

CICLO BIOLÓGICO DE *Simulium (Chirostilbia) pertinax* KOLLAR,
1832 (DIPTERA: SIMULIIDAE).

Renato A. Pegoraro¹

ABSTRACT

Biological cycle of *Simulium (Chirostilbia) pertinax*
Kollar, 1832 (Diptera: Simuliidae).

The study of life cycle of *Simulium (Chirostilbia) pertinax* is important to the insect control strategy. This experiment was carried out at EMPASC - Estação Experimental de Itajaí-SC, Brazil, from 1986 to 1989.

Several insect phases were evaluated: period of ingurgitation, oviposition, incubation, larval, pupa and adult.

Larval period was determined under semi-natural conditions, whereas the other phases were observed in laboratory (BOD $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and $25 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. $85 \pm 5\%$, 14 hours photophase and longevity without photophase). The minimum length of time between pre-oviposition and emergency was 35 days at 20°C and 30 days at 25°C . The minimum larval period was 21 days at $22,4^\circ\text{C}$, mean temperature. Maximum longevity was attained at 39 and 18 days, respectively for 20°C and 25°C . The number of eggs per female insect averaged 236,9. KEYWORDS. Simuliidae; *Simulium (C.) pertinax*; biological cycle.

RESUMO

O estudo do ciclo biológico de *S. (C.) pertinax* é importante para adoção de estratégias de controle. O trabalho foi desenvolvido na EMPASC - Estação Experimental de Itajaí-SC, no período compreendido entre 1986 e 1989. Foram avaliados período de ingurgitação, pré-oviposição, incubação, larva, pupa e adulto. O período larval foi determinado em criadouro semi-na-

Recebido em 12/12/91

¹ EMPASC S/A Estação Experimental de Itajaí Caixa Postal 277, 88300-000 Itajaí SC

tural no campo e as demais fases em laboratório (BOD 20°C e 25°C, U.R. 80±5%, com 14 horas fotofase e longevidade em fotofase). O período mínimo compreendido entre pré-oviposição e emergência foi de 35 dias a 20°C e 30 dias a 25°C. Período larval de 21 dias a 22,4°C em média. Longevidade máxima obtida foi de 39 e 18 dias, para 20°C e 25°C, respectivamente. Foram encontrados 236,9 ovos em média, por fêmea. PALAVRAS-CHAVE. Simuliidae; *Simulium (C.) pertinax*; Ciclo biológico.

INTRODUÇÃO

Os aspectos básicos da biologia de simulídeos são conhecidos para menos de 10% das espécies descritas, sendo poucas estudadas detalhadamente (MOKRY *et al.*, 1981).

As poucas informações sobre a biologia das espécies de simulídeos antropófilos estão restritas as citações bionômicas nas descrições das espécies (GORAYEB, 1981).

A maior dificuldade na criação encontra-se na manutenção dos estágios imaturos em condições de laboratório, pelas limitações da metodologia e principalmente diferentes exigências de cada espécie.

A caracterização de espécies de simulídeos autógenas (que não necessitam de sangue para a oviposição) e anautógenas têm sido estudadas por DAVIES (1961), onde considera as espécies anautógenas potencialmente mais importantes como vetores de parasitoses que as espécies autógenas. Para as espécies autógenas o alimento acumulado durante a fase larval é mais intenso, utilizando-se dele para a reprodução na fase adulta (ANDERSON & SHEMANCHUK, 1987).

Adultos de simulídeos alimentam-se normalmente de nectar de flores, que aparentemente satisfazem o inseto de energia requerida para a sua sobrevivência, e fêmeas de muitas espécies alimentam-se do sangue de aves e animais. O sangue ingurgitado é digerido e convertido em reserva que é usado na maturação dos oócitos e pequena quantidade de proteína e açúcares presentes são convertidos em triglicerídeos e glicogênio, que por sua vez são transformados em energia para o vôo (DAVIES & PETERSON, 1956 e NAYAR & SAVERMAN, 1975). Para as espécies que preferem sangue humano são denominados de antropófilos.

O período de pré-oviposição de simulídeos foi subdividido por BEKLEMISHEV (1940) em três fases a saber: a) A busca a hospedeiro e conseqüente alimentação. b) A digestão do sangue e o desenvolvimento dos óvulos. c) Localização da corrente apropriada para a oviposição.

A formação de óvulos (oogênese), formas de induzir a oviposição em laboratório, fecundidade e período de oviposição, têm sido estudados por JOBBINS-POMEROY (1916); DALMAT (1950); DAVIES & PETERSON (1956); LAWIS (1957); WENK & RAYBOULD (1972); TAKAOKA (1973); COLINI & DAVIES (1975); RAMIREZ-PEREZ (1977); MOKRY (1980); LACEY & MULLA (1980); SIMMONS & EDMAN (1981); COLBO (1982); TARRANT (1983) e DATTA (1983).

Em simulídeos inúmeras formas de dormência foram verificadas nos estágios de larva, pupa e de ovo. Os ovos apresentam melhores possibilidades de vencer condições ambientais adversas (TIMM, 1987).

As larvas alimentam-se de algas, bactérias, fitoplâncton e restos orgânicos (LUTZ, 1931; COSCARON & WYGODZINSKY, 1973). O número de instares larvais pode variar de seis a nove, dependendo da espécie (HALL & HARROD, 1963; CRAIG, 1975; FREDEN, 1976).

O desenvolvimento de técnicas de criações artificiais em laboratório, entretanto tem provado ser muito difícil. As larvas para seu desenvolvimento requerem condições especiais de água corrente, turbulência, condições químicas corretas, temperatura, alimentação, entre outras, para cada espécie que se deseja criar (RAYBOULD & GRUNEWALD, 1975). Os substratos principais para a fixação de larvas e pupas de simulídeos geralmente utilizadas para amostragens, apresentam características atrativas iguais às naturais (LEWIS & BENNETT, 1974).

A fase de pupa é caracterizada como a fase de respiração intensa e o pupário é formado por fios de seda tecido pela própria larva sobre substrato qualquer. Adultos por sua vez emergem numa bolha de ar que flutua até a superfície da água, voando para um substrato mais próximo para descanso e adquirir maior rigidez da quitina.

O desconhecimento sobre os aspectos biológicos de *S. (C.) pertinax*, principal espécie antropófila encontrado na região sul do Brasil, objetivou a realização deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização a autogenia de *S. (C.) pertinax*, 40 fêmeas foram coletadas a campo, sendo que 20 fêmeas foram coletadas antes de efetuarem a ingurgitação e 20 já ingurgitadas, foram mantidas individualizadas em frascos de vidro (5cm altura por 4cm diâmetro) contendo uma fita de papel suspensa e tampa telada, através da qual era servido diariamente uma dieta com solução de açúcar 10%, esta dieta tem sido testada como a melhor no estudo sobre longevidade de *S. (C.) pertinax* por PEGORARO (1986). Permaneceram durante o estudo em câmara climatizada (BOD) com temperaturas de 25°C, U.R. 80±5% e 14 horas fotofase, onde diariamente uma ou duas fêmeas eram dissecadas sob microscópio estereoscópico em solução fisiológica comparado o desenvolvimento dos ovários segundo as descrições de DAVIES *et al.* (1977) e CHALWOOD *et al.* (1980).

O período de pré-oviposição em dias foi determinado, anotando-se data da coleta e data da realização da postura. Para este teste foram utilizadas 100 fêmeas ingurgitadas, mantidas em frasco de criação e em câmaras climatizadas nas temperaturas de 20°C e 25°C, U.R. 80±5% e 14 horas fotofase, com 50 fêmeas cada câmara. Na ocasião da coleta uma pessoa manteve-se em pé, vestida somente com calção, e o tempo de ingurgitação de 20 fêmeas foram cronometradas, observando-se quais as re-

giões do corpo teve maior preferência pelo inseto.

Para determinar o período de incubação as posturas foram mantidas em placas de petri com algodão embebido em água destilada e forrado com papel filtro. As placas eram mantidas em BOD com temperaturas de 20°C e 25°C, U.R. 80±5% e 14 horas fotofase até a eclosão. Com auxílio de um microscópio estereoscópico com ocular micrométrica foram medidos 20 ovos no seu maior comprimento e largura.

Com o propósito de estimar a fecundidade 100 fêmeas foram dissecadas, independentemente da idade fisiológica, nulíparas ou oníparas, após terem sidas coletadas no campo ingurgitadas e mantidas individualizadas em frascos de criação em BOD a 20°C, U.R. 80±5% e 14 horas fotofase.

Larvas recém eclodidas em laboratório foram colocadas em criadouro semi-natural, descrito por PEGORARO (1989). O acompanhamento foi realizado diariamente até formação das primeiras pupas, anotando-se o período mínimo de desenvolvimento larval. Nesta fase foi realizado a análise da água, pH, O₂ e DBO₅, condutividade e temperatura determinada por termógrafo.

Para avaliar a duração do estágio de pupa, foram coletadas as larvas de últimos instares de *S. (C.) pertinax*, em criadouros naturais próximos e transportadas até o criadouro semi-natural. As larvas foram transportadas em baldes plásticos com água, mantida fria por algumas pedras de gelo e oxigenada com o auxílio de um aerador movido a pilha. Com este processo as larvas e pupas mantiveram-se vivas por até seis horas. Diariamente pupas formadas recebiam numeração em alfinete fixados no substrato próximo as mesmas. Para o teste foram utilizadas 30 pupas. A numeração correspondente eram anotadas em planilhas com o dia da formação e o da emergência. Após emergência o pupário era removido e analisado posteriormente para confirmação da espécie. Parte das pupas recém formadas foram removidas do criadouro semi-natural com parte do substrato de fixação (folhas plásticas usado em embalagens) e mantidas no laboratório em frascos de criação semelhantes ao descrito por VULCANO (1962), até a emergência.

A longevidade de *S. (C.) pertinax* em condições de laboratório foi determinada para as temperaturas de 20 e 25°C, U.R. 80±5% e sem fotofase, para evitar agitação excessiva que a luz provoca normalmente nos insetos (RAMIREZ-PEREZ, 1977). Foram utilizados 35 indivíduos para cada tratamento, alimentados diariamente com solução de açúcar 10% embebida em algodão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram efetuadas diariamente para caracterização da autogenia através de dissecação de fêmeas, acompanhando o desenvolvimento ovariano de *S. (C.) pertinax*. As fêmeas não ingurgitadas foram alimentadas com solução de açúcar 10%, os ovários não passaram de estágio II até o décimo dia. Para fêmeas ingurgitadas, da mesma forma alimentadas com solução açucarada, o desenvolvimento dos ovários chegaram ao estágio V

(ovos formados), com duração mínima de quatro dias a 25°C. Logo conclui-se que *S. (C.) pertinax* trata-se de uma espécie anautógena. Resultados semelhantes foram obtidos por DAVIES & PETERSON (1956), DAVIES *et al.* (1977), CUPP & COLLINS (1979), WOTTON (1982) e ANDERSON E SHEMANCHUK (1987), para diferentes espécies de simulídeos.

O período de pré-oviposição determinado para 100 fêmeas ingurgitadas de *S. (C.) pertinax*, destas 69 ovipositaram em condições de laboratório, obtendo-se duração média de 6,2 e 4,9 dias, para 20°C e 25°C, respectivamente (Quadro 1).

Foi desconsiderado o tempo gasto de emergência à localização do hospedeiro. O período de pré-oviposição foi em média dois dias superior que o tempo levado para o desenvolvimento ovariano (estágio V), descrito anteriormente, possivelmente pela necessidade de estímulo e condições ideais para a oviposição.

A oviposição de simulídeos geralmente são realizadas em dias notadamente quentes, úmidos, baixa luminosidade e mudança de pressão atmosférica (DAVIES, 1978).

O tempo médio gasto por *S. (C.) pertinax* realizar a ingurgitação foi de 2'52", os locais mais preferidos pelo inseto foram na seqüência: o tornozelo, cotovelo e mãos.

Para todas as 100 fêmeas de *S. (C.) pertinax* que ovipositaram ou não, nas condições de laboratório, foram dissecadas em solução fisiológica, e o número de ovos encontrados são apresentados na Figura 1, onde foram encontrados em média 236,9 ovos por fêmea, e um intervalo de variação de 20 a 517 ovos/fêmea. Esta média se assemelha ao número médio de ovos encontrados por MOREIRA *et al.* (1988) com *S. (I.) noqueirai* com média 234,7 ovos e intervalo de 45 a 566 ovos/postura. A acentuada variação encontrada em *S. (C.) pertinax* deu-se ao fato de se desconhecer o volume de sangue ingurgitado e a idade fisiológica de cada fêmea, nulíparas ou oníparas. Segundo DAVIES & PETERSON (1956) fêmeas de simulídeos podem apresentar nas condições normais, até três ciclos gonodotróficos, com desenvolvimento folicular em torno de quatro dias. A oviposição de *S. (C.) pertinax* tem sido realizada em laboratório com ovos dispostos em pequenos grupos, sobrepondo-se uns aos outros e desprovidos de matriz (substância gelatinosa que frequentemente envolve as posturas de simulídeos). DELLOME FILHO (1985) obteve postura em laboratório de *S. (C.) pertinax* em montículos dispersos e envoltos em massa gelatinosa.

Os ovos férteis apresentam coloração amarelo-clara tornando-se par do próximo da eclosão, quando são visíveis nas larvas olhos e "egg buster" (estrutura que rompe o cório do ovo). Apresentam tamanho médio de 0,228 mm e 0,135 mm no sentido longitudinal e lateral, respectivamente.

O período de incubação foi em média 6,5 e 4,0 dias, com temperaturas de 20°C e 25°C, respectivamente (QUADRO 1). A fertilidade para estas posturas foram baixas não excedendo a 30% dos ovos. O resultado foi semelhante ao encontrado por WENK & RAYBOULD (1972) com *S. damnosun* espécie antropófila transmissor de *Onchocerca volvulus* na Africa.

O período mínimo para desenvolvimento larval de *S. (C.) pertinax* foi determinado em criadouro semi-natural com duração mínima de 21 dias e temperatura média da água de 22,4°C (18,4 a 29,8°C), (Quadro 1). Uma única análise da água do criadouro semi-natural durante experimento apresentou pH=7,4; O₂=8.400 mg/l/O₂; DBO₅=0,600 (7800 mg/l/O₂), condutividade 94 mS₂₀ cm⁻¹, sólidos totais 3,8 mg/l. A velocidade da água, regulada pela inclinação das calhas, variou de 0.9 a 1.2 m/s. Nos três primeiros dias de eclosão, a vazão da água foi reduzida para aproximadamente 0,1 l/s, aumentando-a gradativamente até alcançar um máximo de 0,5 l/s na terceira semana.

GUIMARÃES & MEDEIROS (1986) obtiveram período larval médio de *S. pertinax* em laboratório de 13,8 dias com temperatura de 21°C e água com alto teor de poluição orgânica (DBO₅ 10 mg/l) e pH médio 6,62; e em água não poluída e pH médio de 8,19 a duração média larval de 19,27 dias. DELLOME FILHO (1985) obteve em aquário com H₂O entre 13-17°C a duração do período larval *S. pertinax* de 22 dias.

Nos anos de 1986 a 1987 a temperatura da água no criadouro semi-natural durante os meses mais frios de maio a outubro, apresentou médias mensais que variou de 15 a 18°C e os meses mais quentes de novembro a abril, entre 20 e 24°C. Médias acima de 22°C foram observadas somente nos meses de dezembro a março. Considerando a oscilação da temperatura e a baixa taxa de poluição orgânica encontrada no criadouro semi-natural e ao sistema de criação diferente, a duração do período larval mínimo de 21 dias, está próximo ao encontrado por DELLOME FILHO (1985) e GUIMARÃES & MEDEIROS (1986). O pequeno número de larvas desta espécie obtidos no sistema de criação, associado a falta de equipamento óptico preciso, impossibilitou a determinação correta dos diferentes estágios larvais através da medida da cápsula cefálica. Segundo GUIMARÃES & MEDEIROS (1986) as larvas de *S. pertinax* apresentam sete estádios constatados através da medição no comprimento das larvas.

A determinação do período larval é imprescindível para delimitar o intervalo entre uma aplicação e outra de qualquer medida de controle.

Nas condições de laboratório o período de pupa foi de quatro e três dias para temperaturas de 20°C e 25°C, respectivamente, com mortalidade de 6,6% para as duas temperaturas. A mortalidade neste caso provavelmente deveu-se a remoção de pupas recém-formadas e parasitos naturalmente encontrado nos insetos. Foi observado que a mortalidade tende a diminuir quando a remoção das pupas de seus criadouros, para estudos, forem efetuadas próximo da emergência. Para ELSEN (1979) e DATTA (1983) o intervalo de dois a cinco dias é observado para simuliídeos, podendo aumentar este período sob influência de uma nutrição deficiente no estágio larval ou de temperaturas mais baixas. Segundo DISNEY (1968) a emergência de diversas espécies de simuliídeos parece ser regulada pela temperatura e a luz do dia, e que na hora o adulto emerge. Em *S. (C.) pertinax* observou-se que a emergência ocorre durante o dia e preferencialmente no período matutino.

A exemplo das demais fases de desenvolvimento de *S. (C.) pertinax* observou-se a longevidade também sofre a influência da temperatura. A longevidade média obtida foi de 12,4 e 6,4 dias e máxima de 39 e 18 dias para, temperaturas de 20°C e 25°C respectivamente, (Quadro 1). A longevidade das fêmeas são maiores que nos machos para as duas temperaturas testadas.

A duração mínima do ciclo biológico de *S. (C.) pertinax* para as temperaturas de 20°C e 25°C, foram de 36 e 31 dias e longevidade máxima de 39 e 18 dias, respectivamente.

CONCLUSÕES

- 1 - A exemplo de outras espécies de insetos, a temperatura é fator importante na regulação do aumento ou diminuição do ciclo biológico de *S. (C.) pertinax*.
- 2 - Para medidas de controle de larvas de *S. (C.) pertinax* em águas que apresentaram temperatura média de 22°C, o intervalo de segurança entre uma aplicação e outra, deverá ser de no máximo 20 dias. Para temperaturas superiores e inferiores a 22°C, outros intervalos terão que ser determinados.
- 3 - *S. (C.) pertinax* apresenta características de espécie anautógena portanto pode ser considerada potencialmente importante como vetor de doenças, a exemplo de outras espécies anautógenas que são responsabilizadas pela transmissão de microfilárias como *Onchocerca volvulus* responsável pela cegueira de milhares de pessoas na África, América Central e região norte da América do Sul.

QUADRO 1 - Média aritmética (dias) e erro padrão ($\bar{X} \pm E.P.$) dos períodos de pré-oviposição, incubação, pupa e longevidade de *Simulium (C.) pertinax* em laboratório em câmara climatizada (BOD) temperaturas de 20°C e 25°C, umidade relativa $80 \pm 5\%$ e 14 horas fotofase. A longevidade sem fotofase e período larval determinado em criadouro semi-natural, temperatura média 22,4°C, Itajaí, 1986/89

ESTÁGIOS DESENVOLVIMENTO	N	TEMPERATURAS		
		20°C	22,4°C	25°C
		$\bar{x} \pm EP$	Período Mínimo	$\bar{x} \pm EP$
PRÉ-OVOPOSIÇÃO	20	6,2 \pm 0,22		4,9 \pm 0,17
INCUBAÇÃO	20	6,5 \pm 0,22		4,0 \pm 0,17
LARVA	300	-	21	-
PUPA	30	4,0 \pm 0,00		3,0 \pm 0,00
LONGEVIDADE	35	12,4 \pm 1,92(39)		6,4 \pm 0,65(18)

() = Longevidade máxima em dias N = número de exemplares por tratamento.

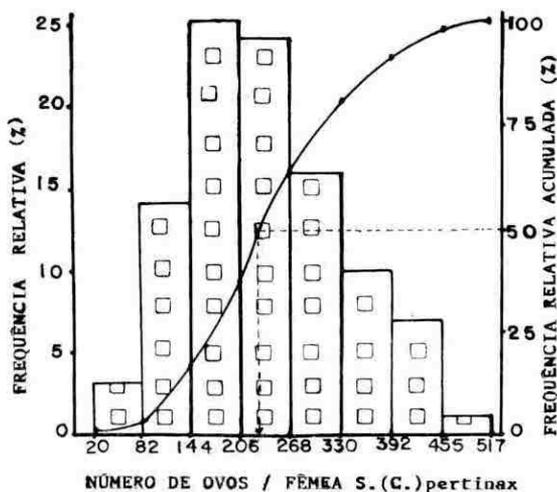


FIGURA 1 - Número médio de ovos (236,9) de *Simulium (Chirostilbia) pertinax* obtidos de 100 fêmeas dissecadas em laboratório. Itajaí 1986/89.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do programa simulídeos, Gosuke Sato, Gilson Rudnei Pires Moreira, Honório Francisco Prado pelo intercâmbio de idéias e revisão do trabalho.

Ao técnico Johnny Junkes (*in memoriam*) pelo auxílio nos trabalhos rotineiros de laboratório.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, J.R. & SHEMANCHUK, J.A. 1987. The biology of *Simulium arctium* in Alberta. Part I. Obeigate anutogeny in *S. arctium* and other black flies (Diptera: Simuliidae) *Can. Ent.* 119 (1):21-27.
- BEKLEMISHEV, W.N. 1940. Gonodotrophic rhythm as basic principle of the biology. *Vop. Fizial. Ekol. Malar. Komara.* 1:3-20.
- CHARLWOOD, J.D.; RAFAEL, J.A.; WILKES, T.J. 1980. Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de Importância médica: uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. *Acta Amazônia* 10(2):311-333.
- COSCARON, S. & WYGODZINSKY, P. 1973. Notas sobre simulídeos neotropicales. IV. Sobre la presencia de *Simulium inaequale* Paterson y Shannon en el noreste de la Argentina y sudeste del Paraguay, y una nueva especie my afin (Diptera, Simuliidae). *Revta. Soc. Ent. argent.* 34 (1/2):141-149.
- CRAIG, D.A. 1975. The larvae of tathitian simuliidae. *J. Med. Entomol.* 12(4):463-476.

- CUPP, W.E. & COLLINS, R.C. 1979. The genotrophic cycle in *Simulium ochraceum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28(2):422-426.
- DALMAT, H.T. 1950. Induced oviposition of *Simulium* flies by exposure to CO₂. *Publ. Health. Rep. Wash.* 65:454-456.
- DATTA, M.A. 1983. A review of the simuliidae (Diptera) from the Oriental region. *Orient. Insect.* 17 (Jan/Dec.):215-267.
- DAVIES, L. 1961. Ecology of the *Prosimulium* species (Diptera) with reference to their ovarian cycles. *Can. Ent.* 93(12):1113-1140.
- DAVIES, D.M. 1978. Ecology and behaviour of adult black flies (Simuliidae): a review. *Quaestiones Ent.* 14(1):3-12.
- DAVIES, D.M.; GYORKOS, H.; RAASTAD, J.E. 1977. Simuliidae Diptera of Rendalen, Norway, IV. Autogeny and anautogeny. *Norw. J. Entomol.* 24:19-23.
- DAVIES, D.M. & PETERSON, B.V. 1956. Observations on the mating feeding ovarian development, and oviposition of adult black flies (Simuliidae, Diptera). *Can. J. Zool.* 34:615-655.
- DELLOME FILHO, J. 1986. *Simuliofauna do Rio Marumbi (Morretes, Paraná): Aspectos bionômicos com ênfase na alimentação das larvas de Simulium incrustatum.* LUTZ, 1970, (Diptera: Simuliidae), Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba PR, 126p.
- ELSEN, P. 1980. Circadian rhythm of metamorphosis and time of development of the preimaginal stages of *Simulium damnosum* S.L. (Diptera, Simuliidae) in the Ivory Coast. *Rev. Appl. Entomol. Series B.* 68(9):278.
- FREEDEN, F.J.H. 1976. The seven larval instars of *Simulium arcticum* (Diptera, Simuliidae). *Can. Ent.* 108(6):591-600.
- GOLINI, V.I. & DAVIES, D.M. 1975. Relative response to coloured substrates by ovipositing black flies (Diptera, Simuliidae) II. Oviposition by *Simulium (Odagmia) ornatum* Meigen. *Norw. J. Entomol.* 22:89-94.
- GUIMARÃES, E.L.G. & MEDEIROS, M.L.G. de, 1986. *Efeito de poluição por despejo orgânico no ciclo vital do Simulium pertinax* Kollar (Diptera: Simuliidae). Curitiba-PR: Surehma. 73p.
- HALL, R. & HARROD, J.J. 1963. A method of rearing *Simulium ornatum* var. *nitidifrons* (Diptera, Simuliidae) in the laboratory. *Hidrobiol.* 22:197-201.
- JOBBINS-POMEROY, A.W. 1916. *Notes on five North American Buffalo gnats of the genus Simulium.* Washington, D.C., U.S. Department of Agriculture. (U.S. Department of Agriculture, Bulletin, 329).
- LACEY, L.A. & MULLA, M.S. 1980. Observations on the biology and distribution of *Simulium tescorum* (Diptera, Simuliidae) in California and adjacent areas. *Pan. Pacif. Ent.* 56(4):323-331.
- LEWIS, D.J. 1957. Aspects of the structure biology and study of *Simulium damnosum*. *Am. Top. Med. Parasit.* 51:340-358.

- LEWIS, D.J. & BENNETT, G.F. 1974. An artificial substrate for the quantitative comparison of the densities of larval simuliidae (Diptera) populations. *Can. J. Zool.* 52:773-775.
- LUTZ, A. 1931. Biologia das águas torrencias e encachoeiras. *Arch. Soc. Biol., Montevideo* 1:114-120.
- MOKRY, J.E. 1980. A method for estimating the age of field-collected female *Simulium damnosum* s.l. (Diptera, Simuliidae). *Trop. Parasit.* 31:121-127.
- MOREIRA, G.R.P.; SATO G.; PEGORARO, R.A. 1980. Considerações sobre a postura e o hábito de oviposição de *Simulium* (I.) *nogueirai* D'Andretta e Gonzales 1964, (Diptera: Colicomorpha). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE VETORES URBANOS E ANIMAIS SINANTRÓPICOS, 2 e REUNIÃO BRASILEIRA DE SIMULÍDEOS, 3. Porto Alegre, RS, CIFURB. p. 78-79. Resumos.
- NAYAR, J.K. & SAVERMAN JR., D.M. 1975. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. 3. Utilization of blood and sugar for fecundity. *J. Med. Entomol.* 12 (2): 220-225.
- PEGORARO, R.A. 1989. Dispositivo para criação de larvas e pupas de Simuliidae (Diptera) em condições semi-naturais. *An Soc. ent. Brasil* 18 (Supl.):179-183.
- RAMIREZ-PEREZ, J. 1977. *Biologia de Simulium metallicum*, vector de la oncocercosis humana en Venezuela. Washington, D.C., O.M.S., 141p. (OMS. Publication Científica, 338).
- RAYBOULD, J.N. & GRUNEWALD, J. 1975. Present progress towards the laboratory colonization of African simuliidae (Diptera). *Trop. Parasit.* 26:155-168.
- SIMMONS, K.R. & EDMAN, J.D. 1981. Sustained colonization of the black fly *Simulium decorum* Walker (Diptera, Simuliidae). *Can. J. Zool.* 59:1-7.
- TAKAOKA, H. 1973. Preliminary observation on follicular development of the black fly, *Simulium (Simulium) japonicum* females in winter in Nakanoshima Is., Ryukyu Islands (Simuliidae). *Acta Med. Univ. Kagoshima* 15: 267-271.
- TIMM, T. 1987. Dormancies in black flies, with special reference to the egg stage (Diptera, Simuliidae). *Entomol. Gen.*, 12 (2/3):133-142.
- VULCANO, M.A. 1962. Simulídeos da Serra da Bocaina. Observações bionômicas, revalidação de *Simulium brevifurcatum* Lutz e descrição de uma espécie nova, *S. anamarie* (Diptera, Simuliidae). *Papéis avuls. Dep. zool. Secr. Agric. S. Paulo.* 15 (art. 19): 239-272.
- WENK, P. & RAYBOULD, J.N. 1972. Mating, blood feeding and oviposition of *Simulium damnosum*. Theobald in the laboratory. *Bull. World Health Organization* 47(2942):627-634.
- WOTTON, R.S. 1982. Difference in carbon weight of the immature stages of two coexisting species of black flies (Diptera, Simuliidae) with contrasting reproductive strategies. *Hidrobiol.* 94 (3):270-283.