

Article

Observation d'*Isoperla ambigua* (Despax, 1936) dans les Pyrénées (Plecoptera, Perlodidae)

Alexandre Ruffoni* & Bertrand Launay**

*Office pour les insectes et leur environnement, chemin rural n°7, B.P. 30, 78041 Guyancourt cedex France ; alexandre.ruffoni@insectes.org; <https://orcid.org/0000-0002-5754-7838>

**Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) - UR Riverly, 69625 Villeurbanne, France ; bertrand.launay@inrae.fr

Reçu le 18 mars 2024 - Accepté le 28 juin 2024 - Publié le 9 janvier 2025

RÉSUMÉ

L'identification du genre *Isoperla* est souvent complexe. *Isoperla ambigua* a récemment été découvert dans les Pyrénées à proximité d'Andorre, dans le département des Pyrénées-Orientales sur deux cours d'eau (à plus de 1800 m d'altitude) très proches l'un de l'autre, tous deux affluents de la rivière Ariège. Les caractéristiques morphologiques des spécimens collectés sont rapidement passées en revue. Enfin, une portion de 658 paires de bases du gène COI d'un échantillon de l'espèce est séquencée et comparée aux données existantes sur plusieurs autres espèces d'*Isoperla* de France métropolitaine.

Mots-clés : *rivulorum*, Plécoptères, Andorre, France, analyse moléculaire.

Observation of *Isoperla ambigua* (Despax, 1936) from eastern Pyrenees (Plecoptera, Perlodidae)

ABSTRACT

The identification of the *Isoperla* genus is often complex. *Isoperla ambigua* was recently discovered in the Pyrenees, near Andorra, in the Pyrénées-Orientales department, in two close streams (at altitudes of over 1800 m), both tributaries of the Ariège River. The morphological characteristics of the collected specimens are briefly reviewed. Finally, a 658-base-pair portion of the COI gene from a sample of the species is sequenced and compared with existing data from several other *Isoperla* species from mainland France.

Keywords: *rivulorum*, Stoneflies, Andorra, France, molecular analysis.

1. Introduction

Le genre *Isoperla* est le plus diversifié des Perlodidae avec actuellement 188 espèces connues (DEWALT et al. 2021). Les Pyrénées ont été la cible des balbutiements des investigations historiques sur les *Isoperla* grâce aux travaux de DESPAX (1936) et cinq espèces y sont actuellement notées (OPIE-BENTHOS 2023). Les études de Berthélemy (BERTHÉLEMY 1979, BERTHÉLEMY & LAHOUD 1981) laissent néanmoins entrevoir une richesse spécifique nettement plus importante. L'identification des espèces est donc particulièrement difficile dans ce massif. Ainsi, depuis 2014, des investigations ont été entamées, dans un premier temps pour étayer une clef d'identification des larves de Plécoptères de France métropolitaine (RUFFONI 2024), mais ensuite pour clarifier taxonomiquement ce genre dans les Pyrénées. Ce dernier travail est partiellement en cours de finalisation.

Isoperla ambigua a été décrite en 1936 par DESPAX, d'un mâle provenant du sud du Massif central (la Montagne Noire), de Haute-Garonne à Saint-Ferréol (commune de Revel) et d'un autre mâle du département du Cantal au Lioran. L'espèce fut souvent considérée comme endémique au Massif central. Très proche morphologiquement d'*Isoperla rivulorum* (Pictet, 1841), elle fait partie du groupe *rivulorum* (CONSIGLIO 1967) qui regroupe une dizaine d'espèces dans l'ouest paléarctique.

L'espèce est assez apicale, occupant la partie supérieure des cours d'eau, sources et ruisselets à basse altitude et parfois jusqu'à de plus importants ruisseaux ailleurs. La larve vit principalement dans le courant au niveau des radiers dans les graviers et galets (non colmatés). La période de vol est très étalée dans le temps, d'avril (mars) à octobre (RUFFONI 2024).

Les connaissances sur l'espèce acquises pendant l'inventaire des Plécoptères de France (INVP, Opie-benthos) ont permis de relativiser sa répartition, en la trouvant effectivement dans tout le Massif central, mais aussi sur des zones de

relief attenantes comme le Plateau de Langres (RUFFONI 2012). À noter qu'une des stations-types en Montagne Noire est extrêmement méridionale et constituait jusqu'à maintenant la limite sud de sa distribution.

Lors de prospections dans les Pyrénées pour faire progresser la connaissance taxonomique du genre *Isoperla*, des spécimens attribués à *I. ambigua* ont été collectés.

2. Méthodes

Des prospections ont ainsi été effectuées très régulièrement d'une extrémité à l'autre des Pyrénées en essayant d'actualiser les connaissances acquises dans les années 1970 sur le groupe *grammatica* (BERTHÉLEMY 1979), mais aussi d'éclaircir le statut des taxons *I. viridinervis* et *I. moselyi*. Ainsi, les investigations ont plutôt concerné le crénon et le rhithron.

a. Méthodes de collecte

Les adultes ont été collectés à l'aide d'un filet fauchoir ou à l'aide de pinces souples. La collecte des larves a été faite par mobilisation des substrats et récolte des dérivants par l'intermédiaire d'une passoire à mailles fines. Les individus sont ensuite conservés dans l'alcool à 70 % ou 96 % et stockés dans la collection du premier auteur.

b. Identification larvaire et imaginale

Aucun document synthétique publié n'existe sur l'identification des espèces françaises d'*Isoperla*. Pour les adultes, différentes publications doivent être jointes afin de couvrir la faune de France continentale (principalement : DESPAX 1936, 1951, KIS 1974, TIerno DE FIGUEROA et al. 2003, TIerno DE FIGUEROA & VINÇON 2005, ROESTI 2021). Dans la bibliographie, les critères d'identification se concentrent essentiellement sur la forme des armatures péniales du mâle (pénis qu'il faut dévagner *in vivo*), mais aussi celle des spicules qui la composent, celle de la plaque femelle, la coloration dorsale céphalique (principalement forme de la tache intra-oculaire et présence de taches postoculaires) ainsi que la forme

de la plaque sternale du segment 9 du mâle. Plus marginalement, sont également utilisées la coloration dorso-abdominale ou celle des cerques ainsi que leur pilosité et leur longueur, voire la forme des paraproctes. La collection de l'INVP a permis également de comparer la morphologie de nombreux exemplaires des espèces collectées.

Concernant les larves, une clé d'identification en cours de publication a été utilisée (RUFFONI 2024).

c. Analyse moléculaire

Une analyse moléculaire a été réalisée afin de pouvoir confirmer l'identification d'un mâle adulte.

Ainsi, une portion du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase I (COI) d'échantillons préalablement conservés à -20 °C dans de l'éthanol à 96 %, a été séquencée.

L'ADN a été extrait à partir d'une patte métathoracique, plongée dans 150 µL de Chelex à 7 % (WALSH et al. 1991) et 10 µL de protéinase K, puis incubée à 50 °C (2 heures), 90 °C (15 minutes) et 15 °C (5 minutes). L'amplification a été réalisée par PCR suivant deux protocoles différents. Le premier est détaillé dans LAUNAY et al. 2021 et concerne les individus notés * dans le tableau 1. Le second concerne ceux notés ° et adopte le protocole suivant : 2 µL d'ADN extrait sont mélangés dans 15,75 µL d'eau, 2 µL d'amorces 5' et 3' (FOLMER et al. 1994) à 10 µM, 5 µL de solution tampon 5X (PCRBIO) et 0,25 µL de Taq polymérase (PCRBIO Taq DNA Polymerase PB10.11-05). Cette solution a été placée 1 min à 95°C puis soumise 40 fois au cycle thermique suivant : 20 s à 95 °C, 30 s à 53 °C et 25 s à 72 °C. La PCR a été finalisée par 5 min à 72 °C.

Avant l'envoi au séquençage, le succès de l'amplification des séquences du COI a été vérifié en faisant migrer 5 µL de produit PCR sur gel d'agarose à 1,3 % avec du TAE 1 X, 0,6 µL de ladder et 1 µL de bleu GelRed.

Le séquençage a ensuite été réalisé dans les deux sens (5'-3' et 3'-5') par Microsynth France

SAS par la méthode Sanger (SANGER et al. 1977). Le nettoyage des chromatogrammes (Forward et Reverse) fut exécuté manuellement ainsi que la réalisation des séquences consensus à l'aide du logiciel Condon Code Aligner (Condon Code Corporation, version 9.0.2). Le logiciel Seaview version 4.7 (GOUY et al. 2010) a permis l'alignement des séquences avec la méthode Clustalo (SIEVERS et al. 2011). Les séquences consensus déposées sur la base de données GenBank (NCBI RESOURCE COORDINATORS 2018) ont leur « accession number » indiqué dans le Tableau 1.

Les séquences complémentaires d'*Isoperla* et l'individu « outgroup » *Dictyogenus alpinum* (Pictet, 1841) (GU682169.1) utilisées dans l'analyse phylogénétique ont été téléchargées sur NCBI (NCBI RESOURCE COORDINATORS 2018) et BOLDSYSTEMS (RATNASINGHAM & HERBERT 2007) (Tab. 1). L'arbre phylogénétique a été calculé par la méthode du maximum de vraisemblance (ML) implémentée dans le logiciel Mega-X version 10.2.6 (KUMAR et al. 2018), en utilisant le modèle évolutif Tamura à 3 paramètres (Tn+G+I) (TAMURA 1992) comme recommandé par Mega-X. La robustesse des nœuds a été évaluée par 1 000 répliques de bootstraps non-paramétriques (FELSENSTEIN 1985).

3. Résultats

Un mâle et deux larves ont été identifiés près d'Andorre dans le département des Pyrénées-Orientales sur les communes de Porta et Portepuymorens.

Matériel examiné

Porta (66146), Rec del Bac d'en Morer, Nationale 22, 1 951 m ; 42,5588, 1,754063 ; 1 mâle le 03/07/2018, (accession number PP003389), 1 jeune larve le 27/05/2019 (leg. Alexandre Ruffoni); Portepuymorens (66147), Rec del Baladrar, Nationale 22, 1 873 m; 42,556477, 1,76834; 1 larve de dernier stade le 03/07/2018 (leg. Alexandre Ruffoni).

Espèce	Localité	Référence	Accession number
<i>Isoperla orobica</i>	Suisse	LUBINI et al. 2023	OR600535.1
<i>Isoperla orobica</i>	Suisse	LUBINI et al. 2023	OR600534.1
<i>Isoperla orobica</i>	Suisse	LUBINI et al. 2023	OR600533.1
<i>Isoperla oxylepis</i>	Allemagne	MORINIÈRE et al. 2017	KY261300.1
<i>Isoperla oxylepis</i>	France	GAUTHIER et al. 2020	MK584372.1
<i>Isoperla goertzi</i>	Allemagne	MORINIÈRE et al. 2017	KY262502
<i>Isoperla goertzi</i>	Allemagne	MORINIÈRE et al. 2017	KY261980
<i>Dictyogenus alpinum</i>	Allemagne	Barcode of Life (iBOL)	GU682169.1
<i>Isoperla rivulorum</i>	France	MORINIÈRE et al. 2017	GBCOU1196-13 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	France	MORINIÈRE et al. 2017	GBCOU1197-13 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	France	MORINIÈRE et al. 2017	GBCOU1198-13
<i>Isoperla rivulorum</i>	France	MORINIÈRE et al. 2017	GBEPT192-13 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	Autriche	NA	INTAP187-17 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	Autriche	NA	INTAP226-17 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	France	GAUTHIER et al. 2020	MK584518
<i>Isoperla rivulorum</i>	Suisse	NA	PLEAA171-20 ¹
<i>Isoperla rivulorum</i>	Suisse	NA	PLEAA237-20 ¹
<i>Isoperla carbonaria</i>	Suisse	NA	PLEAA215-20 ¹
<i>Isoperla carbonaria</i>	Suisse	NA	PLEAA335-20 ¹
<i>Isoperla ambigua</i>	France	GAUTHIER et al. 2020	MK584371.1
<i>Isoperla ambigua</i> ^o	France	présente étude	PP003389
<i>Isoperla obscura</i>	Allemagne	MORINIÈRE et al, 2017	KY262336
<i>Isoperla obscura</i> ^o	France	présente étude	PP003392
<i>Isoperla grammatica</i> [*]	France	présente étude	PP003396
<i>Isoperla moselyi</i> [*]	France	non publiée	NA
<i>Isoperla moselyi</i> [*]	France	présente étude	PP003394
<i>Isoperla luzoni</i> [*]	France	non publiée	NA
<i>Isoperla luzoni</i> [*]	France	présente étude	PP003393
<i>Isoperla viridinervis</i> ^o	France	non publiée	NA
<i>Isoperla acicularis</i> ^o	France	non publiée	NA
<i>Isoperla acicularis</i> ^o	France	non publiée	NA
<i>Isoperla difformis</i> ^o	France	présente étude	PP003390
<i>Isoperla difformis</i> ^o	France	présente étude	PP003391

Tableau 1. Détails et origine des séquences du marqueur mitochondrial COI utilisées.

¹: issues de BOLD Systems; * et ^o : méthodes d'amplification de l'ADN, cf. 2-c.

Table 1. Details and origin of COI mitochondrial marker sequences used.1: from BOLD Systems; * and ^o: DNA amplification methods, see 2-c.

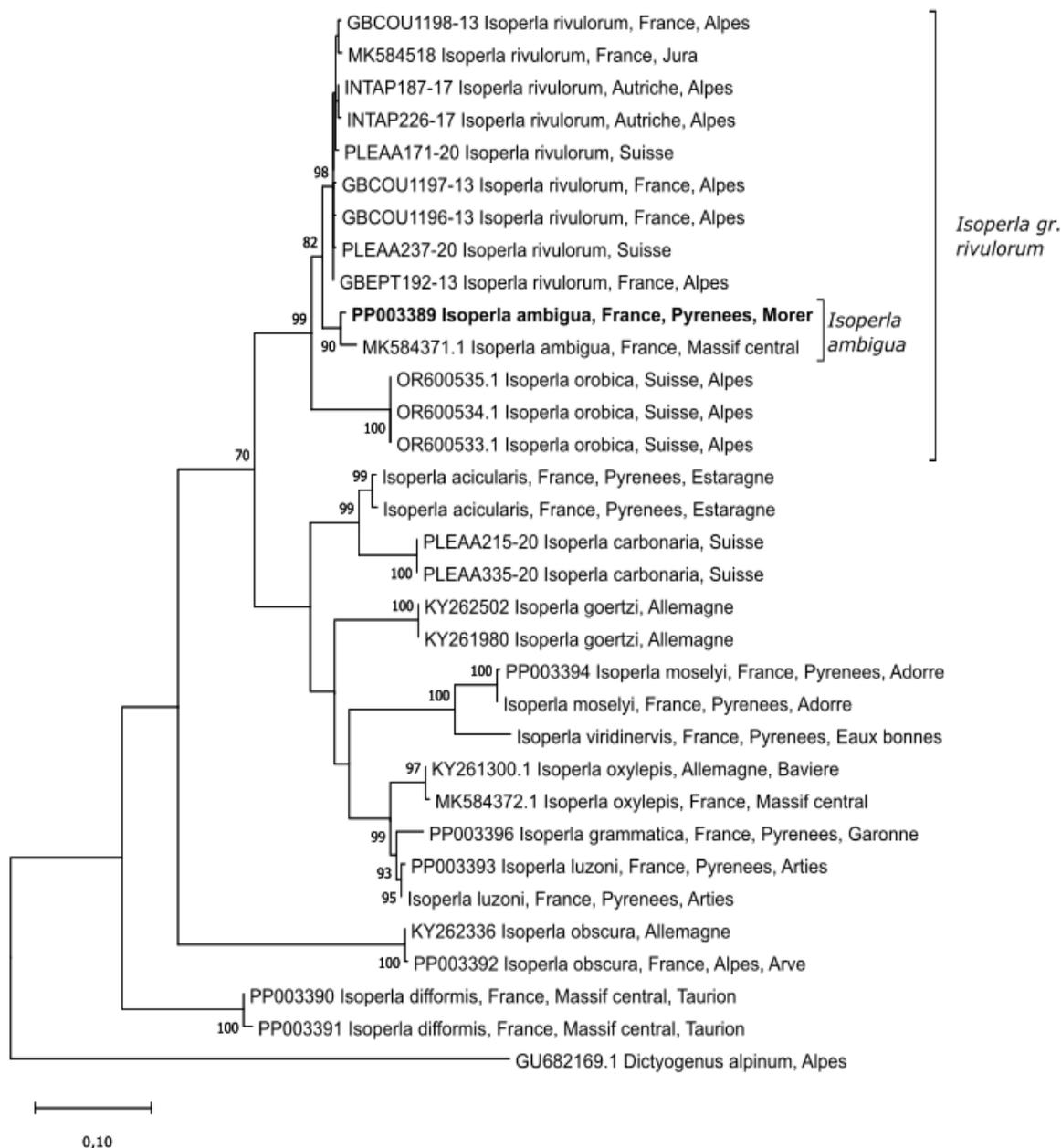


Figure 1. Arbre phylogénétique d'*Isoperla* basé sur 658 paires de bases du COI. L'arbre a été construit suivant la méthode du maximum de vraisemblance avec un modèle évolutif Tamura à trois paramètres. Les valeurs devant les nœuds correspondent aux résultats de 1000 bootstraps (%), seules les valeurs $\geq 70\%$ sont affichées.

Figure 1. Phylogenetic tree of *Isoperla* mitochondrial haplotypes based on 658 base pairs of COI. The tree was constructed using the maximum likelihood method with a three-parameter Tamura evolutionary model. The values in front of the nodes correspond to the results of 1000 bootstraps (%), only values $\geq 70\%$ are shown.



Figure 2. Mâle adulte d'*I. ambigua*: tête et prothorax en vue dorsale.

Figure 2. Male adult of *I. ambigua*: head and prothorax in dorsal view.

Le mâle adulte est macroptère et présente une coloration contrastée de jaune et sombre. La coloration céphalique, bien qu'estompée par la conservation, laisse deviner un H ou un X sombre reliant les ocelles et s'étendant vers l'avant de la tête. Les yeux sont assez petits et placés de manière latéro-antérieure (Fig.2). Les taches post-oculaires sont quasi invisibles. L'armature principale du pénis est triangulaire sans groupes accessoires (Fig.3). La plaque sternale du segment 9 du mâle est assez rectangulaire mais à marge postérieure relativement arrondie (Fig.4). Les cerques sont sombres avec des articles légèrement plus clairs à leur base. La larve de dernier stade observée présente une lacinia typiquement sub-rectangulaire, point commun avec *I. acicularis* (Despax, 1936), *I. carbonaria* Aubert, 1953, *I. goertzi* Illies,



Figure 3. Mâle adulte d'*I. ambigua*: pénis devaginé et armature en vue latérale de trois quarts.

Figure 3. Male adult of *I. ambigua*: extruded penis and armature in three-quarters side view.



Figure 4. Mâle adulte d'*I. ambigua*: plaque sternale du segment VIII (vue ventrale).

Figure 4. Male adult of *I. ambigua*: vesicule of sternite VIII (ventral view).

1952, *I. moselyi* (Despax, 1936) et *I. rivulorum*, mais nettement moins large que *I. difformis* (Klapálek, 1909) et *I. viridinervis* (Pictet, 1865) et plus que *I. grammatica* (Poda, 1761), *I. obscura* (Zetterstedt, 1840) et *I. oxylepis* (Despax, 1936).

Aucune soie submarginale marquée sur la lacinia n'est notée. La coloration céphalique dorsale peu contrastée et l'apex pointu des grandes soies prothoracique postéro-latérales marginales et abdominales tergaux marginales est commun à *I. ambigua*, *I. goertzi* et *I. rivulorum* (*I. ambigua* semblant le moins contrasté des trois). Les soies dorso-abdominales sont noires et épaisses et celles de la frange des cerques peu nombreuses (une dizaine, comprise dans la fourchette habituelle d'*I. ambigua* : 4 à 12 soies).

Du point de vue moléculaire (Tab. 1 et Fig. 1), la portion du gène mitochondrial COI distingue clairement le groupe *rivulorum* parmi les autres *Isoperla* de France et notamment les groupes composés d'*I. viridinervis* et *I. moselyi*, très fréquents dans les Pyrénées. L'échantillon collecté (PP003389) et l'*I. ambigua* du Massif central (MK584371) forment un unique clade bien distinct au sein du groupe *rivulorum*, soutenu par une valeur de bootstrap de 90 %, permettant ainsi de valider l'identification. Toutefois, *I. ambigua* et *I. rivulorum* restent génétiquement proches au sein du groupe en présentant un taux de divergence de seulement 3,1 %, mais des données complémentaires sont nécessaires pour le confirmer.

Les deux cours d'eau où ont été collectés larves et adultes d'*I. ambigua* sont des affluents de l'Ariège en rive nord. 1 à 1,5 km les séparent. Aux stations, les milieux correspondent à des épirhithrons froids avec une pente marquée (15 à 20 %) et aux habitats parsemés de gros éléments minéraux (Photo 1).

3. Discussion, conclusion

Le mâle adulte fut tout d'abord attribué, avec de gros doutes, au groupe *moselyi*, en cours de révision; néanmoins tous les critères le rapprochaient d'*I. ambigua*. Larves et analyse moléculaire confortent donc le diagnostic de cette dernière espèce.

À première vue, il demeure surprenant de trouver cette espèce assez apicale dans les Pyrénées, massif dans lequel les espèces *I. viridinervis*

et *I. moselyi* dominent dans ces zones typologiques de cours d'eau. Néanmoins, dans ce secteur géographique *I. viridinervis* semble extrêmement rare, voire absent ; toutefois des investigations supplémentaires sont nécessaires pour l'affirmer.

La répartition des espèces de Plécoptères au sein des Pyrénées est très complexe avec beaucoup d'endémisme dans certaines portions de cette chaîne, des espèces ibériques atteignant l'ouest du massif, mais aussi la présence de certaines autres d'origine plus continentale. Ces dernières comme *Besdolus imhoffi* (Pictet, 1841) (non retrouvé récemment), *Leuctra pseudocingulata* Mendl, 1968 ; *Protonemura montana* Kimmins, 1941 ; *Nemoura avicularis* Morton, 1894 ; *N. flexuosa* Aubert, 1949 ou *N. cambrica* Stephens, 1836, sont présentes sporadiquement dans les Pyrénées. Le Massif central représente la zone géographique nord la plus proche où le nombre de stations de ces espèces est important (*B. imhoffi* n'y est noté qu'historiquement et des doutes sont attribués à son identification). *L. pseudocingulata* et *P. montana* occupent d'ailleurs le même secteur géographique dans les Pyrénées où ont été faites les observations d'*I. ambigua*.

Remerciements

Nous tenons à remercier David Eme pour la relecture de ce travail.

Travaux cités

- BERTHÉLEMY, C. 1979. Mating calls and taxonomy in Pyrenean *Isoperla*. *Gewässer und Abwässer*, **64**: 71-72.
- BERTHÉLEMY, C. & M. LAHOUD. 1981. Régime alimentaire et pièces buccales de quelques Perlodidae et Perlidae des Pyrénées (Plecoptera). *Annales de Limnologie*, **17** (1) : 1-24.
<https://doi.org/10.1051/limn/198.1014>
- CONSIGLIO, C. 1967. Una nuova specie italiana e considerazioni sui gruppi di specie nel genere *Isoperla* (Plecoptera, Perlodidae). *Fragmenta Entomologica*, **5** : 67-75.



Photo 1. Lieu de collecte d'*I. ambigua* : le Rec del Bac d'en Morer.

Photo 1. Sampling site of *I. ambigua*: mountain stream « Rec del Bac d'en Morer ».

- DESPAX, R. 1936. Contribution à l'étude du genre *Chloroperla* [Pictet] (*Isoperla* Banks) (Plecoptera). *Bulletin de la Société d'Histoire naturelle de Toulouse*, **69** (3): 337-398.
- DESPAX, R. 1951. *Plécoptères*. Tome 55, in Faune de France : pp 1-180, P. Lechevalier, Paris.
- DEWALT, R.E., M.D. MAEHR, H. HOPKINS, U. NEUBECKER & G. STUEBER. 2021. *Plecoptera Species File Online*. Version 5.0/5.0. <http://Plecoptera.SpeciesFile.org>.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39** (4): 783-791
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ & R. VRIJENHOEK. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**: 294-299.
- GAUTHIER, M., L. KONECNY-DUPRÉ, A. NGUYEN, V. ELBRECHT, T. DATRY, C. DOUADY & T. LEFÉBURE. 2020. Enhancing DNA Metabarcoding Performance and Applicability with Bait Capture Enrichment and DNA from Conservative Ethanol. *Molecular Ecology Resources*, **20** (1) (janvier 2020): 79-96.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13088>.
- GOUY, M., S. GUINDON & O. GASCUEL. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, **27** (2): 221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- KIS, B. 1974. *Insecta. Plecoptera*. In Fauna Republicii Socialiste Românie, **8** (7) ; 271 pp.
- KUMAR, S., G. STECHER, M. LI, C. KNYAZ & K. TAMURA. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547-1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- LAUNAY, B., J. BARNASSON, J. BECQUET, M. BRULIN, S. CAUVY-FRAUNIE & M. FORCELLINI. 2021. Découverte d'une nouvelle population de *Rhithrogena delphinensis* Sowa & Degrange, 1987, dans le massif des Arves, et compléments à la description de la larve (Ephemeroptera, Heptageniidae). *Bulletin de*

- la Société entomologique de France*, **126** (4) : 401-420.
https://doi.org/10.32475/bsef_2218
- LUBINI-FERLIN, V., P. TEUFL, C. NOVOTNY & L. VUATAZ. 2023. Description of the larva of *Isoperla orobica* Ravizza, 1975 (Plecoptera, Perlodidae), with notes on ecology and distribution in Switzerland. *Alpine Entomology*, **7** (2 novembre 2023): 205-212.
<https://doi.org/10.3897/alpento.7.109021>.
- MORINIÈRE, J., L. HENDRICH, M. BALKE, A.J. BEERMANN, T. KÖNIG, M. HESS, S. KOCH, R. MÜLLER, F. LEESE, P.D.N. HEBERT, A. HAUSMANN, C.F. SCHUBART & G. HASZPRUNAR. 2017. A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera & Trichoptera). *Molecular Ecology Resources*, **17**: 1293-1307.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12683>
- NCBI RESOURCE COORDINATORS. 2018. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, **46** (D1): D8-D13.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- OPIE-BENTHOS 2023.
<https://www.opie-benthos.fr/opie/insecte.php>
- RATNASINGHAM, S. & P. D. N. HEBERT. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, **7**: 355-364.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- ROESTI, C. 2021. *Die Steinfliegen der Schweiz*. Haupt Verlag, Bern, Geb. 631 pp.
- RUFFONI, A. 2012. Inventaire des Plécoptères de Bourgogne (France) : premier bilan (Insecta, Plecoptera). *Ephemera*, **13** (1), 13-24.
- RUFFONI, A. 2024. *Les larves de Plécoptères de France métropolitaine - identification, biologie et écologie*. Office pour les insectes et leur environnement (Éditeur). Guyancourt (France). 557 pp.
- SANGER, F., S. NICKLEN & A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**: 5463-5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.
- SIEVERS F., A. WILM, D. DINEEN, T.J. GIBSON, K. KARPUS, W. LI, R. LOPEZ, H. MCWILLIAM, M. REMMERT, J. SÖDING, J.D. THOMPSON & D.G. HIGGINS. 2011. Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7** (1): 539-544.
<https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- TAMURA, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 678-687.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- TIERNO DE FIGUEROA, J. M. & G. VINÇON. 2005. A new West European species of the genus *Isoperla* (Plecoptera, Perlodidae). *Nouvelle revue d'Entomologie* (N.S.), **22**: 101-106.
- TIERNO DE FIGUEROA, J.M., A. SANCHEZ-ORTEGA, J.M. LUZON-ORTEGA & P. MEMBIELA-IGLESIAS. 2003. *Plecoptera* In Fauna iberica n° 22, 400 pp. M.A. Ramos et al. (eds). Museo nacional de ciencias naturales.
- WALSH, P. S., D. A. METZGER & R. HIGUCHI. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10** (4) :506-513.
<https://doi.org/10.2144/000114018>