              | 1017               | 140       | 1008          | 949        |
| Z 296                                    | <i>G. grandoculis</i>   | A"              | 1017               | 140       | 1008 992      | 949        |
| LET 4                                    | Monotaxinae             | A"              | 1017               | 140       | 1008          | 949        |
| <i>Gymnocranius</i> , sp. B indéterminée |                         |                 |                    |           |               |            |
| Z 179                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1000          | 935        |
| Z 180                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1000          | 935        |
| Z 246                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1008          | 935        |
| Z 269                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1008          | 935        |
| Z 270                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1008          | 935        |
| Z 271                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 984 968       | 935        |
| Z 272                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1000 992      | 935        |
| Z 273                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1008 968      | 935        |
| Z 274                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1008 968      | 935        |
| Z 275                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1000 968      | 935        |
| Z 276                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A"              | 1007               | 142       | 1000 992      | 935        |

|  |                         |    |      |         |           |     |
|--|-------------------------|----|------|---------|-----------|-----|
| Z 300                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1008 992  | 935 |
| Z 302                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | H3 | –    | 142     | 1008 1000 | 935 |
| Z 303                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1008 992  | 935 |
| Z 304                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1008 992  | 935 |
| Z 306                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1008 984  | 935 |
| Z 307                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1000 992  | 935 |
| <i>Gymnocranius</i> , sp. C indéterminée |                         |    |      |         |           |     |
| Z 301                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142     | 1008 992  | 926 |
| Z 305                                    | <i>Gymnocranius</i> sp. | A" | 1007 | 142/140 | 1008 992  | 926 |
| <i>Monotaxis grandoculis</i>             |                         |    |      |         |           |     |
| Z 181                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A  | 1007 | 147     | 1008      | 935 |
| Z 192                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A2 | 1007 | 147     | 1008      | 935 |
| Z 204                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A  | –    | –       | 1008      | 935 |
| Z 266                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A3 | 1007 | 147     | 1008      | 935 |
| Z 267                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A4 | 1007 | 147     | 1008      | 935 |
| Z 268                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A3 | 1007 | 147     | 1008      | 935 |
| Z 297                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A5 | –    | 147     | 1008      | 935 |
| Z 298                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A5 | 1007 | –       | 1008      | 935 |
| Z 299                                    | <i>M. grandoculis</i>   | A5 | 1007 | 147     | 1008      | 935 |

---

**Annexe 3** Tri des larves (**A**) et des juvéniles (**B**) de Lethrinidae par morpho-espèce et identification morphologique et par barcode

**A** Larves

| Morpho-espèce (L.C.) | No. D.P. | Identification D.P. / L.C. | No. S.L. | Identification P.B. |
|----------------------|----------|----------------------------|----------|---------------------|
| LETR 1               | L404-001 | LETR 1                     | J001     | Lgen                |
| LETR 1               | L438-001 | LETR 1                     | J002     | Lgen                |
| LETR 1               | L458-001 | LETR 1                     | J003     | Lgen                |
| LETR 1               | L518-002 | LETR 1                     | J004     | Lneb                |
| LETR 1               | L518-003 | LETR 1                     | J005     | Lneb                |
| LETR 2               | L682-001 | LETR 2                     | J012     | Lhar                |
| LETR 2               | L688-001 | LETR 2                     | J013     | Lhar                |
| LETR 3               | L420-001 | LETR 3                     | J014     | Lgen                |
| LETR 3               | L420-002 | LETR 3                     | J015     | Lgen                |
| LETR 3               | L550-001 | LETR 3                     | J016     | Lneb                |
| LETR 3               | L566-001 | LETR 3                     | J017     | Lgen                |
| LETR 4               | L534-001 | LETR 4                     | J022     | Lneb                |
| LETR 4               | L544-002 | LETR 4                     | J023     | Lneb                |
| LETR 4               | L544003  | LETR 4                     | J024     | Lneb                |
| LETR 4               | L566-002 | LETR 4                     | J025     | Lneb                |
| LETR 5               | L404-002 | LETR 5                     | J031     | Lgen                |
| LETR 5               | L544-004 | LETR 5                     | J033     | Lneb                |
| LETR 5               | L544-005 | LETR 5                     | J034     | Lneb                |
| LETR 5               | L560-001 | LETR 5                     | J035     | Lneb                |
| LETR 6               | L518-005 | LETR 6                     | J038     | Lvar                |
| LETR 6               | L518-006 | LETR 6                     | J039     | Lvar                |
| LETR 6               | L518-007 | LETR 6                     | J040     | Lvar                |
| LETR 7               | L566-004 | LETR 7                     | J041     | Loli                |
| LETR 9               | L340-001 | LETR 9                     | J043     | Lneb                |
| LETR 9               | L388-001 | LETR 9                     | J044     | Lgen                |
| LETR 9               | L476-001 | LETR 9                     | J045     | Lmin                |
| LEOLI                | L590-002 | LEOLI                      | J046     | Loli                |
| LEGEN                | L388-002 | LEGEN                      | J052     | Lgen                |
| LEGEN                | L400-003 | LEGEN                      | J053     | Lgen                |
| LEGEN                | L400-004 | LEGEN                      | J054     | Lgen                |
| LEGEN                | L404-004 | LEGEN                      | J055     | Lgen                |
| LEGEN                | L404-006 | LEGEN                      | J056     | Lgen                |

**B** Juvéniles

| Morpho-espèce (C. Mellin) | No. D.P.  | Identification C. Mellin / G. Mou-Tham | No. S.L. | Identification P.B. |
|---------------------------|-----------|--|----------|---------------------|
| LEHAR 32                  | CSSM A    | LEHAR                                  | J077     | Lhar                |
| LEVAR-A-18                | CSSM U    | LEVAR                                  | J078     | Lvar                |
| LEVAR-A-33                | CSSM I    | LEVAR                                  | J079     | Lvar                |
| LEVAR-A-46                | CSSM E    | LEVAR                                  | J080     | Lvar                |
| LEVAR-A-36                | CSSM G    | LEVAR                                  | J081     | Lvar                |
| LEVAR-C-17                | CSSM W    | LEVAR                                  | J082     | Lvar                |
| LEGEN-A-18                | S0365 007 | LEGEN                                  | J084     | Lgen                |
| LEGEN-A-40                | S0365 011 | LEGEN                                  | J085     | Lgen                |
| LEGEN-A-83                | S0618 005 | LEGEN                                  | J086     | Lgen                |
| LEGEN-B-19                | S0229 021 | LEGEN                                  | J087     | Lgen                |
| LEGEN-B-20                | S0229 022 | LEGEN                                  | J088     | Lgen                |

**Annexe 4** Photographies de larves de Lethrinidae de Nouvelle-Calédonie identifiées à l'espèce à l'aide des marqueurs moléculaires



09\_8-L400-003



10\_7-L388-002



14\_7-L420-001



15\_5-L438-001



16\_3-L420-002



16\_7-L458-001



17\_0-P0457-001



17\_2-L404-002



17\_6-L400-004



17\_9-L566-001



18\_0-L388-001



19\_0-S0229-021



19\_4-L404-001



20\_0-P0325-005



20\_0-P0390-002



20\_0-S0229-022



21\_0-P0326-001



21\_0-S0229-029



21\_0-S0325-012



22\_0-S0325-013



34\_6-S0365-007



40\_0-S0365-011



83\_0-S0618-005



12\_5-L688-001



13\_9-L682-001



32\_0-CSSM\_A



23\_6-L476-001



14\_6-L340-001



15\_8-L544-004



16\_6-L518-002



17\_0-L544-003



17\_4-L544-002



17\_7-L544-005



18\_1-L534-001



18\_1-L566-002



18\_3-L560-001



19\_1-L518-003



19\_6-L550-001



17\_8-L566-004



18\_0-L590-002



13\_5-L518-005



13\_5-L518-006



14\_2-L518-007



17\_0-CSSM\_W



18\_0-CSSM\_U



33\_0-CSSM\_I



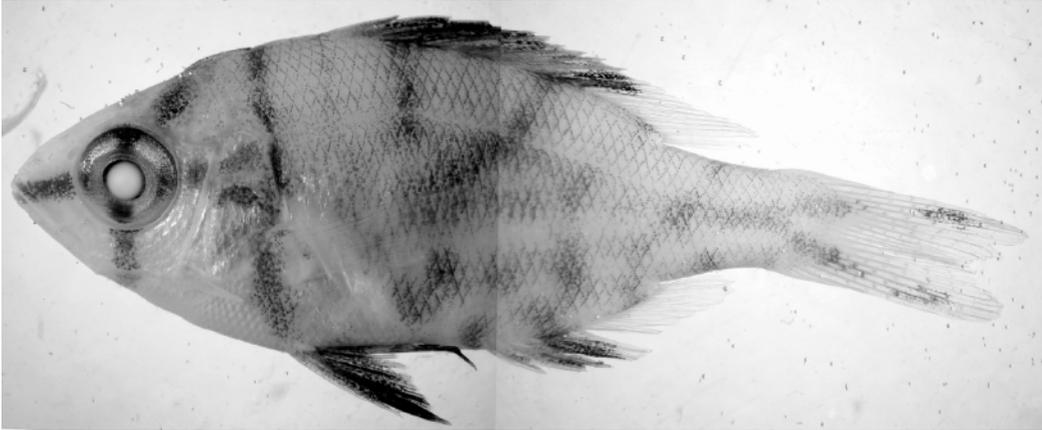
36\_0-CSSM\_G



46\_0-CSSM\_E



57\_0-CSCB\_C



LET 4 *Gymnocranius* sp. A