

PAPÉIS AVULSOS

DO

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

SECRETARIA DA AGRICULTURA — S. PAULO - BRASIL

OBSERVAÇÕES SÔBRE A BIOLOGIA DO *PHLEBOTOMUS WHITMANI* ANTUNES E COUTINHO, 1939 (*DIPTERA, PSICHODIDAE*) EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS (*)

Por

M. PEREIRA BARRETTO

Constitue objeto do presente trabalho o relato de observações sôbre o ciclo evolutivo do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 em condições experimentais. Esta espécie, que apresenta uma grande incidência nas zonas de alta endemicidade da leishmaniose cutâneo-mucosa no nosso Estado, é muito antropófila e, segundo verificações inéditas do DR. J. O. COUTINHO, é possível vetora do parasita daquela moléstia.

*
* * *

Para a obtenção de culturas dêste flebótomo em laboratório partimos de ovos postos por fêmeas capturadas em Vila Queiroz, Pompéia, Alfredo de Castilho e Presidente Prudente e empregámos o processo descrito ao estudarmos a biologia do *Phlebotomus intermedius* em condições experimentais (BARRETTO, 1940), processo êste que, a nosso ver, é o único que permite uma criação selecionada das múltiplas espécies que constituem a nossa fauna flebotômica.

Na criação de flebôtomos em larga escala com o fim de fornecer exemplares para experiências de transmissão da *Leishmania brasili-*

(*) — Trabalho da Comissão de Estudos da Leishmaniose do Estado de São Paulo realizado no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e apresentado à sessão de 25-XI-40 da Semana de Higiene e Moléstias Tropicais e Infectuosas da Associação Paulista de Medicina.

liensis usamos uma ligeira modificação do processo preconizado por ROUBAUD e COLAS-BELCOUR (1927). Esta técnica consiste no seguinte: 20 a 30 fêmeas alimentadas, misturadas ou não com machos, são encerradas em uma alonga de vidro cuja extremidade superior é fechada com um pedaço de musseline ou de gaze e cuja extremidade inferior é aplicada a um bloco de gesso com uma escavação no centro. Este é recoberto com uma quantidade de meio de cultura suficiente para alimentar as larvas até a fase pupal e repousa sobre areia húmida. O sistema é mantido, no escuro, à temperatura de laboratório ou em estufa a 25-27°C. e basta adicionar diariamente um pouco de água à areia para que a humidade da cultura se mantenha em condições ótimas. Os flebotomos, a medida da eclosão são removidos da alonga com um capturador de Castro (BARRETTO e COUTINHO, 1940).

*

* * *

O *Phlebotomus whitmani* é uma espécie que se cria facilmente em laboratório. As suas larvas se comportam de maneira semelhante às do *Phlebotomus intermedius* em condições experimentais (BARRETTO, 1940). As culturas são, porém, mais ricas e as larvas dotadas de maior atividade, particularmente no 3.º e no 4.º estágio.

Trabalhando com 23 culturas em placas de Petri, obtidas de posturas isoladas e mantidas em diferentes condições de temperatura e humidade, observámos para duração das diversas fases do ciclo evolutivo do *Phlebotomus whitmani* os resultados abaixo relatados:

Períodos mínimos de incubação dos ovos	7 — 17 dias.
Períodos larvais mínimos	19 — 44 ”
Períodos pupais mínimos	7 — 15 ”
Total	34 — 72 dias

Influência da humidade. — Investigando a influência da humidade sobre o ciclo evolutivo do flebotomo verificámos que os ovos e as larvas necessitam, para que a evolução se processe sem interrupção de um alto teor de humidade. Assim, colocados em recipientes secos os ovos murcham, tanto mais rapidamente quanto mais alta é a temperatura, mas sempre em prazo de tempo muito curto, e não eclodem. Em papel de filtro saturado de humidade evoluem normalmente, dependendo a duração do período de incubação da temperatura em que se opera, como veremos adiante. Uma humidade excessiva, condicionando a formação de films líquidos sobre os ovos prejudica a sua eclosão. Na água os ovos não eclodem.

Do mesmo modo, as larvas jovens necessitam de um grau de humidade do meio próximo do ponto de saturação correspondente à temperatura da experiência. Em presença de humidade excessiva que permita a formação de películas líquidas a vitalidade das larvas é grandemente prejudicada e na água elas morrem. E exigência de humidade por parte das larvas mais evoluídas e menor, podendo as em 4.º estágio viver em graus de humidade relativamente afastados do limite de saturação, embora isto lhes seja prejudicial ao normal desenvolvimento. Mas, ainda aqui, uma humidade excessiva tem sempre efeito nocivo.

As pupas exigem pouca humidade, evoluindo normalmente em recipientes apenas com ar saturado de humidade.

Influência da temperatura. — A evolução dos flebótomos em culturas está na estrita dependência da temperatura.

1) — Período de incubação dos ovos. Para verificar a influência da temperatura sobre a evolução dos ovos tomámos diversas bateladas de ovos, colocámos em placas de Petri forradas com papel húmido e submetemô-las a diferentes temperaturas.

- a) Conservados em estufa a 37°C durante 6-12 horas os ovos já não mais eclodiram.
- b) Após permanência em estufa a 30°C durante cêrca de 24 horas nenhum ovo deu saída a larva.
- c) Em estufa a 25-27°C grande número de ovos (83,7%) eclodiram dentro de 7-8 dias.
- d) Conservados à temperatura do laboratório que, durante as experiências (19-4-40 a 5-5-40) variou entre 19,5 — 22,2°C (mínimas) e 20,5 — 23,2°C (máximas) os ovos eclodiram ao fim de 12-13 dias.
- e) Mantidos em ambiente refrigerado por evaporação de água (17,1 — 20,2°C) os ovos apresentaram um período de incubação de 17 dias.
- f) Enfim, colocados na geladeira a 4°C os ovos não eclodiram até o 60º dia.

2) — Período larval. Em nossas experiências pudemos verificar que a temperatura mais favorável para o desenvolvimento das larvas é 25-27°C. Nesta temperatura a duração mínima do período larval foi de 19 dias.

Em temperaturas superiores a 27º a mortalidade das larvas é grande, embora se possa obter, por vezes, um desenvolvimento mais rápido nas fases mais evoluídas do ciclo larval. A 30°C as larvas mor-

rem sistematicamente ao fim de um lapso de tempo mais ou menos curto.

Em temperaturas pouco inferiores a 25-27°C a evolução das larvas se dá normalmente, mas a duração do período larval é maior. Assim, mantendo culturas à temperatura do laboratório, que variou entre 21,0 — 22,8°C (mínimas) e 22,5 — 24,5°C (máximas), observamos, para duração mínima do período larval, 25-30 dias.

A medida que a temperatura se abaixa, a duração da fase larval se alonga e a 17,1 — 20,2°C ela já é de 40-45 dias. A 4 — 6°C observamos uma parada completa do desenvolvimento das larvas, posto que elas possam resistir a essa temperatura por alguns dias, readquirindo sua atividade desde que sejam colocadas em condições térmicas favoráveis.

3) — Período pupal. Embora possamos obter a eclosão de adultos a 30°C certo número de pupas morre a essa temperatura, principalmente quando a ela são submetidas logo depois de emergirem da larva. A 37°C ainda conseguimos observar a eclosão de adultos quando as pupas são colocadas na estufa na iminência de dar nascimento à imagem.

Mas, a temperatura mais favorável para a evolução das pupas é de 25 — 27°C. Nestas condições a duração mínima do período pupal é de 7 — 8 dias.

Temperaturas inferiores a estas retardam a evolução da pupa. A 4 — 6°C nunca observamos a eclosão de um adulto embora as pupas possam resistir a essa temperatura e dar nascimento à imagem quando recolocadas em melhores condições térmicas.

Em resumo, a temperatura mais favorável para o desenvolvimento do *Phlebotomus whitmani* do ovo a adulto é 25 — 27°C; temperaturas mais elevadas são mais ou menos nocivas e temperaturas inferiores dilatam a duração do ciclo evolutivo.

Damos abaixo os protocolos de três culturas mantidas respectivamente a 25 — 27°C (estufa), a 21 — 24,5°C (temperaturas do laboratório entre 31-1-40 e 15-3-40) e a 17,1 — 20,2°C (temperaturas obtidas por evaporação de água).

N.º da fêmea: 265. 3

Espécie: *P. whitmani*.

Data da captura: 27-I-40.

Local da captura: Alfredo de Castilho.

Isca: cão.

Alimentação em cão em 27-I-40.

Oviposição: 1-II-40.

N.º de ovos: 24.

Meio de cultura: limo e terra.

Eclosão: 8-II-40.

1.^a muda (2.^o estágio): 13-II-40 a 14-II-40

2.^a " (3.^o "): 17-II-40 a 21-II-40

3.^a " (4.^o "): 21-II-40 a 26-II-40 (16 larvas)

4.^a " (ninfose): 27-II-40 a 6-III-40 (15 pupas)

Emergência dos primeiros adultos: 6-III-40

N.^o de adultos: 14 (5 ♀♀ e 9 ♂♂)

Temperatura durante a experiência { Mn.: 25°C
 { Mx.: 27°C

RESUMO:

Período mínimo de incubação dos ovos 7 dias

Período larval mínimo: 19 dias	}	1. ^o estágio 5 "
		2. ^o " 4 "
		3. ^o " 4 "
		4. ^o " 6 "

Período pupal mínimo 8 "

TOTAL 34 dias

N.^o da fêmea: 265. 1

Espécie: *Phlebotomus whitmani*.

Data da captura: 27-I-40.

Local da captura: Alfredo de Castilho.

Isca: cão.

Alimentação em cão em 27-I-40.

Oviposição: 31-I-40.

N.^o de ovos: 29.

Meio de cultura: limo e terra

Eclosão: 11-II-40.

1.^a muda (2.^o estágio): 18- II-40 a 20- II-40.

2.^a " (3.^o "): 22- II-40 a 27- II-40.

3.^a " (4.^o "): 27- II-40 a 3-III-40 (16 larvas)

4.^a " (ninfose): 7-III-40 a 15-III-40 (9 pupas)

Emergência dos primeiros adultos: 15-III-40.

N.^o de adultos: 9 (6 ♀♀ e 3 ♂♂).

Temperatura durante a experiência { Mn.: 21,0 — 22,8°C
 { Mx.: 22,5 — 24,5°C

RESUMO:

Período mínimo de incubação dos ovos	11 dias
Período larval mínimo: 25 dias	{ 1.º estágio 7 "
	{ 2.º " 4 "
	{ 3.º " 5 "
	{ 4.º " 9 "
Período pupal mínimo	8 "
<hr/>	
TOTAL	44 dias

N.º da fêmea: 265. 4

Espécie: *P. whitmani*

Data da captura: 27-I-40.

Local da captura: Alfredo de Castilho.

Isca: cão.

Alimentação em cão em 27-I-40.

Oviposição: 1-II-40.

N.º de ovos: 42.

Meio de cultura: limo e terra.

Eclosão: 14-II-40.

1.^a muda (2.º estágio): 2-III-40 a 7-III-40.

2.^a " (3.º "): 13-III-40 a 24-III-40.

3.^a " (4.º "): 22-III-40 a 5-IV-40 (21 larvas)

4.^a " (ninfose): 3-IV-40 a 17-IV-40 (18 pupas)

N.º de adultos: 15 (9 ♀ ♀ e 6 ♂ ♂)

Temperatura durante a experiência	Mn.: 17,1 — 18,2°C
	Mx.: 19,8 — 20,2°C

RESUMO:

Período mínimo de incubação dos ovos	17 dias
Período larval mínimo: 40 dias	{ 1.º estágio 11 "
	{ 2.º " 9 "
	{ 3.º " 8 "
	{ 4.º " 12 "
Período pupal mínimo	15 "
<hr/>	
TOTAL	72 dias

Astenobiose

WHITTINGHAN e ROOK (1923), estudando a biologia do *Phlebotomus pappatasi*, verificaram que o ciclo evolutivo dêste flebótomo, do momento da postura ao da eclosão do adulto, pode variar de 24 a 202 dias. A parada da evolução ou a hibernação, segundo aqueles autores, se dá no 4.º estágio e seria devida ao abaixamento da temperatura e ao aumento do teor de humidade do meio. Em temperaturas inferiores a 18,3°C (65° F) e em meios excessivamente húmidos puderam manter larvas em 4.º estágio durante 6 meses estas larvas completavam rapidamente a sua evolução quando colocadas à temperatura de 31,1°C (80° F) e em meios menos húmidos.

ROUBAUD e COLAS-BELCOUR (1927) verificaram que a parada da evolução do *Phlebotomus pappatasi* em 4.º estágio pode ser independente das condições exteriores de temperatura e humidade do meio.

Posteriormente, ROUBAUD (1927 a) mostrou que êste fenómeno de heterodinamia (aparição de gerações de atividade biológica diversa) no *Phlebotomus pappatasi* se apresenta com caracteres bem diferentes do que se observa habitualmente em outros insetos, em particular nos muscídios e nos mosquitos. De fato, nestes a heterodinamia está subordinada a influência das condições mesológicas,

“... les manifestations d’asthenobiose (parada da atividade biológica normal) sont le plus souvent cycliques et surviennent comme l’apanage régulier de certaines générations du cycle annuel de l’espèce...”

No *Phlebotomus pappatasi*, pelo contrário, a astenobiose ou torpor espontâneo independente dos abaixamentos de temperatura é irregular na sua aparição: em uma dada postura, alguns ovos (às vezes a maioria deles) dão origem a larvas ativas que evoluem até a fase do imago em menos de um mês, ao passo que outros ovos, em idênticas condições experimentais, dão origem a larvas que, chegadas no 4.º estágio, atingem o crescimento máximo e têm a sua evolução subitamente interrompida, ao envés de pupar, ficando em estado de torpor durante meses. Trata-se, pois, não de uma hibernação verdadeira, mas de uma pseudo-hibernação.

Estudando o ciclo evolutivo do *Phlebotomus whitmani* em condições experimentais tivemos a oportunidade de observar, além do retardamento da evolução condicionado pelo abaixamento de temperatura, como atrás assinalámos, o fenómeno da astenobiose em larvas no 4.º estágio.

Segundo pudemos deduzir das nossas investigações, aliás pouco numerosas, o *Phlebotomus whitmani* pertence ao tipo fisiológico

dos insetos heterodinâmicos: enquanto certos indivíduos ativos evoluem regular e rapidamente de ovo a imago outros indivíduos da mesma geração, chegados ao 4.º estágio larval, têm a sua evolução subitamente interrompida ficando em estado de torpor durante um período mais ou menos longo. Esta heterodinamia, como no *Phlebotomus pappatasi*, é acíclica, isto é, a astenobiose ocorre irregularmente em alguns indivíduos de uma determinada geração.

Demais, o fenômeno da astenobiose ou torpor espontâneo é relativamente raro e não deve ser confundido com o fenômeno do retardo do desenvolvimento imposto pelos abaixamentos de temperatura, que se observa em tôdas as fases do ciclo evolutivo, desde o período de incubação dos ovos até o período pupal.

No quadro seguinte apresentamos os resultados das nossas observações.

Astenobiose do *P. whitmani*

N.º da experiência	N.º da larva	Data da 3.ª muda (4.º estágio)	Temperatura em que entraram em diapausa	Temperatura durante a diapausa	Data da pupação	Duração da diapausa
I.	(265-1) a	27-2-40	21,0-24,5°C.	18,5-25,5°C.	17-6-40	110 dias
	(265-1) b	" "	" "	" "	20-6-40	113 "
	(265-1) c	" "	" "	" "	26-6-40	119 "
	(265-1) d	" "	" "	" "	não pupou	—
	(265-1) e	" "	" "	" "	29-6-40	121 dias
	(265-1) f	" "	" "	" "	10-7-40	152 "
	(265-1) g	" "	" "	" "	20-7-40	162 "
II	(265-3) a	21-2-40	25-27°C	25-27°C	7-7-40	107 dias
	(265-3) b	" "	" "	" "	13-7-40	113 "
III	(265-5) a	2-3-40	21,0-24,5°C.	18,5-25,5°C.	6-6-40	96 dias
	(265-5) b	" "	" "	" "	12-6-40	102 "
	(265-5) c	" "	" "	" "	13-6-40	103 "
	(265-5) d	" "	" "	" "	19-6-40	109 "
	(265-5) e	" "	" "	" "	não pupou	—
	(265-5) f	" "	" "	" "	30-6-40	120 "
	(265-5) g	" "	" "	" "	15-6-40	136 "
IV	(265-6) a	22-2-40	25-27°C	25-27°C	30-5-40	99 dias
	(265-6) b	" "	" "	" "	4-6-40	103 "
	(265-6) c	" "	" "	" "	13-6-40	112 "
	(265-6) d	" "	" "	" "	29-6-40	123 "
V	(265-10) a	26-2-40	25-27°C	25-27°C	23-8-40	182 dias
	(265-10) b	" "	" "	" "	29-8-40	188 "
	(265-10) c	" "	" "	" "	1-9-40	191 "
	(265-10) d	" "	" "	" "	não pupou	—
	(265-10) e	" "	" "	" "	13-9-40	203 dias
	(265-10) f	" "	" "	18,1-20,2°C.	não pupou	—
	(265-10) g	" "	" "	" "	2-8-40	161 dias
	(265-10) h	" "	" "	" "	21-8-40	180 "
	(265-10) i	" "	" "	" "	29-8-40	188 "
VI	(291-4) a	30-3-40	22,5-25,5°C.	19,0-25,5°C.	31-7-40	123 dias
	(291-4) b	" "	" "	" "	4-8-40	127 "
	(291-4) c	" "	" "	" "	5-8-40	128 "
	(291-4) d	" "	" "	" "	11-8-40	134 "

O exame do quadro anterior mostra que a duração da diapausa pseudohibernal varia de 96 a 203 (3 a 7 meses aproximadamente). A entrada em diapausa parece ser independente da temperatura: larvas criadas tanto em estufa a 25 — 27° (Experiências II, IV e V) como à temperatura do laboratório (Experiências I, III e VI) entram espontaneamente em estado de torpor pseudo-hibernal. A saída da diapausa parece também ser independente da temperatura: larvas astenobióticas conservadas, tanto em estufa a 25 — 27° (Experiências II, IV e V) como à temperatura do laboratório (Experiências I, III e VI), em dado momento recuperaram a sua atividade normal e sofreram a 4.^a muda. Não pudemos confirmar as observações de ROUBAUD (1927 e 1928) que, de suas experiências com o *Phlebotomus pappatasi*, conclue pela necessidade de um abaixamento de temperatura de cerca de 10°C aquém do ótimo (atermobiase) para que a evolução das larvas em diapausa se dê.

Ainda verificámos que a astenobiase parece não estar na dependência do grau de humidade do meio: em igualdade de condições algumas larvas entraram em diapausa enquanto outras evoluíram normalmente. Demais, para a conservação das larvas em astenobiase não é necessária uma humificação intensa do meio e a essiccação (anidrobiase) não é indispensável para a reativação das larvas em diapausa pseudo-hibernal.

Nossas investigações sôbre a astenobiase do *Phlebotomus whitmani* prosseguem e oportunamente resultados definitivos serão apresentados. Desde já, porém, podemos afirmar que a aparição dêste curioso fenômeno, como já assinalára ROUBAUD (1927 a) torna muito irregular a marcha das culturas dos flebôtomos em condições experimentais.

Morfologia dos ovos, larvas e pupas.

Morfologicamente os ovos, as larvas e as pupas do *Phlebotomus whitmani* não diferem dos estádios evolutivos correspondentes do *Phlebotomus intermedius* por nós estudados em trabalho anterior (BARRETTO, 1940). Por esta razão, nos dispensamos de apresentar microfotografias e desenhos.

R E S U M O

Relata o A. os resultados de investigações sôbre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Coutinho, 1939 em laboratório.

Operando em condições diversas de temperatura e humidade obteve para:

Períodos mínimos de incubação dos ovos.....	7 — 12 dias
Períodos larvais mínimos	19 — 44 "
Períodos pupais mínimos	7 — 15 "
<hr/>	
TOTAL	34 — 72 dias

Estuda a influência da temperatura e da humidade sôbre as diferentes fases do ciclo evolutivo e chega à conclusão de que as condições mais favoráveis são: temperatura de 25 — 27°C e humidade do meio visinha do ponto de saturação. Nestas condições verifica para:

Período mínimo de incubação dos ovos	7 dias
Período larval mínimo: 19 dias	{ 1.º estágio 5 "
	{ 2.º " 4 "
	{ 3.º " 4 "
	{ 4.º " 6 "
Período pupal mínimo	8 "
<hr/>	
TOTAL	34 dias

Estuda ainda o fenómeno da astenobiose apresentado pelas larvas em 4.º estágio concluindo que:

- 1) — O *Phlebotomus whitmani* pertence ao tipo fisiológico dos insetos heterodinâmicos.
- 2) — A heterodinamia é acíclica.
- 3) — O fenómeno da astenobiose é pouco frequente.
- 4) — A duração da diapausa pseudo-hibernal varia de 96 a 203 dias.
- 5) — O fenómeno da astenobiose ou torpor espontâneo é independente das condições exteriores de temperatura e humidade.
- 6) — A aparição do torpor espontâneo constitue um impecilho da marcha regular das culturas do flebótomo em condições experimentais.

Assinala, enfim, que a morfologia dos ovos, das larvas e das pupas do *Phlebotomus whitmani* é idêntica à dos estádios evolutivos correspondentes do *Phlebotomus intermedius*.

S U M M A R Y

In this paper, the author gives the results of investigations on the biology of *Phlebotomus whitmani* Antunes & Coutinho, 1939 under experimental conditions.

Operating under various temperature and humidity conditions he obtained for:

Minima incubation periods of eggs	7 — 12 days
Minima larval periods	10 — 44 "
Minima pupal periods	7 — 15 "
<hr/>	
TOTAL	34 — 72 days

He studies the influence of temperature and humidity on the different phases of the evolutive cycle, and verifies that the most favorable conditions are: temperature — 25-27°C, and humidity near saturation limit. Under these conditions, he obtained for:

Minimum incubation period of eggs.	7 days	
Minimum larval period: 19 days	{ 1t. instar	5 "
	{ 2d. "	4 "
	{ 3d. "	4 "
	{ 4th. "	6 "
Minimum pupal period	8 "	
<hr/>		
TOTAL	34 days	

He also studies the phenomenon of asthenobiosis showed by the larvae in the 4th instar and concludes that:

1. — *Phlebotomus whitmani* belongs to the physiological type of heterodynamic insects.
2. — Heterodynamy is acyclic.
3. — The phenomenon of asthenobiosis is unfrequent.
4. — The duration of asthenobiosis varies from 96 to 203 days.
5. — Asthenobiosis is independent of the external conditions of temperature and humidity.
6. — Asthenobiosis embarrasses the normal evolution of cultures of this *Phlebotomus* under laboratory conditions.

Finally, the author shows that eggs, larvae and pupae of *Phlebotomus whitmani* are morphologically similar to the correspondent instars of *Phlebotomus intermedius* Lutz & Neiva, 1912.

B I B L I O G R A F I A

- BARRETTO, M. P. (1940) — Observações sôbre a biologia do *Phlebotomus intermedius* Lutz e Neiva, 1912 (*Diptera, Psychodidae*) em condições experimentais. Ann. Fac. Med. Univ. S. Paulo, 16: 355-369.
- BARRETTO, M. P., e COUTINHO, J. O. (1940) — Processos de captura, transporte, dissecação e montagem de flebôtomos. Ann. Fac. Med. Univ. S. Paulo, 16:
- ROUBAUD, E. (1927a) — L'hétérodynamie et le role de l'athermobiose dans le cycle évolutif de *Phlebotomus pappatasi*. Bull. Soc. Path. Exot., 20: 613-619.
- ROUBAUD, E. (1927b) — Sur libération de quelques mouches communes. Bull. Soc. Ent. France, n.º 2, pp. 24-25. (in R. A. E., 15: 85-86, 1927).
- ROUBAUD, E. (1927c). — Les formes diverses de l'hétérodynamie chez les insectes à plusieurs générations. Bull. Soc. Ent. France, n.º 4, p. 61-64, (in R. A. E., 16: 56-57, 1928).
- ROUBAUD, E. (1928) — Longue durée de l'asthénobiose pseudo-hivernal chez *Phlebotomus pappatasi*; action réactivant de l'athermobiose prolongée. Bull. Soc. Path. Exot., 21: 107-108.
- ROUBAUD, E., et COLAS-BELCOUR, J. (1927) — Recherches biologiques sur le Phlébotomes de la Tunisie du Nord. Méthode d'isolement cellulaire pour l'éducation sélectionnée des espèces. Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 16: 59-80.
- WHITTINGHAM, H. E., and ROOK, A. F. (1923) — Observations on the life history and bionomics of *Phlebotomus pappatasi* Scop., Brit. Med. J., 2: 1144-1151.

