

VINCENZO PETRARCA (\*)

### Importanza teorica e pratica dello studio cromosomico dei vettori di malaria (\*\*)

L'approccio morfologico convenzionale allo studio delle specie vettrici ha mostrato limiti notevoli negli ultimi anni. Sebbene generalmente si possa osservare una relazione tra l'ammontare di differenze genetiche e la probabilità che tali differenze vengano espresse a livello morfologico, i dati disponibili per differenti gruppi di vettori (particolarmente Culicidi e Simuliidi) mostrano che le divergenze morfologiche possono essere acquisite più lentamente dell'isolamento riproduttivo dando come risultato più evidente specie criptiche virtualmente indistinguibili dal punto di vista morfologico (cfr. Coluzzi, 1980). Ad esempio, la Figura 1 mostra la variabilità di un carattere morfologico in diverse popolazioni di due specie altamente criptiche del complesso *Anopheles gambiae* (Coluzzi, 1964). Si può osservare come esistano ampissimi gradi di sovrapposizione che rendono questo carattere, come tutti gli altri fino ad oggi considerati, del tutto inutili allo scopo tassonomico. Neanche tecniche molto sofisticate, quali l'esame di molti caratteri contemporaneamente mediante analisi statistica multivariata (Di Deco *et al.*, 1983) o mediante la microscopia elettronica a scansione (Hinton, 1967), riescono a migliorare significativamente la scarsa discriminabilità tra queste specie criptiche. In altri gruppi di specie gemelle esistono caratteri morfologici discriminanti esclusivamente in uno degli stadi di vita della zanzara, come ad esempio nel complesso *An. maculipennis* (Coluzzi, 1970) in cui è possibile reperire caratteri specie-specifici solo a livello delle uova. Tali caratteri possono però risultare a volte anche fortemente fuorvianti come in un caso (Coluzzi, comunicazione personale) in cui uova di *An. lebranchiae* raccolte in Marocco mostravano un esocorion incolore del tutto dissimile dal tipico pattern maculato delle uova di *An. lebranchiae* italiano, nonostante che la distanza genetica (rile-

(\*) Istituto di Parasitologia, Università di Roma «La Sapienza», Roma.

(\*\*) Relazione presentata alla «Giornata di studio sulla Malaria» (Roma, 23 settembre 1983).

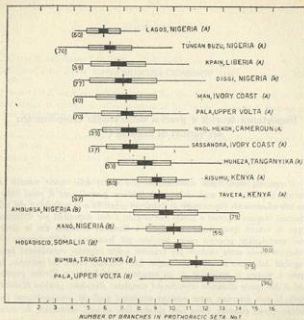


Fig. 1 — Numero di ramificazioni della setola prothoracica N. 1 in 11 ceppi di *Anopheles gambiae* s.s. (A) e 5 di *Anopheles arabiensis* (B). Le linee orizzontali mostrano il campo di variabilità osservato. I rettangoli corrispondono ad una deviazione standard e le zone scure indicano l'intervallo di confidenza al 95%. Le medie sono indicate da una linea verticale mentre il numero di esemplari esaminati è tra parentesi. (da Coluzzi, 1964).

vata elettrofoeticamente) tra i due gruppi non fosse superiore a quella normalmente riscontrata tra popolazioni locali della stessa specie (Bianchi-Bollini *et al.*, 1980). A complicare il quadro, si conoscono variazioni genetiche intraspecifiche che possono produrre notevoli eterogeneità biologiche senza che queste vengano necessariamente espresse a livello morfologico.

L'approccio genetico allo studio delle specie vettrici andrebbe pertanto considerato come parte essenziale dell'entomologia epidemiologica. La stima della capacità vettrice e della sua riduzione sotto l'impatto di misure di controllo contro il vettore è realmente sensata solo quando sia applicata a specie vettrici ben

TABELLA 1 - Identificazione del pasto di sangue in femmine di *Anopheles gambiae* s.s. e di *An. arabiensis* catturate nel villaggio di Jirima (Stato di Kano, Nigeria) e nell'accampamento dei pastori Fulani prossimo al villaggio stesso. (da Coluzzi *et al.*, 1975b).

Specie	VILLAGGIO			ACCAMPAMENTO FULANI		
	Numero esaminate	Positive per sangue umano numero	%	Numero esaminate	Positive per sangue umano numero	%
<i>gambiae</i> s.s.	129	129	100.00	84	66	78.57
<i>arabiensis</i>	199	165	82.91	535	102	30.45
Totale	328	294	89.63	419	168	40.10

conosciute dal punto di vista genetico. Eterogeneità genetiche del sistema vettore non messe in evidenza possono determinare una stima non corretta di parametri fondamentali per la valutazione della capacità vettrice, quali il tasso di contatto vettore-vertebrato, la sensibilità al parassita, l'arsena di vita infettante, le abitudini di preferenza per l'ospite, ecc. Ad esempio, nel caso illustrato in Tabella 1, due specie criptiche del complesso *gambiae* mostrano preferenze per l'uomo del tutto diverse in due condizioni ambientali molto differenti, ma mentre *An. gambiae* s.s. continua a mostrare una spiccata preferenza per l'uomo (misurata mediante analisi del pasto di sangue) anche in un ambiente (l'accampamento Fulani) in cui il rapporto uomo/animale è fortemente a vantaggio di questi ultimi, *An. arabiensis* mostra chiaramente preferenze opposte. Ancora più chiaro è il caso illustrato in Tabella 2 in cui è ben evidente una notevole disparità di indice sporozoitico tra *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis* che non sarebbe stata messa in evidenza con una identificazione classica mediante metodi morfologici: in conclusione queste specie criptiche possono esibire importanti differenze biologiche ed etologiche. Va sottolineata la rilevanza di questo punto considerando il modello matematico di MacDonald che viene comunemente usato per verificare l'effetto di misure di controllo contro il vettore sulla trasmissione della malaria. Secondo tale modello l'effetto di un insetticida è traslato in un effetto sulla trasmissione assumendo una riduzione uniforme della longevità di una popolazione vettrice. Tuttavia una riduzione uniforme della longevità implica necessariamente una esposizione uniforme all'insetticida, ad esempio una distribuzione casuale della popolazione vettrice nei confronti della superficie trattata con insetticida. Questi presupposti ovviamente cadrebbero qualora fosse messa in evidenza, come effettivamente è stata nel complesso *gambiae*, una relazione tra comportamento di riposo dell'alata e variabilità genetica. Di qui la necessità dello studio genetico delle specie vettrici.

Esperimenti di incrocio, genetica biochimica e citogenetica sono le principali metodologie genetiche finora applicate allo studio di specie e popolazioni

TABELLA 2 - Numero di femmine di *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis* positive per sporozoitii catturate in vari villaggi dello Stato di Kano (Nigeria). (da Coluzzi *et al.*, 1975b).

Villaggio	Numero <i>An. gambiae</i> s.s. esaminate	Numero positive	Numero <i>An. arabiensis</i> esaminate	Numero positive	Numero totale esaminate	Numero positive
Ajura	172	15	65	1	237	16
Gwadawa	324	32	179	8	503	40
Jirija (villaggio)	199	8	329	—	528	8
Jirima (accampamento Fulani)	69	3	182	—	251	3
Kwara	34	3	30	2	64	5
Totale	798	61	785	11	1583	72
Esemplari positivi %		7.64		1.40		4.85
Specie % sul totale esemplari esaminati	50.41		49.59			
Specie % sul totale esemplari positivi		84.72		15.28		

vettrici. Idealmente queste metodologie andrebbero combinate in un approccio genetico integrato ma in effetti solamente le tecniche di genetica biochimica sono largamente applicabili. Studi sulla ibridizzazione possono fornire ed hanno in effetti fornito dati di fondamentale importanza per la conoscenza di complessi di specie, particolarmente evidenziando la sterilità dell'ibrido (vedi White, 1974 e Kitzmiller, 1976). Anche quando sia espressa solo da leggere anomalie nella spermiogenesi, la sterilità dell'ibrido rappresenta una guida altamente affidabile alla distinzione specifica quantunque l'assenza di sterilità non indichi necessariamente conspecificità. In effetti lo studio della genetica degli Anofelini si può considerare iniziato con la scoperta delle specie criptiche Europee del complesso *An. maculipennis* nella prima metà di questo secolo. I primi studi di Corradetti negli anni '30 comprendevano infatti esperimenti di ibridizzazione mentre le prime osservazioni sui politenici larvali erano effettuate da Frizzi nella seconda metà degli anni '40. Lo studio elettroforetico di isozimi è stato già applicato con successo nella rilevazione di specie criptiche in vari gruppi di vettrici e nella valutazione di divergenze genetiche sia a livello interspecifico che intraspecifico; non c'è dubbio circa l'enorme potenziale di questo approccio nell'evidenziare eterogeneità nel sistema vettore come anche nel parassita e nell'ospite vertebrato (vedi Bullini e Coluzzi, 1978).

Gli Anofelini costituiscono un ottimo materiale per studi citogenetici, in quanto il numero cromosomico è basso ( $2n = 6$ ) permettendo così di ottenere con relativa facilità ottimi preparati di cromosomi mitotici, meiotici e politenici. Poiché il numero cromosomico degli Anofelini è costante e l'ammontare di variazioni intraspecifiche tra gli autosomi metacentrici è relativamente scarso, risulta

difficoltoso distinguere differenti modelli cariotipici specifici per cui gli studi sul cariotipo mitotico e meiotico sono stati fino ad oggi di scarso valore nel discriminare specie criptiche o varianti intraspecifici.

Migliori prospettive di analisi comparativa e differenziale dei cariotipi degli Anofelini sono state aperte con l'adozione di tecniche di bandeggio dei cromosomi. Ad esempio le tecniche di bandeggio in fluorescenza hanno messo in evidenza chiare differenze diagnostiche nella disposizione delle zone eterocromatiche dei cromosomi sessuali tra le specie del complesso *gambiae*, come anche l'esistenza di polimorfismi intraspecifici (Gatti *et al.*, 1982).

L'approccio citogenetico e lo studio dei cromosomi politenici, con il quale tratteremo più in dettaglio, è stato finora il campo della genetica dei vettori più ampiamente applicato con successo all'entomologia epidemiologica. Oggi sono possibili identificazioni tassonomiche affidabili e pratiche per vari complessi di specie criptiche, permettendo la separazione di specie epidemiologicamente importanti da altre che non lo sono affatto.

Gli Anofelini sono caratterizzati dalla presenza di cromosomi politenici giganti, con una bandatura il più delle volte ben definita, sia nei nuclei delle cellule delle ghiandole salivari delle larve come anche nelle sette cellule nutrici dei follicoli ovarici di femmine adulte gonotroficamente attive (Coluzzi, 1968). La presenza di cromosomi politenici nelle cellule nutrici ovariche delle alate presenta l'ovvio vantaggio di permettere di conoscere immediatamente il cariotipo dell'adulto senza dover ricorrere a incroci di laboratorio con ceppi di riferimento.

Senza dubbio una delle più importanti applicazioni dello studio della citogenetica degli Anofelini è stata l'identificazione di specie criptiche simpatriche con metodi citotassonomici in quanto la differenziazione cromosomica che molto spesso accompagna la speciazione degli Anofelini fornisce una quantità di affidabili caratteri specie-specifici. Una delle prime applicazioni consistette nell'identificazione delle specie criptiche paleartiche del complesso *maculipennis* altrimenti distinguibili, ma come si è detto non sempre con sicurezza, solo basandosi sui caratteri morfologici delle uova. Va comunque notato che proprio nel complesso *maculipennis* la coppia *atoparvus-labanchiae* costituisce un caso di specie omosequenziali, ovvero di specie non distinguibili neanche a livello dei cromosomi politenici (vedi Coluzzi, 1970). Diverso è il caso del complesso Afrotropicale *Anopheles gambiae*, le cui sei specie gemelle sono praticamente del tutto indistinguibili sul piano morfologico convenzionale e possono essere inequivocabilmente differenziate solo con l'esame dei cromosomi politenici. L'identificazione di queste specie è infatti basata sul riconoscimento di caratteri citotassonomici dovuti ad inversioni paracentriche fissate su tutti i bracci cromosomici ma anche e in alcuni casi principalmente sul cromosoma X (Coluzzi *et al.*, 1979). L'identificazione cromosomica viene oggi correntemente praticata in varie parti dell'Africa ed ha permesso studi molto precisi sulla distribuzione relativa delle specie del complesso con ovvie economie di tempo e di attrezzature nella pianificazione ed attuazione di programmi ed operazioni di controllo di questi pericolosi vettori. La Figura 2 illustra in modo schematico la situazione presente del complesso

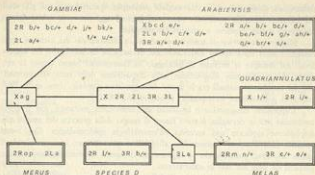


Fig. 2 — Il complesso *Anopheles gambiae*. Sono illustrate le relazioni tra i cromosomi polimerici delle sei specie del complesso a partire da un ipotetico standard centrale. Le lettere singole rappresentano inversioni fissate, mentre le inversioni polimorfiche sono indicate con il simbolo di eterozigosi. (da Coluzzi *et al.*, 1979).

*gambiae*, costituito come è noto da sei specie di cui solo due (*gambiae* s.s. e *arabiensis*) potenti vettori di malaria, mentre le altre lo sono o in misura molto inferiore e localmente (*melas*, *merus* e specie D) o per nulla affatto, come *quadriannulatus*, specie indistinguibile da *gambiae* s.s. e *arabiensis*, ma del tutto zoofila e quindi dal peso epidemiologico nullo.

I più recenti progressi nello studio del complesso *gambiae* con il metodo citotassonomico hanno interessato principalmente *gambiae* s.s. e *arabiensis*, le due specie d'acqua dolce simpatriche nella maggior parte delle zone dell'areale di distribuzione e di maggiore importanza sanitaria. Dalle identificazioni cromosomiche di queste due specie, effettuate prendendo in esame campioni raccolti in una trentina di località di differenti zone ecologiche della Nigeria durante la stagione delle piogge (Figura 3), è risultato che *arabiensis* predomina nelle zone di savana sudanese e sahariana, mentre *gambiae* s.s., la specie più antropofila, è più frequente nelle zone di savana guineana e di foresta. Ma *arabiensis*, precedentemente rilevato solo nelle zone più aride dell'areale, è stato inoltre identificato recentemente per la prima volta anche in zona di foresta pluviale dell'Africa occidentale generalmente colonizzate solo da *gambiae* s.s. Va tuttavia sottolineato che *arabiensis* colonizza con successo solo i villaggi e le città di foresta circondate da zone disboscate ad uso agricolo dove è stato probabilmente introdotto per trasporto passivo (Figura 4). In queste zone *Anopheles arabiensis* è il principale vettore responsabile delle epidemie di malaria umana delle aree urbane (Coluzzi *et al.*, 1979). La dimostrazione che questo vettore è largamente isolato in zone



Fig. 3 — Mappa della Nigeria con indicate le frequenze di *Anopheles gambiae* s.s. e *An. arabiensis* in 26 località situate in differenti zone ecologiche. I dati si riferiscono principalmente a campioni di femmine adulte catturate in condizioni di riposo all'interno delle abitazioni dopo il pasto di sangue durante la stagione delle piogge. (da Coluzzi et al., 1979).



Fig. 4 — Distribuzione di *Anopheles gambiae* s.s. (in nero) e di *An. arabiensis* (in bianco) all'interno e nei dintorni di Benin City (Nigeria - località n. 3 della figura 3). Le zone punteggiate indicano i limiti approssimativi delle zone urbane e periurbane. (da Coluzzi *et al.*, 1979).

urbane di foresta apre nuove prospettive per il suo controllo mediante mezzi chimici come anche biologici e genetici.

Il polimorfismo bilanciato per inversioni paracentriche appare piuttosto diffuso tra gli Anofelini: sono poche le specie che ne sembrano del tutto prive e anzi si conoscono specie con popolazioni altamente polimorfiche per inversioni (Kitzmilller, 1976). L'inversione paracentrica agirebbe essenzialmente come un meccanismo cromosomico capace di preservare serie geniche coadattate dall'effetto disruptivo del *crossing over* e in ultima analisi come potente mezzo per creare nuova variabilità genetica. Alcuni esempi chiariranno meglio l'interesse teorico e pratico degli studi sui polimorfismi da inversioni negli Anofelini.

L'esame comparativo dei portatori di due ordinamenti cromosomici alternativi dell'inversione 2Rb condotto su popolazioni di laboratorio di *Anopheles stephensi* ha mostrato che questa inversione, direttamente o indirettamente, influenza i tempi di sviluppo larvale, il ritmo di impupamento e sfarfallamento (Coluzzi, 1972), l'attività circadiana di volo (Jones, 1974), la frequenza di accoppiamenti eterospecifici delle femmine (Coluzzi e Di Deco, 1974) nonché caratteri biometrici quali la lunghezza dell'uovo (Coluzzi *et al.*, 1972). Successive ricerche hanno dimostrato un effetto di questa inversione anche sulla propensione al pasto



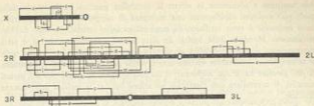


Fig. 5 — Complemento cromosomico politenico e rappresentazione schematica delle inversioni fissate e polimorfiche osservate nelle sei specie del complesso *Anopheles gambiae*. (da Coluzzi *et al.*, 1979).

di sangue dell'alata (Coluzzi *et al.*, 1975a), confermando così l'esistenza di relazioni tra cariotipo e comportamento delle femmine adulte.

Gli studi citogenetici condotti da Coluzzi e collaboratori (Coluzzi *et al.*, 1977 e 1979) su *Anopheles gambiae* s.s. e *An. arabiensis* hanno dimostrato in entrambe le specie gemelle importanti polimorfismi da inversioni paracentriche particolarmente frequenti sul cromosoma 2 (Figura 5). La maggior parte di tali polimorfismi appare tipicamente « flessibile » in quanto le frequenze degli ordinamenti alternativi mostrano ampie variazioni geografiche e stagionali con chiare relazioni con le diverse condizioni climatiche. Inoltre quegli ordinamenti che sono più frequenti nelle zone meridionali, più umide, sono gli stessi che aumentano di frequenza in campioni di femmine attive catturate all'esterno delle abitazioni, mentre gli ordinamenti più frequenti nelle zone settentrionali più aride o pre-desertiche aumentano a loro volta di frequenza in campioni catturati all'interno delle abitazioni. Questi dati suggeriscono che l'endofilia differenziale sarebbe in primo luogo una espressione di differenti adattamenti climatici: ovvero varianti geneticali adattati ad un clima relativamente arido sarebbero più propensi a pungere e a riposare all'interno delle abitazioni poiché questo ambiente mostra generalmente un maggiore deficit di saturazione rispetto all'ambiente esterno; in altre parole le femmine adulte portatrici di certi cariotipi da inversione non si distribuiscono a caso rispetto all'ambiente umano, essendo significativamente più frequenti in campioni catturati all'interno e viceversa. La dimostrazione di relazioni tra variazioni di comportamento e polimorfismi da inversioni in natura è estremamente importante oltre che dal punto di vista teorico anche e soprattutto, dato il materiale, dal punto di vista applicativo. Le implicazioni pratiche appaiono chiare quando si consideri che ci si attende che una endofagia ed endofilia differenziale, quale quella riscontrata in *Anopheles gambiae* s.s. e in *An. arabiensis* nelle savane nigeriane, produca corrispondenti variazioni nell'efficienza vettoriale e nella risposta al trattamento intradomiciliare con insetticidi ad azione residua. Alcuni dati disponibili suggeriscono che il polimorfismo da inversioni

può costituire e costituisce in effetti la variabilità genetica fondamentale dalla quale può evolversi rapidamente una resistenza di comportamento all'insetticida, come realmente è stato verificato da saggi entomologici condotti *in loco* dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. In altre parole, l'assunzione che si è fatta comunemente di una probabilità di contatto con l'insetticida identica per tutte le zanzare della popolazione vettrice non è valida per le popolazioni polimorfiche di *An. gambiae* s.s. e *An. arabiensis*, e ciò può spiegare la mediocrità dei passati tentativi di controllare con insetticidi ad azione residua la malaria nelle Savane Africane.

Per ciò che riguarda le implicazioni evolucionistiche, la distribuzione non casuale di portatori di differenti ordinamenti cromosomici implica un certo grado di divergenza ecotipica tra di essi (come teorizzato da Mayr nel 1945). Così il mantenimento di un polimorfismo da inversioni può essere basato, almeno in parte, su *anidamento* piuttosto che su eterosi (cioè: « i nuovi genotipi possono essere aggiunti ad una popolazione se essi, pur essendo inferiori nella nicchia ancestrale, possono utilizzare nuove componenti dell'ambiente, ovvero occupare una nuova sottonicchia » - Mayr, 1970). Una ulteriore conseguenza della distribuzione non casuale di portatori di ordinamenti cromosomici alternativi potrebbe essere la loro probabilità differenziale di spostarsi su nicchie ecologiche nuove o marginali: questo potrebbe significare una probabilità differenziale di formare isolati dai quali può prendere l'avvio la riorganizzazione genetica, indicando così la possibilità di un coinvolgimento *causale* delle inversioni nel processo di speciazione (Coluzzi, 1982). Questo fenomeno sembra in effetti in atto almeno per *Anopheles gambiae* s.s. in alcune località dell'Africa occidentale. Ad esempio, uno studio sul polimorfismo cromosomico di *An. gambiae* s.s. condotto in Senegambia (Bryan *et al.*, 1982) ha messo in evidenza nell'area di distribuzione scostamenti estremamente significativi dai valori attesi secondo l'equilibrio di Hardy-Weinberg con forti deficit di eterozigoti per ciascuno dei tre sistemi di inversione considerati. Tali dati risultano di difficile interpretazione partendo dall'ipotesi che i campioni siano rappresentativi di una popolazione panmittica. Ciò fa ritenere che il deficit di eterozigoti sia dovuto all'incontro di due popolazioni con frequenze degli stessi ordinamenti cromosomici notevolmente differenti fra di loro. Il quadro che ne deriva è quello di due popolazioni almeno parzialmente isolate, con flusso genico ridotto, che presentano gli stessi polimorfismi ma con frequenze cromosomiche molto diverse. Una situazione ancora più estrema è stata osservata in Mali dove sono state messe in evidenza, mediante studi di genetica di popolazioni, tre entità di *An. gambiae* s.s. caratterizzate cromosomicamente, del tutto simpatriche, con ridotto o assente flusso genico tra di esse, chiaro indice di rango di specie in via di acquisizione o addirittura già acquisito (Touré *et al.*, 1983).

Resta da determinare il possibile e probabile ruolo di questi fenomeni nello status di queste forme dal punto di vista vettoriale ed epidemiologico.

BIBLIOGRAFIA

- BIANCHI-BULLINI A.P., CIANCHI R., SABATINI A., COLUZZI M. and BULLINI L. (1980) - *Ricerche elettroforetiche su specie paleartiche del complesso Anopheles maculipennis (Diptera, Culicidae)*. Atti XII Congr. Naz. Ital. Entomol., Roma, 255-259.
- BEVAN J.H., DI DECO M.A., PETRARCA V. and COLUZZI M. (1982) - *Inversion polymorphism and incipient speciation in Anopheles gambiae s. str. in The Gambia, West Africa*. «Genetica», 59, 167-176.
- BULLINI L. and COLUZZI M. (1978) - *Applied and theoretical significance of electrophoretic studies in mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. «Parassitologia», 20, 1-21.
- COLUZZI M. (1964) - *Morphological divergences in the Anopheles gambiae complex*. «Riv. Malariol.», 43, 197-232.
- COLUZZI M. (1968) - *Cromosomi politemici delle cellule nutritive ovariche del complesso gambiae del genere Anopheles*. «Parassitologia», 10, 179-184.
- COLUZZI M. (1970) - *Sibling species in Anopheles and their importance in malaria*. «Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.», 7, 63-77.
- COLUZZI M. (1972) - *Inversion polymorphism and adult emergence in Anopheles stephensi*. «Science», 176, 39-60.
- COLUZZI M. (1980) - *Recent advances in the cytogenetic study of subtropical malaria vectors*. «Rc. Accad. Naz. XL», 4, 205-210.
- COLUZZI M. (1982) - *Spatial distribution of chromosomal inversions and speciation in Anopheline mosquitoes*. In: «Mechanisms of Speciation», Liu, New York.
- COLUZZI M. and DI DECO M.A. (1974) - *Cage experiments on homospecific and heterospecific matings with females of Anopheles stephensi carriers of different inversion karyotypes*. «Rc. Accad. Naz. Lincei», 57, 683-689.
- COLUZZI M., CANCRINI G. and DI DECO M.A. (1972) - *Polimorfismo cromosomico e lunghezza dell'ovario in Anopheles stephensi*. «Parassitologia», 14, 261-266.
- COLUZZI M., DI DECO M.A. and PETRARCA V. (1975a) - *Propensione al pasto di sangue in condizioni di laboratorio e polimorfismo cromosomico in Anopheles stephensi*. «Parassitologia», 17, 137-143.
- COLUZZI M., SABATINI A. and PETRARCA V. (1975b) - *Chromosomal investigations on species A and B of the Anopheles gambiae complex in the Garki District (Kano State, Nigeria)*. Results of species identifications from 1971 to 1974. WHO Document MPD/TN/75.1.
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. and DI DECO M.A. (1977) - *Behavioral divergences between mosquitoes with different inversion karyotypes in polymorphic populations of the Anopheles gambiae complex*. «Nature», 266, 832-833.
- COLUZZI M., SABATINI A., PETRARCA V. and DI DECO M.A. (1979) - *Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the Anopheles gambiae complex*. «Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.», 73, 483-497.
- CORRADETTI A. (1934) - *Ricerche sugli incroci tra le varietà di Anopheles maculipennis*. «Riv. Malariol.», 13, 707-720.
- DI DECO M.A., SABATINELLI G., CAMIZ S. and TOURÉ Y.T. (1983) - *Studio biometrico di due nuove entità del complesso Anopheles gambiae in Mali*. «Parassitologia», 25, 260-267.
- FELICE G. (1947) - *Cromosomi salivari in Anopheles maculipennis*. «Sci. Genetic.», 3, 67-79.

- GATTI M., BONACCORSI S., PIMFINELLI S. and COLUZZI M. (1982) - *Polymorphism of sex chromosome heterochromatin in the Anopheles gambiae complex*. In: «Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors», Stipes Publ. Co., Illinois, U.S.A.
- HINTON H.E. (1967) - *Observations on the biology and taxonomy of the eggs of Anopheles mosquitoes*. «Bull. Ent. Res.», 57, 495-508.
- JONES M.D.R. (1972) - *Inversion polymorphism and circadian flight activity in the mosquito Anopheles stephensi List. (Diptera, Culicidae)*. «Bull. Ent. Res.», 64, 305-311.
- KITZMILLER J.B. (1976) - *Genetics, cytogenetics and evolution of mosquitoes*. «Advances in Genetics», 18, 315-433.
- MAYR E. (1945) - *Introduction to symposium on age and distribution patterns of gene arrangements in Drosophila pseudoobscura*. «Lloydia», 8, 69.
- MAYR E. (1970) - *L'evoluzione delle specie animali*. Einaudi, Torino.
- TOUÉ Y.T., PETRARCA V. and COLUZZI M. (1983) - *Répartition géographique et polymorphisme chromosomique des membres du complexe Anopheles gambiae au Mali*. 2nd Int. Congr. on Malaria and Babesiosis, Annecy, France, 19-22 Sept. 1983, 072-198.
- WHITE G.B. (1974) - *Anopheles gambiae complex and disease transmission in Africa*. «Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.», 68, 278-301.