

# ETUDE DE 11 ENZYMES ET DONNEES DE GENETIQUE FORMELLE POUR 19 LOCI ENZYMATIQUES CHEZ *TRITOMA INFESTANS* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)

by

J. P. DUJARDIN<sup>1</sup> & M. TIBAYRENC<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,  
Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique

<sup>2</sup> IBBA-ORSTOM, c/o Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivie

---

**Résumé** — Onze enzymes ont été analysées par électrophorèse sur acétate de cellulose chez *Triatoma infestans* (Klug. 1834), vecteur principal de la maladie de Chagas.

Ces onze enzymes correspondent au moins à 19 loci, dont trois seulement sont variables: la phosphoglucomutase (PGM, 2.7.5.1), la 6 phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH, 1.1.1.44) et l'alpha-glycérophosphate déshydrogénase ( $\alpha$ GDH, 1.1.1.8).

Les études de croisement révèlent qu'il s'agit de trois loci dialléliques, et les images d'hétérozygotie plaident pour des protéines dimériques dans le cas de la 6PGDH et de l' $\alpha$ GDH, monomérique dans le cas de la PGM.

Trois loci variables sur 19 représentent une variabilité génétique faible comparée à celle des arthropodes étudiés par des techniques similaires: chez *T. infestans*, le taux de polymorphisme est de 15,7% et l'hétérozygotie moyenne de 0,04. Ces valeurs trois fois plus basses que les valeurs moyennes suggèrent que l'expansion territoriale de ce vecteur en Amérique du Sud a pu se produire à une date à une date récente à partir d'une population de petite taille (effet fondateur).

---

KEYWORDS: Chagas' Disease; *Triatoma infestans*; Isoenzymes; Electrophoresis; Founder Effect.

---

## Introduction

L'utilité de l'électrophorèse des isoenzymes en systématique a été soulignée par plusieurs auteurs (2, 12). C'est une technique qui autorise l'étude indirecte du patrimoine génétique d'un individu, et permet ainsi la caractérisation des populations (4, 11, 18). Une application particulièrement importante en systématique est la détection et l'identification d'espèces jumelles.

L'électrophorèse des isoenzymes appliquée à *T. infestans* a déjà fait l'objet de quelques travaux. Certains ont proposé une interprétation phénétique des zymogrammes (1, 5), d'autres ont donné l'explication génétique des patterns observés (13, 15, 16). Ces derniers auteurs ont décrit 6 loci (4 enzymes) chez *T. infestans*. Nous apportons ici des données sur la commande génétique de 7 enzymes supplémentaires (13 loci).

## Matériel et méthode

Les études ont porté sur une seule espèce de Triatominae, *Triatoma infestans*, vecteur principal de la maladie de Chagas en Bolivie.

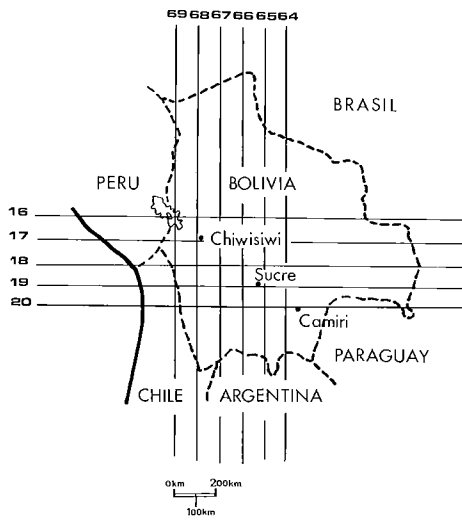


Figure 1.

Provenance (Chiwisivi, Sucre et Camiri) des triatomés étudiés.

Les spécimens utilisés pour la mise au point technique des électrophorèses proviennent de deux régions de Bolivie : 17 spécimens de Sucre et 22 spécimens de Camiri, pour la plupart des adultes. Les différents phénotypes rencontrés sont répertoriés à la Figure 2. Leur désignation dans le texte utilisera l'abréviation de l'enzyme (voir Tableau 1), suivie des chiffres numérotant les allèles dans l'ordre décroissant de la mobilité électrophorétique.

TABLEAU 1  
Liste des enzymes utilisées, avec leur abréviation  
et le numéro attribué par la nomenclature internationale

| Enzyme                                    | Abréviation  | Nomenclature internationale |
|-------------------------------------------|--------------|-----------------------------|
| $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase | $\alpha$ GDH | 1.1.1.8.                    |
| malate déshydrogénase                     | MDH          | 1.1.1.37.                   |
| enzyme malique                            | ME           | 1.1.1.40.                   |
| isocitrate déshydrogénase                 | ICD          | 1.1.1.42.                   |
| 6 phosphogluconate déshydrogénase         | 6PGDH        | 1.1.1.44.                   |
| glucose 6 phosphate déshydrogénase        | G6PDH        | 1.1.1.49.                   |
| phosphoglucomatase                        | PGM          | 2.7.5.1.                    |
| leucine aminopéptidase                    | LAP          | 3.4.11. (1)                 |
| peptidase                                 | PEP          | 3.4.11. (2)                 |
| aconitase                                 | ACON         | 4.2.1.3.                    |
| glucose phosphate isomérase               | GPI          | 5.3.1.9.                    |

(1) Substrat: L-leucyl- $\beta$ -naphtylamide.

(2) Substrat: leucylleucylleucine.

Les expériences de croisement proprement dites ont porté sur des spécimens de *T. infestans* récoltés dans une troisième région de Bolivie, la vallée de Chiwisiwi (Fig. 1). Cette récolte a eu lieu il y a 2 ans. 6 couples avaient été constitués, puis conservés avec leur descendance à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Trois descendances de deuxième génération avaient également été obtenues.

nues, et conservées ensuite dans les mêmes conditions. En moyenne, les trois quarts de ces spécimens ont permis des révélations enzymatiques satisfaisantes.

La préparation d'un échantillon s'effectue comme suit. L'abdomen est séparé et n'est pas utilisé afin d'éliminer l'interférence de l'activité enzymatique du sang ingéré. La tête et le thorax sont écrasés ensemble dans 300  $\mu$ l (adultes) ou 150  $\mu$ l (larves) de liquide hypotonique stabilisateur d'enzyme (dithiotreitol 2mM; acide aminocaproïque 2mM et EDTA 2mM). Dix  $\mu$ l de cette préparation suffisent pour la révélation de onze enzymes. La conservation des échantillons est assurée à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Les électrophorèses ont été conduites en acétate de cellulose. Les techniques de révélation des différentes enzymes sont inspirées de Shaw & Prasad (10) pour la LAP; de Kreuzer *et al.* (6) pour l' $\alpha$ GDH; et de Lanham *et al.* (7) pour les autres enzymes.

TABLEAU 2  
Techniques de migration et choix des tampons

| Enzymes      | Durée de la migration (1) | Tampon de migration (2) | Dilution du tampon d'imbibition (3) |
|--------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| $\alpha$ GDH | 30 min.                   | B                       | 1 : 3,5                             |
| MDH          | 15 min.                   | A                       | 1 : 1                               |
| ME           | 10 min.                   | B                       | 1 : 7                               |
| ICD          | 15 min.                   | A                       | 1 : 0                               |
| 6PGDH        | 30 min.                   | B                       | 1 : 3,5                             |
| G6PDH        | 15 min.                   | A                       | 1 : 0                               |
| PGM          | 30 min.                   | C                       | 1 : 14                              |
| LAP          | 20 min.                   | A                       | 1 : 9                               |
| PEP          | 20. min                   | A                       | 1 : 3                               |
| ACON         | 20 min.                   | A                       | 1 : 0                               |
| GPI          | 10 min.                   | B                       | 1 : 7                               |

(1) Toutes les migrations sont menées à 200 V.

(2) Tampons de migration :

A : tampon HR de Helena.

B : tampon 1 de Shaw & Prasad, 1970.

C : tampon tris maléique de Kreuzer, 1977.

(3) Le tampon d'imbibition du gel d'une enzyme est le tampon de migration de cette enzyme, dilué ou non. Le premier chiffre indique le volume de tampon de migration; le second le volume d'eau ajouté.

Les tampons de migration utilisés sont répris dans le tableau 2, qui détaille la composition des tampons d'imbibition et les conditions techniques de chaque migration.

## Résultats

Le ou les phénotypes de chacune des onze enzymes analysées chez *T. infestans* sont présentés à la figure 2. Sur les onze enzymes, seules trois présentent des phénotypes variables: la PGM, la 6PGDH et l' $\alpha$ GDH.

Les expériences de croisement sont détaillées dans les tableaux 4, 5 et 6. Elles ont permis d'observer la transmission héréditaire des phénotypes de chaque enzyme. Pour l' $\alpha$ GDH toutefois, un seul phénotype (phénotype 1, fig. 2) a été observé dans les expériences de croisement, alors que les

TABLEAU 3  
 Détail de la descendance des différents couples formés

| Couples<br>générateurs | Descendance |          |
|------------------------|-------------|----------|
|                        | Adulte      | Larvaire |
| Ia                     | 34          | 1        |
| IIa                    | 4           | 5        |
| IIIa                   | 5           | 9        |
| IVa                    | 8           | —        |
| Va                     | 12          | —        |
| VIa                    | 1           | 7        |
| VIIIb (1)              | —           | 13       |
| VIIIb )1)              | —           | 25       |
| IXb (2)                | —           | 20       |

a = première génération

b = deuxième génération

(1) Le couple générateur provient de la descendance du couple IVa.

(2) Le couple est formé à partir d'un mâle de la descendance du couple Ia et d'une femelle de la descendance du couple VIa.

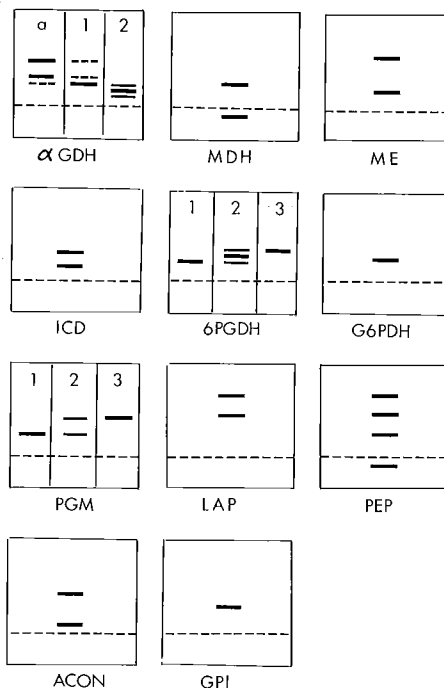


Figure 2.

Phénotypes enzymatiques rencontrés

études de populations naturelles montrent une variabilité de cette enzyme (phénotypes a, 1 et 2 de la fig. 2).

Pour les enzymes suivantes, le phénotype des descendants de première et deuxième génération est identique à celui des parents: MDH, ME, GPI, G6PDH, ICD, ACON, PEP et  $\alpha$ GDH (voir tableau 4). Pour ces enzymes, nous pouvons donc compter un locus par isoenzyme.

TABLEAU 4  
**Détail des croisements pour 9 enzymes**  
**(pour chaque enzyme, il n'y a qu'un seul phénotype)**

| Enzyme       | Première génération |                  | Deuxième génération |                  |
|--------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
|              | Couples             | Nombre desc. (1) | Couples             | Nombre desc. (1) |
| $\alpha$ GDH | de Ia à VIa         | 73               | de VIIb à IXb       | 27               |
| MDH          | id.                 | 52               | id.                 | 27               |
| ME           | id.                 | 56               | id.                 | 14               |
| ICD          | id.                 | 56               | 1d.                 | 26               |
| G6PDH        | id.                 | 56               | id.                 | 20               |
| LAP          | id.                 | 55               | id.                 | 26               |
| PEP          | id.                 | 49               | id.                 | 24               |
| ACON         | Va                  | 7                | —                   | —                |
| GPI          | de Ia à VIa         | 58               | de VIIb à IXb       | 23               |

(1) Nombre des descendants dont le phénotype a pu être étudié.

On peut ainsi attribuer un locus apparemment monomorphe à la GPI et la G6PDH.

Deux loci, apparemment monomorphes, peuvent être attribués aux enzymes suivantes: MDH, ME, ICD, LAP et ACON.

Enfin quatre loci, apparemment monomorphes, peuvent être attribués à la PEPA.

Le tableau 5 présente la transmission héréditaire des 3 phénotypes de la 6PGDH. Les résultats des croisements sont compatibles avec l'existence d'un locus diallélique. L'image du phénotype hétérozygote, à savoir trois bandes dont la médiane est plus intense que les deux extrêmes (6PGDH 1/2), suggère pour cette enzyme une structure dimérique.

TABLEAU 5  
**Transmission héréditaire des différents phénotypes de la 6PGDH**

| Couples         | Génotypes proposés |           | Génotypes des descendants |           |           | Total (1) | X2c (2) | ddl | P    |
|-----------------|--------------------|-----------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|---------|-----|------|
|                 | Mâles              | Femelles  | 6PGDH 1/1                 | 6PGDH 1/2 | 6PGDH 2/2 |           |         |     |      |
| Va              | 6PGDH 2/2          | 6PGDH 1/1 | —                         | 10        | —         | 10        |         |     |      |
| IIa             | 6PGDH 2/2          | 6PGDH 2/2 | —                         | —         | 10        | 10        |         |     |      |
| Ia, VIa et VIIb | 6PGDH 2/2          | 6PGDH 1/2 | —                         | 18        | 27        | 45        | 0,550   | 1   | 0,30 |
| IVa et VIIIb    | 6PGDH 1/2          | 6PGDH 2/2 | —                         | 10        | 10        | 20        |         |     |      |
| IIa             | 6PGDH 1/2          | 6PGDH 1/1 | 1                         | 7         | —         | 8         | 1,164   | 1   | 0,20 |

1/1: Homozygote pour l'allèle rapide 1.

2/2: Homozygote pour l'allèle lent 2.

1/2: Hétérozygote pour les deux allèles.

(1) Nombre total de descendants dont le phénotype a pu être étudié.

(2) Le test statistique X2c est un tableau à double entrée, comparant les effectifs observés des descendants aux effectifs théorique attendus par les lois de Mendel. Le X2 est corrigé selon Yates.

Le tableau 6 présente la transmission héréditaire des 3 phénotypes de la PGM. Il confirme les observations déjà faites par Tibayrenc *et al.* (15) attribuant à la PGM un locus diallélique, et suggérant pour cette enzyme une structure monomérique.

TABLEAU 6  
Transmission héréditaire des différents phénotypes de la PGM

| Couples      | Génotypes proposés |          | Génotypes des descendants |         |         | Total (1) | X <sup>2</sup> c (2) | ddl | P    |
|--------------|--------------------|----------|---------------------------|---------|---------|-----------|----------------------|-----|------|
|              | Mâles              | Femelles | PGM 1/1                   | PGM 1/2 | PGM 2/2 |           |                      |     |      |
| Ia           | PGM 2/2            | PGM 1/1  | —                         | 30      | —       | 30        |                      |     |      |
| Ila et IIIa  | PGM 2/2            | PGM 2/2  | —                         | —       | 20      | 20        |                      |     |      |
| IVa et VIIIb | PGM 2/2            | PGM 1/2  | —                         | 7       | 5       | 12        | 0,000                | 1   | 0,90 |
| Vla          | PGM 1/1            | PGM 1/2  | 2                         | 5       | —       | 7         | 0,075                | 1   | 0,50 |
| Va           | PGM 1/2            | PGM 2/2  | —                         | 6       | 4       | 10        | 0,000                |     | 0,90 |

1/1 : Homozygote pour l'allèle rapide 1.

2/2 : Homozygote pour l'allèle lent 2.

1/2 : hétérozygote pour les deux allèles.

(1) Cf. Tableau 5.

(2) Cf. Tableau 5.

Les couples étudiés présentent tous le même phénotype de l' $\alpha$ GDH (phénotype 1, voir figure 2), en sorte que la transmission héréditaire des autres phénotypes n'a pas pu être étudiée. Une interprétation est cependant proposée dans le discussion.

## Discussion

### 1) *Enzymes codées par un locus apparemment monomorphe :*

**G6PDH :** Cette enzyme montre dans nos conditions expérimentales une seule bande, nette, toujours au même niveau. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez différents moustiques, dont la G6PDH est sous la dépendance d'une seul locus (11).

**GPI :** Cette enzyme montre une bande nette surmontée immédiatement d'une bande plus faible, inconstante (cette deuxième bande n'est pas prise en compte ici).

### 2) *Enzymes codées par un locus polymorphe :*

**PGM :** Les expériences de croisements faites par Tibayrenc *et al.* (15) portaient sur un couple géniteur présentant des phénotypes différents (mâle PGM 1/1 et femelle PGM 2/2) et deux couples aux phénotypes identiques (PGM 1/1). Notre travail a pu vérifier d'autres variantes de croisement (voir tableau 6) et parvenir aux mêmes conclusions.

**6PGDH :** Cette enzyme est ici sous la commande d'un locus diallélique, et présente donc une variabilité. Elle a cependant été classée par Johnson (1974) parmi les enzymes à évolution lente (*in* 4).

**$\alpha$ GDH :** Les variations phénotypiques que présente cette enzyme semblent assez peu fréquentes et n'ont pas été rencontrées chez les couples géniteurs. Une hypothèse de travail concernant la commande génétique de cette enzyme peut cependant être proposée, d'après les résultats de l'étude des populations naturelles. Le phénotype le plus fréquent de l' $\alpha$ GDH montre trois bandes d'inégale intensité, et d'intensité variable (phénotype 1 de la figure 2). Nous ne

tiendrons compte dans ce travail que de la bande lente de l' $\alpha$ GDH. Chez certains spécimens de Sucre (2600 m), une image d'hétérozygotie est visible à ce niveau. C'est une image typique d'une protéine dimérique, à savoir 3 bandes dont la médiane est plus intense (phénotype 2 de la figure 2). Il est donc probable que l' $\alpha$ GDH soit sous la commande d'au moins un locus polymorphe, dans ce cas diallélique.

### 3) Enzymes codées par 2 loci, apparemment monomorphes :

- MDH : montre généralement deux loci chez les eukaryotes. Reynolds et Kitto (1970) ont montré pour la MDH l'existence d'une forme mitochondriale et d'une forme cytoplasmique chez *Drosophila virilis* (in 18).
- ME : montre généralement deux loci chez les eukaryotes. L'isoenzyme le plus lent est parfois moins intense dans nos conditions expérimentales.
- ACON : présente toujours deux bandes bien nettes dans nos conditions expérimentales.
- ICD : présente deux bandes bien nettes dans nos conditions expérimentales, d'égale intensité. Cette image diffère donc de celle obtenue par Tibayrenc *et al.* (15, 16) qui observait, avec d'autres conditions techniques, une deuxième bande inconstante et concluait à un locus monomorphe observable pour l'ICD. Steiner et Joslyn (11) citent deux locus pour cette enzyme chez les moustiques.
- LAP : présente dans nos conditions expérimentales deux bandes rapides et d'égale intensité. Selon les espèces étudiées par Steinert et Joslyn (11), cette enzyme est sous la dépendance de deux ou quatre loci.

### 4) Enzyme codée par quatre loci, apparemment monomorphes :

- PEPA : Il est remarquable de constater l'apparent monomorphisme des PEP, classées par Johnson (1974) parmi les enzymes les plus variables (in 4). Il faut noter que le substrat propre à la PEPA, la leucylleucylucine, peut révéler parfois la PEP B, dont le substrat spécifique est la leucyl-L-alanine (14). Steiner et Joslyn (11) citent deux loci pour la PEP B des moustiques. Des expériences sont en cours pour cerner la spécificité de chaque PEP chez *T. infestans*.

### 5) Variabilité génétique chez *T. infestans* :

Nos résultats ont permis de définir 19 loci enzymatiques chez *T. infestans*. Ils ajoutent à la PGM, dont le polymorphisme était connu (15), l'existence de deux loci polymorphes, celui de la 6PGDH et celui de l' $\alpha$ GDH.

D'un point de vue pratique, l'existence d'au moins 3 loci polymorphes va permettre des études génétiques précises des différentes populations géographiques de *T. infestans*, et la corrélation des fréquences alléliques

avec divers paramètres, tels par exemple la transmission des différentes souches isoenzymatiques de *T. cruzi*. D'autre part, on peut considérer que 19 loci sont un échantillon assez représentatif du génome pour autoriser le calcul des distances génétiques entre populations géographiques de *T. infestans*. Avise et Aquadro (3) dans leur revue des distances génétiques chez les Vertébrés, ne considèrent que les travaux impliquant au moins 14 loci.

Avec 3 loci polymorphes sur les 19 répertoriés, nous observons un taux de polymorphisme de 15,7%, et une hétérozygotie moyenne de 0,04. Bien qu'il soit préférable de comparer des techniques et des échantillonnages semblables de loci, il est intéressant de confronter ces valeurs à celles obtenues à partir d'une quarantaine d'arthropodes et communiquées par Pasteur (9): taux de polymorphisme  $0,50 \pm 0,22$  et hétérozygotie moyenne  $0,16 \pm 0,07$ . Ces valeurs moyennes sont donc nettement plus élevées.

Cette faible variabilité génétique apparente surprend chez un insecte dont l'habitat en Bolivie présente de profondes différences (altitude, température et humidité). Elle pourrait suggérer que l'expansion territoriale de *T. infestans* a pu se produire à une date récente à partir d'une population de petite taille (effet fondateur).

Ceci serait en accord avec l'hypothèse d'une perte récente de la sexualité de *T. cruzi* due à une explosion démographique du vecteur (14).

Toutefois, ces premières hypothèses doivent être confirmées par une étude plus large impliquant la comparaison de nombreuses populations, et une recherche de la variabilité génétique à l'aide d'autres techniques, électrophorétiques et autres.

## Conclusion

La technique d'électrophorèse des protéines en acétate de cellulose permet de révéler de façon satisfaisante les isoenzymes pour onze enzymes (soient 19 locus) chez *T. infestans*, vecteur principal de la maladie de Chagas.

Avec 19 locus structuraux, l'étude génétique des populations géographiques de *T. infestans* en Amérique du Sud est actuellement possible.

Les premiers objectifs seront la recherche d'espèces jumelles, l'étude d'une éventuelle corrélation des profils génétiques du vecteur et de son parasite, et celle des distributions, spatiale et temporelle, de la variabilité génétique de *T. infestans*.

Remerciements — Cette recherche a été réalisée à l'aide d'une subvention du Ministère français de l'Industrie et de la Recherche (n° PVD/81/L-1423).

### **Study of 11 enzymes and genetical data for 19 enzymatical loci in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).**

**Summary** — Eleven enzymes were analysed in *Triatoma infestans* (Klug 1834), the main vector of Chagas' disease in Bolivia (and the largest part of South America). The method used was isoenzyme electrophoresis on cellulose acetate.

Crossing experiments showed that these eleven enzymes at least involve 19 structural loci, three of which being polymorphic: the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH 1.1.1.44), the phosphoglucomutase (PGM 2.7.5.1) and the  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ GDH 1.1.1.8). The patterns of the heterozygotes suggest dimeric structure for the 6PGDH and  $\alpha$ GDH, and monomeric structure for the PGM.



Three variable loci on 19 is a low genetic variability when compared with that of the arthropods studied with similar techniques. In *T. infestans*, the polymorphism is 15.7% and the mean heterozygosity is 0.04. These values three times lower than the mean values suggest a founder effect: the territorial expansion for this vector in Bolivia may be recent, starting from a small population.

**Studie van 11 enzymen en gegevens van formele genetica voor 11 enzymatische loci van *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).**

*Samenvatting* — Bij *Triatoma infestans* (Klug, 1834), de voornaamste vector van de ziekte van Chagas in Bolivia, werden 11 enzymen geanalyseerd b.m.v. elektroforese op cellulose acetaat.

Deze 11 enzymen corresponderen met ten minste 19 loci, waarvan slechts drie variabel zijn: de fosfoglucomutase (PGM, 2.7.5.1), de 6 fosfogluconaat deshydrogenase (6PGDH, 1.1.1.44) en de alfa-glycerofosfaat deshydrogenase ( $\alpha$ GDH, 1.1.1.8).

Experimenten van kruising tonen aan dat het drie diallelische loci betreft en dat de heterozygote patronen passen voor een dimerische structuur bij de 6PGDH en de  $\alpha$ GDH, en een monomeriche bij de PGM.

Drie variabele loci op 19 is een lage genetische variabiliteit vergeleken met deze bij artropoden die op een gelijkaardige manier werden bestudeerd. Bij *T. infestans* bedraagt het polymorfisme 15.7% en de gemiddelde heterozygotie is 0.04. Deze waarden zijn drie maal minder dan de gemiddelde waarden en wijzen op een «grondslag» effect: de territoriale expansie van deze vector in Bolivia zou van recente oorsprong zijn, vertrekkend van een populatie van geringe omvang.

Reçu pour publication le 20 août 1984.

#### REFERENCES

1. Almeida JR de: Estudo explorativo de proteínas da hemolinfa de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) vetores da doença de Chagas. I. *Triatoma spp.* Rev. bras. Malar., 1982, **34**, 101-107.
2. Avise JC: Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 1975, **23**, 465-481.
3. Avise JC, Aquadro CF: A comparative summary of genetic distance in the vertebrates. Patterns and correlations. Evol. Biol., 1982, **25** 151-185.
4. Bullini L, Sbordoni V: Electrophoretic studies of gene-enzyme systems: micro-evolutionary processes and phylogenetic inference. Boll. Zool., 1980, **47** (suppl.), 95-112.
5. Dorea RCC, Povoá MM, Miles MA, De Souza AAA, Barata JM: Electroforese de enzimas para estudos de triatomíneos com referência especial a subpopulações de *Panstrongylus megistus*. Rev. bras. Biol., 1982, **42**, 521-526.
6. Kreuzer RD, Posey FT, Brown PA: A fast and sensitive procedure for identifying genetic variants of phosphoglucomutase in certain genera of mosquitoes. Mosq. News, 1977, **37**, 407-409.
7. Lanham SM, Grendon JM, Miles Ma, Povoá M, de Souza AA: A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of Trypanosomatids. I. Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 1981, **75**, 742-750.
8. Nei M: Interspecific differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. Amer Naturalist, 1971, **105**, 385-398.
9. Pasteur G: Génétique biochimique et populations. Ou: Pourquoi sommes-nous polymorphes? Mem. Soc. Zool. France, 1974, **37**, 473-531.
10. Shaw CR, Prasad R: Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Genet., 1970, **4**, 297-320.
11. Steiner WWM, Joslyn DJ: Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. Mosq. News, 1979, **39**, 35-54.
12. Tibayrenc M: Les isoenzymes et l'entomologie médicale. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., 1979, **17**, 249-256.
13. Tibayrenc M: Note préliminaire sur les isoenzymes de *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae), vecteur majeur de la maladie de Chagas en Amérique latine. Cah. ORSTOM sér. Ent. méd. Parasitol., 1980, **18**, 71-73.
14. Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M, Dede JP, Poch O, Desjeux P: New electrophoretic evidence of genetic variation in *Tripanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. Genetica, (soumis pour publication).

15. Tibayrenc M, Echalar L, Carlier Y : Données de génétique formelle pour six loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., 1981, **19**, 121-123.
16. Tibayrenc M, Echalar L, Carlier Y : Comparaison isoenzymatique de deux populations boliviennes (altitude et plaine) de *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., 1981, **19**, 125-127.
17. Voorinen J: Little genetic variation in the Finnish Lake salmon, *Salmosalar sebago* (Girard). Hereditas, 1982, **97**, 182-192.
18. Wagner RP, Selander RK : Isozymes in insects and their significance. Ann. Rev. Ent., 1974, **19**, 117-138.