

兴义维蚋实验室饲养条件探索*

杨晨** 寻慧 赵娜 张洪卫 李世美 高晗 修江帆 杨明***

(贵州医科大学基础医学院生物学系暨医学昆虫重点实验室, 贵阳 550025)

摘要 【目的】旨在探索兴义维蚋 *Simulium xingyiense* 实验室饲养方法, 使其能在实验室内连续饲养 2 代。【方法】设计制作羽化杯、交配管、喂血装置和产卵管, 并改造市售小型鱼缸供蚋卵孵化及后续饲养。第 1 代饲养: 将野外采集得到的兴义维蚋蛹置于羽化杯中饲养获得成虫; 在交配管中诱导成虫交配 (30 min); 将雌蚋转移至喂血装置中喂养 (90 min); 将饱腹雌蚋置于产卵管中产卵; 将产出的卵置于改造过的小型鱼缸中孵化, 并饲养至幼虫化蛹。第 2 代饲养: 除蛹来源于第 1 代饲养外, 所有步骤同第 1 代饲养。全部实验在温度 20 °C、相对湿度 70% 下进行, 但在喂血环节分别测试喂血培养基不同温度和成分对饱腹率和产卵率的影响。【结果】添加 ATP 的血清培养基更能吸引雌蚋吸血; 在喂血培养基温度为 34 °C 时雌蚋饱腹率最高; 兴义维蚋雌蚋喜食牛血清培养基; 喂血培养基内血清含量越高, 饱腹雌蚋产卵率越高; 在最适喂养条件下雌蚋饱腹率为 25.3%, 产卵率为 29.4%, 平均每只雌蚋产 163.5 个卵, 蚋卵孵化率为 85.5%。幼虫生长周期为 13-15 d, 结蛹率为 10.7%; 蛹经 4-6 d 可羽化为成虫, 羽化率为 95.2%。【结论】兴义维蚋可在实验室内连续饲养 2 代, 能够满足后续分子生物学实验要求, 但幼虫结蛹率较低, 提示改善幼虫饲养、提高结蛹率可能是最终建立兴义维蚋实验室品系的关键所在。

关键词 蚋科; 兴义维蚋; 饲养方法; 产卵

Improved laboratory conditions for rearing *Simulium xingyiense*

YANG Chen** XUN Hui ZHAO Na ZHANG Hong-Wei
LI Shi-Mei GAO Han XIU Jiang-Fan YANG Ming***

(Department of Biology and Key Laboratory of Medical Entomology, School of Basic Medicine,
Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract [Objectives] To improve current rearing methods for *Simulium xingyiense* to enable the maintenance of two consecutive generations under laboratory conditions. [Methods] We designed and built emergence cups, mating tubes, blood-feeding apparatus and oviposition tubes, and modified a commercially available miniature aquarium for hatching eggs and rearing successive generations. The first generation was reared as follows: pupae were collected in the field and placed in emergence cups until adults emerged. Adults were then transferred to mating tubes for 30 minutes after which females were transferred to the blood-feeding apparatus for 90 minutes. Engorged females were placed in oviposition tubes until they laid eggs, which were then hatched in the modified aquarium and reared until the larvae pupated. The second generation was reared by repeating these steps with pupae from the first generation. All experiments were carried out at a temperature of 20 °C and a relative humidity of 70%. The effects of different feeding media temperatures and compositions on engorgement and oviposition rates were measured and compared. [Results] Serum medium enriched with ATP was found to be the most appealing to female flies. The highest engorgement rate was measured at a medium temperature of 34 °C. Female flies preferred bovine serum medium, and the higher its serum content, the higher their oviposition rate. Under the above optimal conditions, the female engorgement rate was 25.3%, the oviposition rate was 29.4%, each female produced an average of 163.5

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31860324); 贵州医科大学国家自然科学基金培养项目 (20NSP018)

**第一作者 First author, E-mail: 896877832@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: simulium@gmc.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-01-04; 接受日期 Accepted: 2022-05-23

eggs and the hatching rate was 85.5%. The larval stage lasted 13-15 days with a pupation rate of 10.7%. Adults emerged after 4-6 days at an emergence rate of 95.2%. **[Conclusion]** Two consecutive generations of *S. xingyiense* can be reared from pupae under laboratory conditions for subsequent molecular experiments. However, the pupation rate was low, so finding a way to increase this would further improve the captive rearing of this species.

Key words Simuliidae; *Simulium xingyiense*; rearing methods; oviposition

蚋 Simuliidae 是世界性分布的重要医学昆虫类群, 其可叮咬人、畜、禽导致过敏反应, 并传播盘尾丝虫病 (Onchocerciasis)、曼森线虫病 (Mansonelliasis) 以及禽类住白细胞虫病 (Leucocytozoonsis) 等多种疾病 (Michalski *et al.*, 2010; 陈汉彬, 2016)。蚋类生物学、寄生虫学、基因组学等相关研究都依赖实验室品系的建立。Puri (1925) 将野外采集的蚋卵在实验室内饲养为成虫, 并对其生活史进行了详细的描述, 为蚋类饲养研究打下了基础。Wenk (1965) 观察了蚋类在野外的交配、进食、产卵等生活习惯。此类行为学观察对于诱导蚋类在实验室内繁殖具有重要作用, 但不同蚋类物种间的行为差异使得其在实验室饲养时也具有不同的繁殖条件 (Raybould and Yagunga, 1969; Wenk and Raybould, 1972; Mokry, 1976; Klowden and Lea, 1979; Sutcliffe and McIver, 1979; Takaoka, 1987; Wilson *et al.*, 2000)。早期蚋类饲养方法采用活体动物 (包括人) 供雌蚋吸食, 吸血率极不稳定, 同一蚋种在吸食同种动物血液时吸血率最高可达 60%, 最低只有 10% (Raybould and Yagunga, 1969)。为了获得更加稳定的喂血结果, McMahon (1967) 首次提出用膜覆盖血液供雌蚋叮咬吸食, 该方法下雌蚋饱腹率为 24.5%。早期的膜喂养法使用雏鸡皮肤为原料, 制备方法复杂繁琐。Smith 和 Edman (1982) 改用封口膜, 这是蚋繁育史上首次使用人工处理过的血液喂养雌蚋。蚋类幼虫期的饲养条件不明是其实验室定殖的阻碍之一, 研究人员设计了不同的幼虫饲养装置, 并初步探讨了影响幼虫存活的诸多因素, 包括水温、溶氧量、pH 值和食物等 (Simmons and Edman, 1980, 1982; Ham and Bianco, 1983)。截至目前, 仅 *S. decorum* 及 *S. vittatum* 等 4 个自育种建立了实验室品系 (Mokry, 1978; Simmons and Edman, 1978; Tarrant *et al.*, 1983; Edman and

Simmons, 1985; Takaoka, 1985; Bernardo *et al.*, 1986)。国内仅见安继尧等 (1997) 对一自育种 (黄足真蚋 *Simulium (Eusilium) aureohirtum* 进行了繁殖研究, 但并未完成其在实验室的世代繁殖。本研究选择广布于贵州省的兴义维蚋 *Simulium xingyiense*, 参照 Fredeen (1964) 的研究成果, 自行设计饲养装置, 旨在建立适合兴义维蚋的实验饲养条件, 为后续分子生物学研究提供稳定虫源。

1 材料与方法

1.1 标本来源

蚋类标本采集于贵州省贵阳市青岩镇 (106°40'43"E, 26°20'13"N) 河流中, 主要采集对象为蚋蛹, 带回实验室后即进行蛹的形态学鉴定 (陈汉彬, 2016), 挑选出兴义维蚋用于后续实验。

1.2 饲养装置

自行设计 4 种饲养装置。整个饲养过程均在环境温度 (20±1) °C, 相对湿度 70%±10% 的条件下进行。

1.2.1 羽化杯 装置为实验室自行设计。杯底直径 40 mm, 杯口直径 75 mm, 高 88 mm 的透明塑料杯。杯侧壁中央有一个十字开口的成虫收集孔, 杯底部平铺约 3 cm 厚的湿润棉花, 杯口罩纱布供透气 (图 1)。

1.2.2 交配管 该装置为实验室自行设计。直径 30 mm、长 100 mm 的透明硅胶管, 两端由海绵塞封口 (图 2)。

1.2.3 喂血装置 喂血装置参照 Mokry (1976) 的设计, 但将水流循环保温为恒温水浴锅加热保温, 其余组件类似。由一直径为 90 mm 和高为 6 mm 的一次性塑料培养皿与杯底直径为 40 mm、

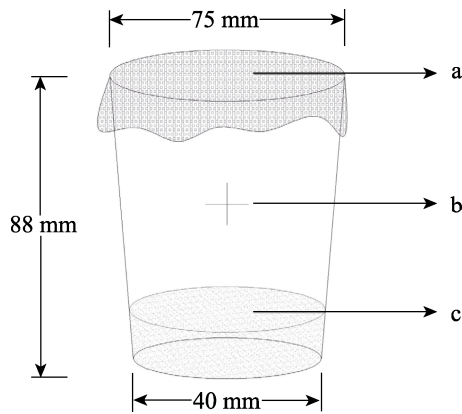


图 1 羽化杯

Fig. 1 Emergence cup

a. 纱布; b. 收集孔; c. 湿润棉花。
a. Gauze; b. Collecting hole; c. Moist cotton.

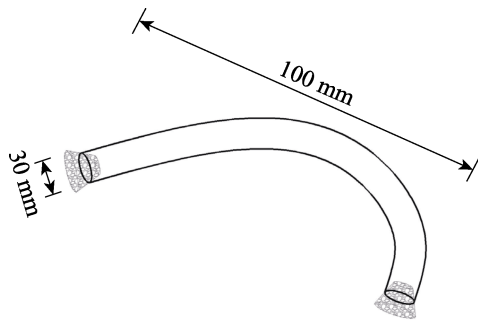


图 2 交配管

Fig. 2 Mating tube

杯口直径为 75 mm 和高为 88 mm 的透明塑料杯组成, 塑料杯侧壁中央有一十字开口的成虫收集孔。培养皿内充满喂血溶液并用拉薄的封口膜封口, 塑料杯倒扣并用封口膜固定在培养皿上。将培养皿直接浮在恒温水浴锅内, 以控制喂血溶液温度 (图 3)。

1.2.4 产卵管 该装置为实验室自行设计。产卵管为聚丙烯 PP 管, 直径 24 mm, 高 95 mm, 盛有约 40 mm 高的去离子水, 水内斜放一宽 20 mm、长 50 mm 透明塑料片; 顶部由注射有 10% 蔗糖溶液的海绵塞封口 (图 4)。

1.2.5 蚋卵孵化装置 该装置改造自市售家用小型鱼缸, 增加过滤平台宽度并减缓水流速度。装置外部尺寸为 240 mm×180 mm×280 mm, 玻璃材质, 顶部有一塑料过滤平台, 抽水泵置于水下将水抽至过滤平台形成流动循环水 (图 5)。

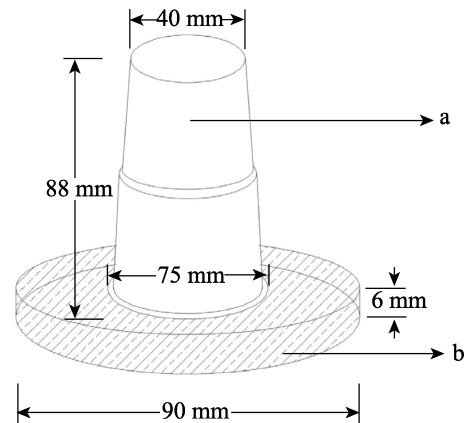


图 3 喂血装置

Fig. 3 Blood-feeding apparatus

a. 塑料杯; b. 培养皿。a. Plastic cup; b. Petri dish.

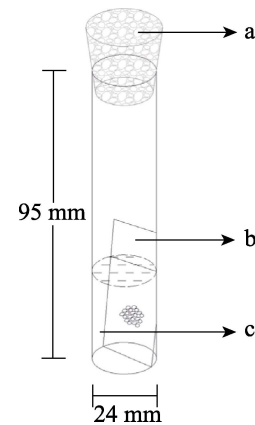


图 4 产卵管

Fig. 4 Oviposition tube

a. 海绵塞; b. 塑料片; c. 去离子水。
a. Sponge plug; b. A piece of plastic; c. Deionized water.

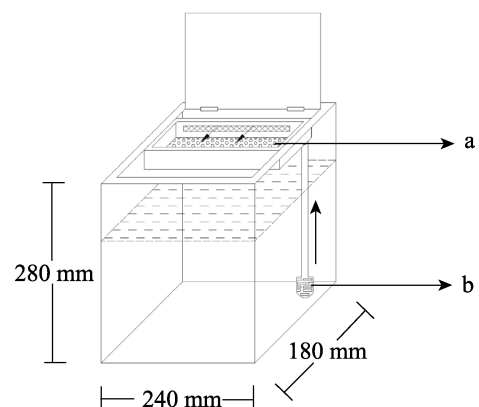


图 5 孵化装置

Fig. 5 Hatching system

a. 过滤平台; b. 抽水泵。a. Filtering platform; b. Pump.

1.3 饲养条件及方法

将野外采集的兴义维蚋蛹先置于羽化杯(图1)中,待其羽化后,将成虫投入交配管(图2)中,30 min后将交配管中的成虫转移至喂血装置(图3)。喂血时间持续90 min,记录饱腹蚋(肉眼观察到腹部膨胀即为饱腹)及死亡蚋数量。将饱腹雌蚋单独挑出置于产卵管(图4)中,每24 h观察并记录产卵蚋数量,直至雌虫死亡。将蚋卵转移至孵化装置(图5)的过滤平台上待其孵化。观察到蚋卵孵化为初龄幼虫后即开始饲喂。将磨碎后的鱼饲料用200目过筛网过筛,以得到75 μm 的饲料颗粒。按照每100只卵每天添加0.1 g饲料的比例饲喂,直至结蛹。

1.3.1 最适吸血温度探索 使用牛血清+1 mmol/L ATP培养基,分别在33、34、35、36、37、38和39 $^{\circ}\text{C}$ 喂血,喂血时间为90 min。每个温度进行3次重复,每次实验使用100头成虫,记录饱腹蚋数量。

1.3.2 ATP诱导吸血作用验证 分别使用100%牛血清与牛血清+1 mmol/L ATP喂血培养基对兴义维蚋进行喂血。喂血培养基温度34 $^{\circ}\text{C}$ 。每种培养基进行3个实验重复,每次实验使用100头成虫,喂血时间持续90 min,记录饱腹蚋数量。

1.3.3 血清偏好性探索 在温度34 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,喂血培养基分别使用猪、牛、羊、马、鸡和兔6种动物血清+1 mmol/L ATP饲养蚋,每种动物血清进行3次重复实验,每次实验使用100头成虫,喂血时间为90 min,记录饱腹蚋数量。

1.3.4 喂血培养基内蛋白质含量对产卵率的影响 在温度为34 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,喂血培养基分别使用40%牛血清+60%细胞培养液+1 mmol/L ATP、60%牛血清+40%细胞培养液+1 mmol/L ATP、80%牛血清+20%细胞培养液+1 mmol/L ATP和100%牛血清+1 mmol/L ATP喂血蚋。各配比均进行3次重复,每次实验使用100头成虫,喂血时间为90 min,喂血结束后记录饱腹蚋总数。

1.4 数据分析

采用GraphPad Prism 6统计软件对获得的数

据进行单因素方差分析,比较不同喂养条件下雌蚋饱腹率或产卵率的差异显著性($P<0.05$),并绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 喂血培养基温度对雌蚋饱腹率的影响

在33、34、35、36、37、38和39 $^{\circ}\text{C}$ 培养基温度下饲养,兴义维蚋雌蚋的饱腹率分别为3.9%、21.3%、12.0%、7.5%、18.1%、3.1%和1.2%。雌蚋在喂血培养基为34 $^{\circ}\text{C}$ 时饱腹率最高,其次是37 $^{\circ}\text{C}$,两者具有显著性差异($P<0.05$);其余喂血培养基温度饲喂下的雌蚋饱腹率与34 $^{\circ}\text{C}$ 时的雌蚋饱腹率均具有极显著性差异($P<0.0001$)(图6)。

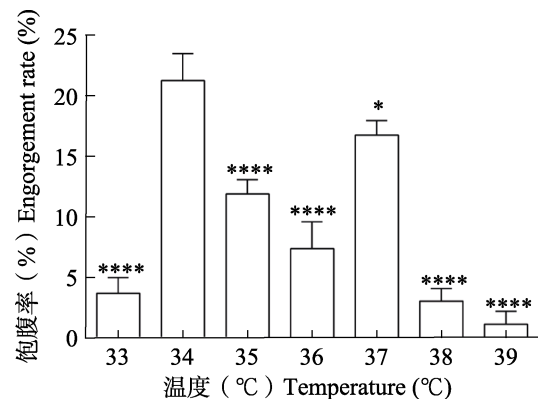


图6 不同培养基温度下兴义维蚋的饱腹率

Fig. 6 Engorgement rates of *Simulium xingyiense* fed under different temperatures of medium

数据为平均数 $\pm$ 标准误差。*表示有差异($P<0.05$, 单因素方差分析); **表示差异显著($P<0.001$, 单因素方差分析), ***表示差异极显著($P<0.0001$, 单因素方差分析)。下同。

Values are mean $\pm$ SE; * represents significant differences at the 0.05 probability level ($P<0.05$, one-way ANOVA), *** represents significant differences at the 0.01 probability level ($P<0.001$, one-way ANOVA), **** represents significant differences at the 0.001 probability level ($P<0.0001$, one-way ANOVA), The same as below.

2.2 ATP对雌蚋饱腹率的影响

使用纯牛血清和牛血清+ATP喂血兴义维蚋雌蚋后的饱腹率分别为6.4%和24.2%,且二者具有显著差异($P<0.01$)(图7)。

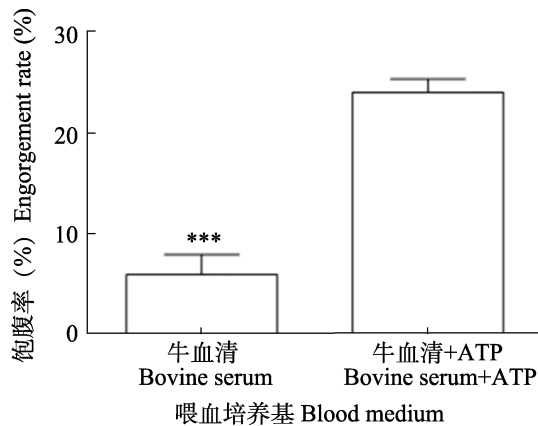


图7 用纯牛血清和牛血清+ATP 喂养时兴义维纳的饱腹率比较

Fig. 7 Comparison of engorgement rates of *Simulium xingyiense* fed on pure bovine serum and bovine serum + ATP

2.3 雌纳血清偏好性

使用兔血清、猪血清、鸡血清、山羊血清、牛血清和马血清喂养后,兴义维纳雌纳饱腹率分别为 7.8%、15.3%、15.1%、13.7%、23.5%和 9.1%。牛血清喂养下雌纳饱腹率最高,与其它血清喂养下的饱腹率均具有显著性差异 ($P < 0.05$) (图 8)。

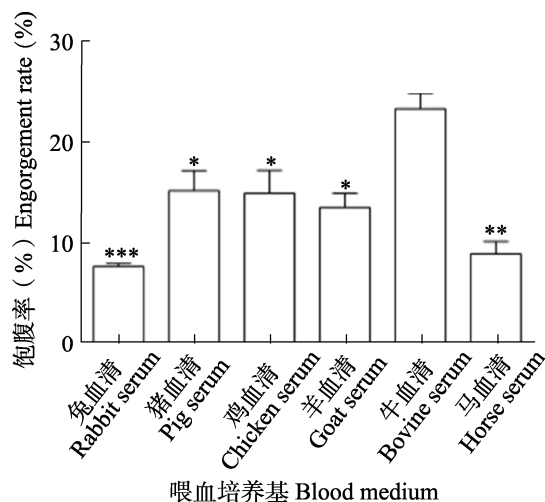


图8 不同血清喂养兴义维纳的饱腹率

Fig. 8 Engorgement rates of *Simulium xingyiense* fed on different kinds of blood serum

2.4 喂血培养基内蛋白质含量对产卵率的影响

40%牛血清+60%细胞培养液+ATP 喂养后,兴义维纳雌纳产卵率为 0.7%; 60%牛血清+40%

细胞培养液+ATP 喂养后雌纳产卵率为 3.8%; 80%牛血清+20%细胞培养液+ATP 喂养后雌纳产卵率为 9.4%; 100%牛血清+ATP 喂养后的雌纳产卵率为 25.5%。100%牛血清+ATP 喂养后的雌纳产卵率显著高于其他添加有细胞培养液的血清 ($P < 0.0001$) (图 9)。

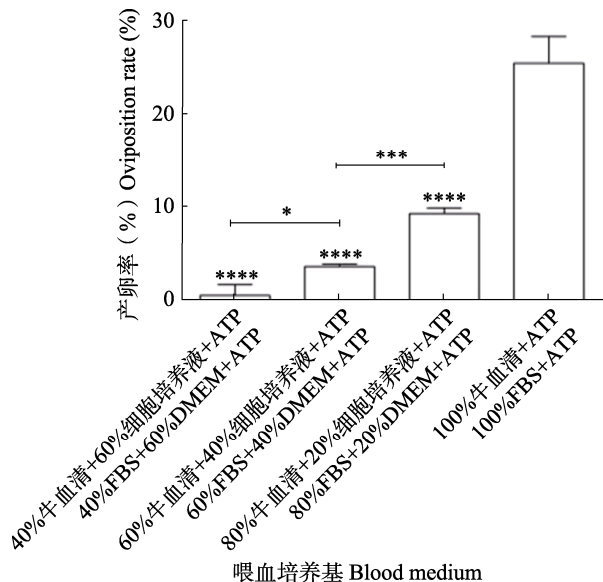


图9 喂血培养基内蛋白质含量对兴义维纳产卵率的影响

Fig. 9 Oviposition rates of *Simulium xingyiense* fed on media with different protein contents

FBS: 牛血清; MEM: 细胞培养液。

FBS: Bovine serum; DMEM: Cell culture medium.

2.5 最适喂血条件下雌纳饱腹率和产卵率

综合上述研究结果,选择 100%牛血清+ATP 的培养基和培养基温度为 34 °C 是兴义维纳最适喂血条件。在该条件下喂养雌纳的饱腹率为 25.3%,产卵率为 29.4%,平均每只雌纳产 163.5 个卵,卵孵化率为 85.5%。

2.6 实验室条件下兴义维纳的生活史

在上述实验室条件下饲养兴义维纳,平均每只雌纳产 163.5 个卵,卵孵化率为 85.5%。幼虫生长周期约为 13-15 d,结蛹率为 10.7%;蛹经 4-6 d 可羽化为成虫,羽化率为 95.2%。

3 讨论

ATP 虽仅以 mmol/L 的浓度存在于红细胞及血小板中, 却是吸血昆虫进食的重要指示信号 (McMahon, 1967), 通过添加 ATP 可将雌虫吸引到膜的表面。本研究通过比较 100% 牛血清与 100% 牛血清+ATP 喂血培养基的雌蚋饱腹率, 证实 ATP 在雌蚋吸血的过程中扮演了诱食剂的角色。相同条件下添加了 ATP 的培养基更能吸引雌虫吸血, 饱腹率更高。

通过设置 7 个不同的温度梯度饲养蚋, 结果显示在 34 °C 和 37 °C 时蚋的饱腹率较高。Sutcliffe 和 McIver (1975) 研究培养基温度对 *Simulium venustum* 吸血的影响, 测试范围为 26-40 °C, 结果显示培养基温度在 34-37.5 °C 时吸血率较高, 37-40 °C 时骤降。但由于温度过高会导致蚋死亡率增大, 因此, 室内条件下喂养蚋, 34 °C 是最适的喂血温度。

由于膜系统喂养法与传统的蚋饲养方法不同, 既可探究兴义维蚋的血清偏好性, 也可以在一定程度上提高雌蚋的饱腹率。本研究采用 6 种不同的动物血清饲喂兴义维蚋, 结果表明使用猪、鸡和牛血清饲喂时雌蚋的饱腹率较高, 平均饱腹率分别为 15.3%、15.1% 和 23.5%, 由此可见采用牛血清喂养时饱腹率最高。因此在实验室定殖时, 可以采用牛血清饲养以提高兴义维蚋的饱腹率。了解其对吸血宿主的偏好也可作为其传播流行病学的一个重要指标, 可以减少蚋对病原体的传播和对社会经济的危害。

雌蚋需采血后才能产卵, 因为血液中含有能促进其卵巢发育的重要蛋白质 (Fredeen, 1964; Sutcliffe and McIver, 1975; Colbo and Porter, 1981)。为了探明雌蚋卵巢的发育情况与培养基内蛋白质含量是否相关, 本研究采用了不同配比的细胞培养液+牛血清对兴义维蚋进行喂养。由于细胞培养液中蛋白质含量较低, 故细胞培养液含量较高的喂血培养基中蛋白质含量较低。比较不同培养基喂养下雌蚋的产卵量, 结果表明培养基中血清含量越高, 即蛋白质含量越高, 雌蚋的产卵量相应升高。

蚋类在其幼虫阶段以水中微小的悬浮颗粒为食, 可摄取的颗粒大小 10-445 μm (Fredeen, 1960, 1964; Kurtak, 1978; Merritt *et al.*, 1978)。本研究中蚋幼虫食物为 75 μm 左右的鱼饲料粉, 该饲料直径较大, 故可能为初龄幼虫死亡率高的主要原因, 后续将进行优化。蚋幼虫的发育还受到水流温度、速度、食物大小、密度等诸多因素的影响 (Colbo and Porter, 1981), 后续还需进一步研究。

在实验室条件下, 兴义维蚋种群的成功定殖不仅解决了因天气寒冷导致蚋类标本采集困难的难点, 而且可纯化兴义维蚋基因, 为进一步进行全基因组测序提供基础。

参考文献 (References)

- An JY, Hao BS, Yan G, Long ZM, Fan GC, 1997. A study on laboratory colonization of *Simulium* (*Eusimulium*) *aureohirtum* (II). *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 8(3): 201-203. [安继尧, 郝宝善, 严格, 龙芝美, 樊广成, 1997. 黄足真蚋实验饲养(二). *中国媒介生物学及控制杂志*, 8(3): 201-203.]
- Bernardo MJ, Cupp EW, Kiszewski AE, 1986. Rearing black flies (Diptera: Simuliidae) in the laboratory: Bionomics and life table statistics for *Simulium pictipes*. *Journal of Medical Entomology*, 23(6): 680-684.
- Chen HB, 2016. Chinese Blackflies (Diptera: Simuliidae). Guiyang: Guizhou Technology Press. 104-106. [陈汉彬, 2016. 中国蚋科昆虫. 贵阳: 贵州科技出版社. 104-106.]
- Colbo MH, Porter GN, 1981. The interaction of rearing temperature and food supply on the life history of two species of Simuliidae (Diptera). *Canadian Journal of Zoology*, 59(2): 158-163.
- Edman JD, Simmons KR, 1985. Rearing and colonization of black flies (Diptera, Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 22(1): 1-17.
- Fredeen FJH, 1960. Bacteria as a source of food for black-fly larvae. *Nature*, 187(4741): 963.
- Fredeen FJH, 1964. Bacteria as food for blackfly larvae (Diptera: Simuliidae) in laboratory cultures and in natural streams. *Canadian Journal of Zoology*, 42(4): 527-548.
- Ham PJ, Bianco AE, 1983. Maintenance of *Simulium Wilhelmia lineatum* Meigen and *Simulium erythrocephalum* de Geer through successive generations in the laboratory. *Canadian Journal of Zoology*, 62(5): 870-877.

- Kurtak DC, 1978. Efficiency of filter feeding of black fly larvae (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 56(7): 1608–1623.
- McMahon JP, 1967. Artificial feeding of Simulium vectors of human and bovine onchocerciasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 38(6): 957–966.
- Michalski ML, Bain O, Fischer K, Fischer PU, Kumar S, Foster JM, 2010. Identification and phylogenetic analysis of *Dirofilaria ursi* (Nematoda: Filarioidea) from Wisconsin black bear (*Ursus americanus*) and its *Wolbachia* endosymbiont. *Journal of Parasitology*, 96(2): 412–419.
- Mokry JE, 1976. A simplified membrane technique for feeding blackflies (Diptera: Simuliidae) on blood in the laboratory. *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1): 127–129.
- Mokry JE, 1978. Progress towards the colonization of *Cnephia mutata* (Diptera: Simuliidae). *Bulletin of the World Health Organization*, 56(3): 455–456.
- Klowden MJ, Lea AO, 1979. Oocyte maturation in the black fly, *Simulium underhilli* Stone and Snoddy, resulting from blood enemas. *Canadian Journal of Zoology*, 57(6): 1344–1347.
- Merritt RW, Mortland MM, Gersabeck EF, Ross DH, 1978. X-Ray diffraction analysis of particles ingested by filter-feeding animals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(1): 27–34.
- Puri IM, 1925. On the life-history and structure of the early stages of Simuliidae (Diptera, Nematocera) part I. *Parasitology*, 17(3): 295–334.
- Raybould JN, Yagunga SK, 1969. Artificial feeding of East African female Simuliidae (Diptera), including vectors of human onchocerciasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 40(3): 463–466.
- Simmons KR, Edman JD, 1982. Laboratory colonization of the human onchocerciasis vector *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae), using an enclosed, gravity-trough rearing system. *Journal of Medical Entomology*, 19(2): 117–126.
- Simmons KR, Edman JD, 1978. Successful mating, oviposition, and complete generation rearing of the multivoltine black fly *Simulium decorum* (Diptera: Simuliidae) in the laboratory. *Canadian Journal of Zoology*, 56(6): 1223–1225.
- Simmons KR, Edman JD, 1980. Sustained colonization of the black fly *Simulium decorum* Walker (Diptera: Simuliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 59(1): 1–7.
- Sutcliffe JF, McIver SB, 1975. Artificial feeding of simuliids (*Simulium venustum*): Factors associated with probing and gorging. *Experientia*, 31(6): 694–695.
- Sutcliffe JF, McIver SB, 1979. Experiments on biting and gorging behaviour in the black fly *Simulium venustum*. *Physiological Entomology*, 4(4): 393–400.
- Takaoka H, 1985. Observations on the mating, blood feeding and oviposition of *Simulium takahashii* (Rubtsov) (Simuliidae, Diptera) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, 36(3): 211–217.
- Takaoka H, 1987. Effect of blood-meal size on oocyte maturation and fecundity in *Simulium takahashii* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(1): 45–51.
- Tarrant C, Moobola S, Scoles G, Cupp EW, 1983. Mating and oviposition of laboratory-reared *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Canadian Entomologist*, 115(3): 319–323.
- Wenk P, Raybould JN, 1972. Mating, blood feeding, and oviposition of *Simulium damnosum* Theobald in the laboratory. *Bulletin of the World Health Organization*, 47(5): 627–634.
- Wenk P, 1965. Über die biologie blutsaugender Simuliiden (Diptera). *Zoomorphology*, 55(6): 671–713.
- Wilson MD, Osei-Atweneboana MY, Boakye DA, McCall PJ, 2000. Improved survival and oviposition of *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) in the laboratory. *Bulletin of Entomological Research*, 90(3): 285–289.