

PARASITISMO EN LARVAS DE SIMULIDOS (Diptera: Simuliidae) DEL RIO TEUSACA: MICROSPORIDIOS, MERMITIDOS Y HONGOS*

por

Orlando Torres Fernández**, Paulina Muñoz de Hoyos***,
Gloria Romero de Pérez****

Resumen

Torres, O., Muñoz de Hoyos, P. y G. Romero de Pérez: Parasitismo en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) del río Teusacá: Microsporidios, mermítidos y hongos. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 18 (69): 253-264, 1991. ISSN 0370-3908.

Con el propósito de estudiar las infecciones por microsporidios y otros entomopatógenos en simúlidos se recolectaron y examinaron 4.292 larvas de este grupo de dípteros, del Río Teusacá, La Calera, Cundinamarca, Colombia, a 2950 m de altitud, entre los meses de marzo a julio de 1987. *Simulium ignescens* Roubaud, 1906 se encontró parasitada por el microsporidio *Polydispyrenia simulii* (Lutz y Splendore, 1908) Canning y Hazard, 1982, el hongo *Coelomycidium simulii* Debaisieux, 1919 y nemátodos de la familia Mermithidae. *Simulium muiscorum* Bueno, Moncada y Muñoz de Hoyos, 1979 es afectado por mermítidos y *Gigantodax ortizi* Wygodzinsky, 1973 por microsporidios. La incidencia del parasitismo en larvas de *S. ignescens* fue para mermítidos 9.1%, *P. simulii* 3.6% y *C. simulii* 1.7%. La frecuencia de mermítidos en *S. muiscorum* fue muy baja (0.9%), lo mismo que la microsporidiosis en *G. ortizi* (0.33%). Se amplía la distribución biogeográfica de *P. simulii* y *C. simulii* en la región neotropical.

Abstract

In order to study the microsporidian infection and other entomopathogens in simuliids, 4292 larvae were collected and examined between March and July 1987. *Simulium ignescens* was infected with the microsporidium *Polydispyrenia simulii*, (3.6%), the fungus *Coelomycidium simulii* (1.7%) and mermithids (9.1%), *S. muiscorum* was affected by mermithids (0.9%) and *Gigantodax ortizi* by microsporidia. *Polydispyrenia simulii* and *Coelomycidium simulii* are recorded for the neotropical region.

Introducción

Desde que Rodolfo Robles descubrió en 1919 que los simúlidos son los vectores de la oncocercosis, se iniciaron campañas para erradicarlos utilizando toda clase de sustancias tóxicas.

Inicialmente se emplearon aceites, hidrocarburos, ácidos, detergentes y piretroides. Sin embargo, fue sólo hasta la aparición del DDT que el control de los simúlidos se hizo más práctico y su uso se extendió tanto a las zonas afectadas por oncocercosis humana, como a las regiones en donde los si-

múldidos han provocado graves pérdidas a la ganadería o han afectado seriamente otras actividades del hombre.

La resistencia adquirida por los simúldidos al DDT, estimuló el desarrollo de pruebas de laboratorio y posteriores aplicaciones en el campo de una gran diversidad de sustancias: metoxiclor, Abate, Dursban, fenitotrión y carbaril, entre otros. Este uso indiscriminado no tardó en provocar problemas en los ecosistemas de las corrientes de agua, lugar donde se vierten los insecticidas, por ser éste el sitio de cría de los estadios inmaduros de los simúldidos.

A pesar de los efectos nocivos de los insecticidas químicos, durante mucho tiempo siguieron siendo el único método de control de simúldidos. Así en 1974, se inició un programa de erradicación de simúldidos vectores de oncocercosis en Africa Occidental, mediante la aplicación de algunos de los compuestos antes mencionados. Sin embargo, los vectores han desarrollado resistencia a los químicos a tal punto que son pocas las sustancias aún utilizables. Esto ha obligado a intensificar las investigaciones con el propósito de acudir a nuevos métodos de control. Una de las alternativas probables es el control biológico ejercido por los entomopatógenos. Entre los grupos de patógenos más importantes de simúldidos están los microsporidios, los nemátodos y los hongos.

El parasitismo en larvas de simúldidos, presentado en este trabajo, es el primer informe que se hace en Colombia con este grupo de insectos. Se realiza un estudio preliminar sobre diagnóstico e incidencia de infecciones en larvas de simúldidos recolectadas en la región de La Calera, Cundinamarca. Se describen las características que permiten detectar las infecciones en las larvas recolectadas en el campo. Se analiza la incidencia de microsporidiosis, nemátodos de la familia Mermithidae y un hongo de la clase Chytridiomycetes.

Con este trabajo se pretende llamar la atención, en particular a los entomólogos que trabajan en control biológico, para realizar estudios similares en otras plagas y vectores. Para la aplicación de

enemigos naturales en biocontrol de insectos perjudiciales conviene, inicialmente, adquirir conocimientos básicos sobre los entomopatógenos y sus relaciones con el huésped en su medio natural.

Revisión de literatura

Patógenos en simúldidos. Los primeros estudios sobre entomopatógenos en simúldidos se realizaron en Europa (Léger, 1897; Debaisieux, 1919 a, b, 1926; Debaisieux & Gastaldi, 1919), en Brasil (Lutz & Splendore, 1904) y Norteamérica (Strickland, 1911, 1913). Weiser en 1964 presenta un resumen de lo conocido hasta entonces sobre parasitología en simúldidos y, en 1981, Weiser, Undeen y Poinar, hacen una extensa revisión sobre el tema.

Los principales grupos de patógenos que afectan a las especies de la familia Simuliidae son Microspora, Nematoda y Phycomyces.

Microsporidios. Son organismos unicelulares pertenecientes al phylum Microspora (Sprague, 1977; Levine et al., 1980) y parásitos intracelulares obligados. Solamente la espora madura puede permanecer fuera de la célula, en las cavidades del cuerpo del huésped, o en el medio ambiente exterior en estado latente. Por tratarse de protozoarios que desarrollan esporas, hasta hace algunos años se clasificaron como un orden de la clase Sporozoa (Westphal, 1977).

La espora inyecta su esporoplasma en la célula huésped utilizando el filamento polar. El esporoplasma crece, madura y adquiere una forma esférica, para dar lugar al meronte. Mediante cariogamia el meronte da origen al plasmodio merogonial y posteriormente por esquizogonia o plasmotonia se liberan los merozoitos. Cada uno de estos madura hasta llegar a ser un esporonte, el cual, por división nuclear y aumento de tamaño, da lugar al plasmodio esporogonial y éste a los esporoblastos, dentro de una membrana, formando la vesícula esporofórica (pansporoblasto o vacuola parasitófora). La membrana es secretada por el parásito, no es una membrana de tipo celular. En los trabajos de Loubès (1979 a, b) y Larsson (1986a) se detalla el ciclo de vida.

En los diversos grupos de Microspora se presentan modificaciones en las diferentes etapas del ciclo de vida. Entre las más importantes se encuentran: presencia o ausencia de núcleos dobles (diplocarióticos) durante la fase merogonial o durante todo el ciclo de vida; presencia o ausencia de vesícula esporofórica; número de esporoblastos producidos a partir de un esporonte y número de esporas producidas en cada vesícula esporofórica.

La espora ha sido la estructura más estudiada, por ser la más fácil de encontrar y preservar y por presentar mejores características contrastantes para taxonomía (Larsson, 1986ab). Huger (1960) efectuó el primer estudio satisfactorio de la ultraestruc-

* Estudio incluido dentro del Programa de Investigación "Biología de los Simúldidos de Colombia" financiado por COLCIENCIAS y la Universidad Nacional de Colombia. Proyecto financiado por el CINDEC.

** Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, D.E. Dirección actual: Instituto Nacional de Salud, Sección de Diagnóstico, Investigación y Referencia, Grupo de Patología. Autopista El Dorado Carrera 50, Santafé de Bogotá.

*** Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales, Apartado 7495, Santafé de Bogotá.

**** Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Apartado 23227, Santafé de Bogotá.

tura de la espora y decifra la composición de la estructura de la misma.

Las infecciones por microsporidios se pueden transmitir mediante la ingestión de las esporas por vía oral (transmisión horizontal) o por hembras infectadas que transmiten el patógeno en los huevos (transmisión vertical) (Larsson, 1986a).

Microspora parasita diferentes órganos y tejidos, según el huésped. Las infecciones que afectan el tracto digestivo producen la muerte del insecto por inanición (Liu, 1984a). Los microsporidios que atacan el tejido graso de la larva impiden su metamorfosis hasta la fase adulta debido a la producción de una sustancia de acción juvenilizante (Fisher & Sanborn, 1962). Las microsporidiosis en insectos también provocan disminución de la fecundidad, frecuencia de apareamiento (Amstrong & Bass, 1986) y reducción del consumo de alimentos en insectos fitófagos (Johnson & Pavlikova, 1986). La acción patogénica de microsporidios en insectos es analizada por Weiser (1970), Brokks (1971) y Henry (1981). Las infecciones en larvas de simúlidos se detectan con facilidad. El abdomen se hipertrofia con grandes masas globulares blancas, visibles a través de la pared del cuerpo.

La importancia de los microsporidios se debe a su patogenicidad, facilidad de dispersión y cierto rango de especificidad, lo mismo que su capacidad de permanecer indefinidamente en una población. Por esto son ideales para ser empleados en control biológico de insectos de importancia médica y económica (McLaughlin, 1971; Henry, 1981). En el trabajo de Torres (1988) se incluye una revisión general sobre diferentes aspectos de los microsporidios y de aquellos que se han encontrado como patógenos de los simúlidos.

Nemátodos de la familia Mermithidae se mencionan en las primeras observaciones efectuadas por Strickland (1911). Desde entonces, se han realizado varios estudios sobre mermítidos, pero sólo hasta comienzos de los años sesenta se han hecho las primeras descripciones válidas de especies de mermítidos parásitos de simúlidos (Welch, 1962). Anderson y De Foliart (1962) logran, por primera vez, obtener adultos de los nemátodos mediante cultivos en laboratorio, facilitando así los estudios taxonómicos.

Los mermítidos son nemátodos largos y delgados que viven como parásitos en la cavidad corporal de los invertebrados durante su estado juvenil. Durante el resto de su ciclo de vida tienen vida libre. El ciclo de vida de los mermítidos incluye 5 estados y 4 mudas: huevo, estado juvenil preparásitico, estado juvenil parasítico, estado juvenil post-parasítico y estado adulto. El huevo se adhiere a objetos dentro de las corrientes de agua, eclosionando dando lugar a la fase preparásitica, gusano muy pequeño y delgado, el cual penetra en la larva huésped y crece dentro del hemocele, acumulando

reservas energéticas. Luego emerge a través del cuerpo de la larva, la cual pierde sus fluidos internos y muere. La fase parasítica se encuentra con mayor frecuencia, debido a la facilidad de detectar el nemátodo enrollado dentro de la parte posterior del abdomen de la larva. Este generalmente es de color blanco, muy largo y delgado. La fase postparasítica se desarrolla libre dentro del agua, sin alimentarse y sufre mudas hasta alcanzar la madurez, aparearse y reiniciar el ciclo (Poinar, 1981).

Generalmente los mermítidos de simúlidos afectan las larvas. Sin embargo, también se pueden encontrar en las pupas y adultos. Esto puede ser importante para mantener el parásito en la población, teniendo en cuenta que las corrientes pueden arrastrar las etapas de vida libre (Welch, 1964).

El parásito se desarrolla dentro de la larva del insecto a expensas de la hemolinfa, induciendo además alteraciones en el sistema endocrino y provocando una marcada reducción del tejido adiposo (Condon & Gordon, 1977). Según Rubtsov (citado por Welch, 1965), el desbalance hormonal puede dar origen a intersexos que en ocasiones se han registrado como nuevas especies. En las hembras parasitadas se atrofian los ovarios y se reduce la longevidad (Poinar, 1981).

Experimentalmente se han inducido infecciones por otros nemátodos, no naturales de los simúlidos, tales como la especie *Romanermis culicivora* (Finney & Mokry, 1980) y *Neoplectana carpocapsae* (Molloy et al., 1980). Así mismo, ha sido posible infectar larvas de mosquitos con un mermítido característico de simúlidos (Curran, 1982). Estos resultados son valiosos para futuras investigaciones sobre control de simúlidos y mosquitos mediante nemátodos. El potencial de utilización de mermítidos en el control de simúlidos ha sido ampliamente analizado por Gordon et al. (1973) y Finney (1981).

Para la identificación de mermítidos parásitos de simúlidos se requieren características tanto de la fase parasítica como de los adultos obtenidos en cultivo de laboratorio (Welch, 1962, Mondet et al., 1977a, b). Poinar (1981) y Rubtsov (1981) hacen una revisión, muy completa, sobre la biología y la taxonomía de los mermítidos parásitos en especies de la familia Simuliidae.

Hongos. Un tercer grupo de patógenos importantes en simúlidos lo constituyen los hongos Phycomyces, siendo el más importante de ellos *Coomycidium simulii* Debaisieux, 1919a. No se conocen detalles de la transmisión de este patógeno ni datos completos de su historia natural. Hasta el momento se cree que este hongo aparece únicamente en la fase larvaria de los simúlidos. Allí se observa formando numerosas esferas blancas, muy pequeñas, que invaden internamente todo el cuerpo de la larva. Estas estructuras son los esporangios, los cuales al morir la larva, liberan zoósporas unifica-

geladas. Estas, según Lacey y Undeen (1978), no infectan directamente a las larvas sanas, se sospecha que debe existir otro huésped intermediario involucrado en la transmisión del hongo.

El desarrollo del patógeno se lleva a cabo a expensas de los tejidos de la larva; el hongo secreta enzimas que disuelven el cuerpo graso y posteriormente el tejido muscular, las glándulas salivares, los túbulos de Malpighio y otros órganos hasta que sólo permanecen porciones cuticulares del cuerpo de la larva (Weiser & Undeen, 1981). La larva no completa su metamorfosis ya que la infección previene además, la maduración de las gónadas. Maurand y Manier (1968) describen aspectos histopatológicos de las infecciones por *C. simulii*.

Undeen y Nolan (1977) descubren un singular hongo Phycomycete, que se caracteriza por destruir el ovario en las hembras adultas de los simúlidos y remplazarlo por un masivo número de esporas. Estas son liberadas por la mosca negra al momento de la oviposición (Undeen, 1978; Yeboah et al., 1984).

Otros patógenos. Se conocen tres grupos de virus patógenos de simúlidos: virus iridiscentes (IV), virus de la polihedrosis citoplasmática (CPV) y los virus de la denonucleosis (DV) (Weiser & Undeen, 1981). Los IV son los más frecuentes; Weiser (1986) descubrió el primer caso en Checoslovaquia en larvas del complejo *S. ornatum*. Los informes más recientes son publicados por Avery y Bauer (1984), Batson (1986), Erlandson y Mason (1990).

Debido a la resistencia a los insecticidas químicos desarrollada por los simúlidos, especialmente en Africa en donde la oncocercosis constituye un grave problema de salud pública, se ha estado utilizando en los últimos años un insecticida microbiano, elaborado con *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Guillet, 1984). Esta cepa, cuyos huéspedes naturales son los mosquitos, ha resultado de gran efectividad como larvicida de simúlidos. Este tema es minuciosamente revisado por Lacey y Undeen (1986).

Materiales y Métodos

Recolección y transporte del material biológico. Se recolectaron larvas de simúlidos en el río Teusacá, municipio de la Calera (Cundinamarca), vereda El Hato, en predios del caserío La Choza del Río a 2.950 m.s.n.m. Se hicieron muestreos preliminares en septiembre-diciembre de 1986 y febrero de 1987. Las recolecciones para el estudio de la incidencia de los patógenos se realizaron con una periodicidad aproximada de 40 días entre marzo y julio de 1987. Los ejemplares se trasladaron vivos al laboratorio, dentro de frascos de boca ancha con agua del río.

Selección y procesamiento del material biológico. Se seleccionaron, con ayuda de un estereos-

copio, las larvas infectadas con patógenos. Se identificaron todas las larvas recolectadas con base en las claves elaboradas para simúlidos de la región de La Calera (Moncada & Bueno, 1977; Muñoz de Hoyos et al., 1984).

Larvas infectadas con hongos y microsporidios se procesaron para microscopía electrónica de transmisión y microscopía de luz convencional. Además, se hicieron frotis frescos de tejido infectado con microsporidios para observación en contraste de fase. Los procedimientos se describen en Torres (1988).

Para observación de nemátodos, algunos de ellos se liberaron de larvas infectadas, se colocaron en agua caliente a 60°C, se extendieron sobre láminas y se colorearon con solución de Giemsa. Otros ejemplares se dejaron en cultivo en cajas de petri con agua del río a 18°C para obtener los adultos.

La identificación de los patógenos se hizo utilizando claves (Weiser & Briggs, 1971; Hazard et al., 1981; Larsson, 1983 d) y demás bibliografía citada para los diferentes grupos.

El material destinado para estudiar la incidencia por patógenos se conservó en etanol 70% a una temperatura de 4°C.

Resultados y Discusión

En el área de muestreo se hallaron tres especies de simúlidos: *Simulium ignescens* Roubaud, 1906; *S. musicorum* Bueno, Moncada & Muñoz de Hoyos, 1979 y *Gigantodax ortizi* Wygodzinsky, 1973, siendo *S. ignescens* la especie predominante (Tabla 1).

Tabla 1

Relación de larvas recolectadas y examinadas

Fecha	<i>S. ignescens</i>	<i>S. musicorum</i>	<i>G. ortizi</i>	Total
III - 19 - 87	497	107	43	647
IV - 27 - 87	595	31	96	722
VI - 6 - 87	400	141	32	573
VII - 22 - 87	1940	278	132	2.350
Total	3.432	557	303	4.292
Porcentaje	80%	13%	7%	100%

Microsporidiosis

***Simulium ignescens*.** La infección en larvas de *S. ignescens* se manifiesta por la aparición de masas globulares de color blanco en el abdomen (Fig. 1). Estas estructuras también denominadas quistes o xenomas (Sprague & Vernick, 1968), corresponden a lóbulos del tejido graso invadidos por el parásito. En sección, el xenoma con infección avanzada (Fig. 2) se caracteriza por una marcada zonación. Hacia el centro del lóbulo se localizan grupos de esporas

maduras, mientras que hacia la periferia se encuentran estados más jóvenes los cuales colorean con menor intensidad.

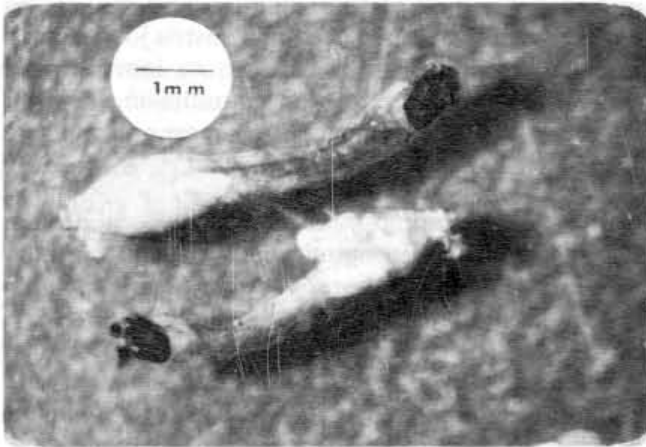


Figura 1. Larvas de *Simulium ignescens* infectadas con *Microspora*. Observense los xenomas dentro del abdomen.

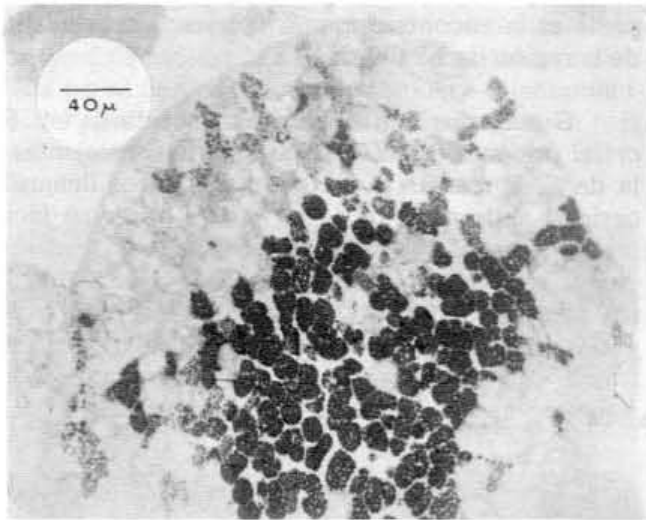


Figura 2. Sección semifina de un xenoma de la microsporidiosis en *Simulium ignescens*. Las esporas maduras se localizan hacia el centro del lóbulo. Los estados más jóvenes se hallan en la periferia. — Azul de Toluidina.

Xenomas como los observados en esta especie son propios de la microsporidiosis en simúlidos, con excepción de *Octosporea simulii* Debaisieux, 1926 que afecta únicamente el epitelio intestinal de la larva infectada. Maurand (1973) describe tres tipos de xenomas para microspora en simúlidos: 1) Xenomas con marcada diferenciación centrípeta del parásito, encerrados dentro de una membrana basal muy delgada. 2) Xenomas con maduración centrípeta del parásito compuesto por tres zonas, la más externa constituida por citoplasma de la célula huésped y 3) Xenomas en donde los diferentes estados del parásito se disponen indistintamente dentro del lóbulo y por lo tanto no se presenta diferenciación centrípeta. El tipo de xenoma observado en *S. ignescens* corresponde al del grupo 1, es decir, el tipo de xenoma que distingue a la especie *Polydispyrenia simulii* (Maurand, 1973).

Las larvas de *S. ignescens* infectadas con microsporidios presentan etapas avanzadas del desarrollo del parásito, correspondientes a la fase esporogonial (Figs. 3 y 4). Una característica importante es la agrupación de esporas maduras en estructuras semejantes a una mórula. El número de esporas que encierra cada una de ellas es irregular, por lo general superior a 32.

En general, las infecciones por microsporidios solo se hacen evidentes durante la esporogonia, como en este caso, debido a la corta duración de la fase merogonial. La fase esporogonial es de mayor duración, se conserva mejor y facilita la detección de la infección a partir de material de campo (Larsson, 1986a).

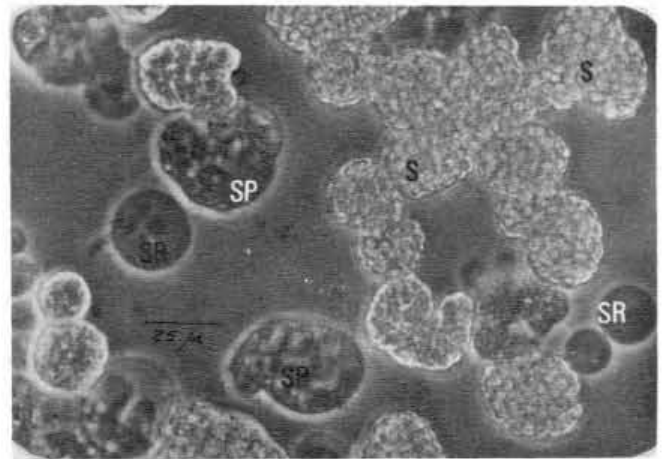


Figura 3. Diferentes etapas de la fase esporogonial de *Polydispyrenia simulii*, patógeno de *Simulium ignescens*. SR: Esporontes, SP: Esporoblastos, S: Esporas maduras. Los dos últimos dentro de vesículas esporofóricas. Contraste de fase.

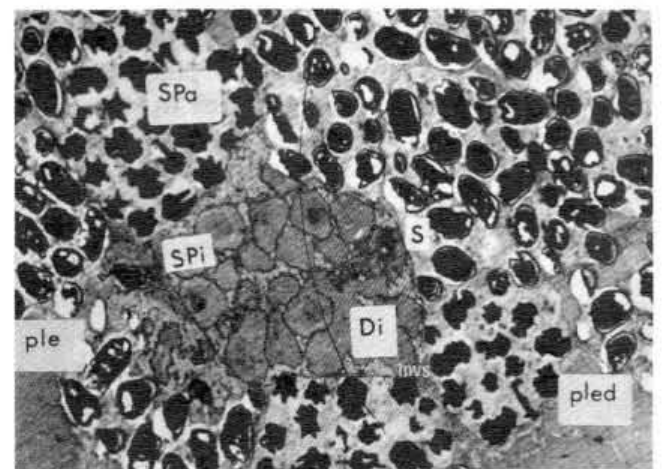


Figura 4. Electromicrografía de *Polydispyrenia simulii* hallado en *Simulium ignescens*. Se observan diferentes etapas de la esporogonia. ple: Plasmodio esporogonial. pled: plasmotomía. SPi: Esporoblastos jóvenes. SPa: Esporoblastos avanzados. S.: Esporas maduras. mvs: Vesícula esporofórica. Di: P Plasmodio esporogonial. 2.666 X.

Es más fácil estudiar la fase merogonial en colonias de laboratorio por inoculación de esporas y el posterior seguimiento del desarrollo del proto-

zoario, mediante procedimientos similares al utilizado por Muñoz de Hoyos (1972) en microsporidios de *Rhynchosciara angelae* (Diptera: Sciaridae). Sin embargo, la dificultad para colonizar simúlidos en el laboratorio (Mokry et al., 1981) no ha permitido emplear esta metodología. Algunas veces es posible encontrar estados de la fase merogonial en material de campo, pero estos no se observaron en el microsporidio de *S. ignescens* durante el curso de esta investigación.

La agrupación de esporas dentro de vesículas esporofóricas es una característica muy importante para la taxonomía de Microspora. Igualmente, el número de esporas que encierra la vesícula esporofórica es utilizado como carácter taxonómico de gran valor. Sprague (1977) revive la familia Pleistophoridae Stempell, 1909 para incluir en ella microsporidios que tienen un gran e irregular número de esporas encerradas dentro de una membrana, como las que se observan en el microsporidio de *S. ignescens*. De los microsporidios patógenos de simúlidos sólo se conoce una especie de la familia Pleistophoridae, a saber: *Polydispyrenia simulii*.

En la Fig. 5 se observan esporas aisladas mediante maceración de la vesícula esporofórica. La espora fresca es de forma oval-piriforme, mientras que la espora fijada en etanol es ovalada debido a un ligero achatamiento del extremo anterior de la espora por la deshidratación. Las dimensiones de la espora son 5μ de longitud por 3μ de diámetro en promedio ($n = 50$).

La forma ovoide de la espora así como las dimensiones de la misma, coinciden con los datos señalados para *Polydispyrenia simulii*, por diferentes investigadores (Maurand, 1975; Vavra & Undeen, 1981; Weiser & Undeen, 1981). Sin embargo, estas características se deben tener en cuenta sólo como datos complementarios, pues otras especies podrían ser semejantes en estos aspectos. Además, el tamaño de la espora puede variar ligeramente de un huésped a otro. Esto se ha establecido en *Polydispyrenia simulii* (Vavra & Undeen, 1981).

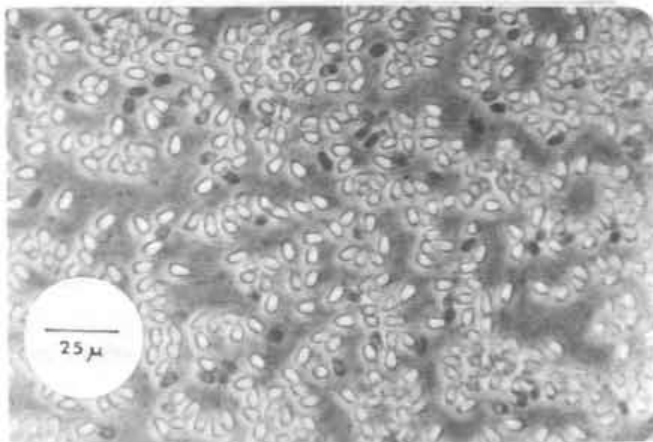


Figura 5. Esporas libres de *Polydispyrenia simulii* encontrado en *Simulium ignescens*. Frotis fresco observado en contraste de fase.

Diferentes etapas de la fase esporogonial se aprecian en la Fig. 4, así como la agrupación de esporoblastos y esporas dentro de la membrana de la vesícula esporofórica. El plasmodio esporogonial se divide por plasmotomía (fragmentación sucesiva) para dar origen a esporoblastos jóvenes. Los esporoblastos avanzados reducen su tamaño y adquieren un color oscuro por acumulación de quitina y finalmente se transforman en esporas maduras (Fig. 4).

Según Canning y Hazard (1982) la división del plasmodio esporogonial por plasmotomía, se presenta en *Pleistophora* y *Polydispyrenia*, mientras que en *Vavraia* el plasmodio se divide por esquizogonia. Estos son los tres géneros que conforman la familia Pleistophoridae, pero *Pleistophora* se considera actualmente como género característico de vertebrados (Canning & Lom, 1986).

Las características morfológicas del microsporidio patógeno de *S. ignescens* concuerdan ampliamente con aquellas de la especie *Polydispyrenia simulii*, por lo tanto se puede asegurar que esta especie es la encontrada en *S. ignescens* proveniente de la región de La Calera.

Gigantodax ortizi. La microsporidiosis en *G. ortizi* presenta características externas semejantes a la de *S. ignescens*. Los xenomas blancos llenan la cavidad abdominal de la larva y se observan fácilmente a través de la cutícula del huésped. Las secciones semifinas permiten apreciar la distribución irregular (no centripeta) del patógeno dentro del xenoma (Fig. 6). La espora es marcadamente piriforme, diferente a la forma ovalada encontrada en *S. ignescens* y un poco más grande que ésta.

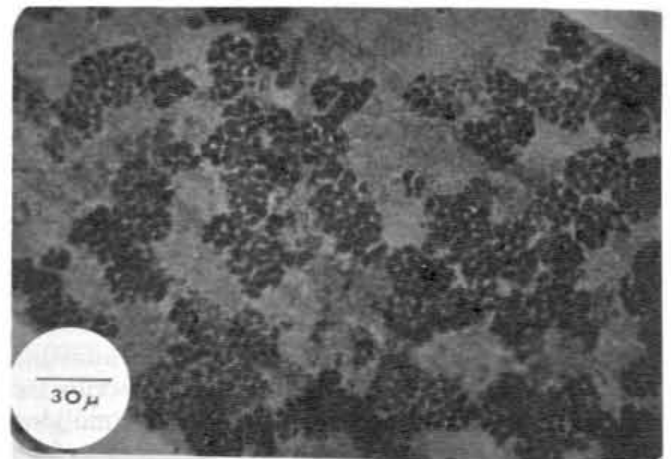


Figura 6. Sección de un xenoma del microsporidio hallado en *Gigantodax ortizi*. La distribución de los diferentes estados del patógeno es irregular. Se nota la tendencia al agrupamiento de las esporas maduras. Las zonas claras corresponden a estados más jóvenes. — Azul de Toluidina.

La ubicación taxonómica de este microsporidio está en estudio. Próximamente se publicarán detalles de la ultraestructura, tanto de *P. simulii* como de esta posible nueva especie. Con las observaciones realizadas, por ahora, se puede afirmar que

ésta exhibe las características propias de los miembros de la familia Pleistophoridae, en particular, la agrupación de un gran número de esporas dentro de una vesícula esporofórica que se forma a partir del mismo protozoario.

S. muiscorum. No se detectó microsporidiosis en esta especie.

Nemátodos

Se encontraron nemátodos parásitos en larvas de *S. ignescens* y *S. muiscorum*. No se hallaron en *G. ortizi*. Estos parásitos se localizan enrollados dentro de la parte posterior del abdomen de la larva (Fig. 7), aunque en ocasiones se estiran y ocupan todo el hemocele a lo largo del huésped. Al extraer cuidadosamente el nemátodo mediante disección, es notoria la ausencia de los cuerpos grasos de la larva parasitada. Fuera de la larva se contemplan como largos y delgados hilos blancos (Fig. 8). Su longitud alcanza 20 a 25 mm y su diámetro 0.1 mm. La cabeza, observada al microscopio, muestra un esófago muy largo y delgado, sin musculatura aparente. En una larva parasitada de *S. ignescens* fue posible inducir la salida del mermítido a través de la pared corporal, mediante un leve calentamiento del agua y la adición de etanol y formol en baja concentración.

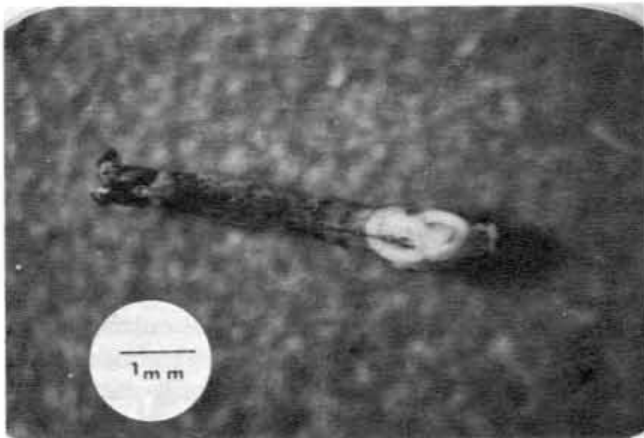


Figura 7. Larva de *Simulium ignescens* parasitada por un mermítido.

Moncada y Bueno (1977) informan sobre nemátodos parásitos en larvas de *S. ignescens* y *S. muiscorum*. No los mencionan para *G. ortizi*, ni para otras especies de simúlidos de la región de La Calera. Estos datos coinciden con los hallados en la presente investigación. De acuerdo con las claves de Weiser y Briggs (1971) y la bibliografía citada sobre nemátodos entomofílicos, los parásitos hallados en *S. ignescens* y *S. muiscorum* pertenecen a la familia Mermithidae.

Debido a que la taxonomía de los mermítidos se fundamenta en características sexuales de los adultos (Poinar, 1981), es necesario cultivar los parásitos en laboratorio, hasta obtener adultos de ambos sexos, para lo cual se han diseñado varios siste-

mas (Finney, 1981). En el presente trabajo no fue posible determinar los mermítidos a nivel de género, debido a que con el cultivo solamente se obtuvieron dos hembras aún sin completar la madurez y no se obtuvieron machos. Los mermítidos constituyen otro importante grupo de enemigos naturales de los simúlidos. La posibilidad de cultivarlos en laboratorio los hace candidatos a ser utilizados en programas de control de estos insectos (Finney, 1981).

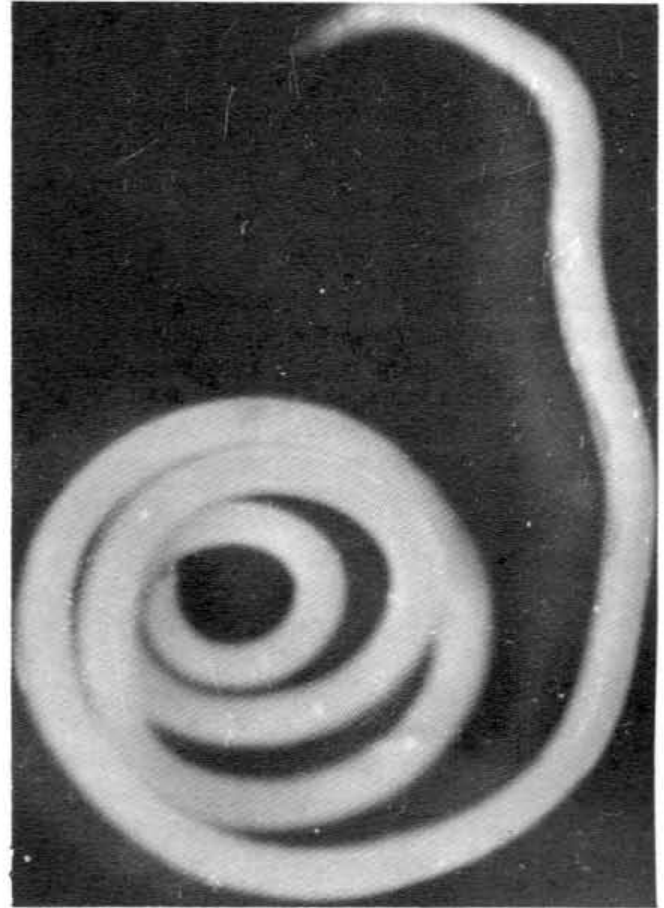


Figura 8. Estado juvenil postparasítico del mermítido parásito de *Simulium ignescens*.

Hongos

En el material examinado se encontraron frecuentemente hongos que invaden con su micelio el cuerpo de larvas moribundas o muertas. Sin embargo, a estos hongos no se les considera patógenos por no ser los responsables primarios de la muerte de las larvas; pertenecen, en su mayoría, a la familia Entomophthoraceae (Zygomycetes) (Weiser, 1964; Weiser & Briggs, 1971).

Solamente se halló un hongo en *S. ignescens*. La larva infectada presentó pequeñas esferas blancuzcas por todo el cuerpo, haciéndose visibles a través de la cutícula (Fig. 9). Estas estructuras corresponden a los esporangios del patógeno que ocupan toda la cavidad y disuelven los tejidos internos. Aparentemente el tubo digestivo y la cutícula no parecen afectados (Fig. 10). En la Fig. 11 se aprecian, en sección fina transversal, las estructuras

esféricas o esporangios que llenan la cavidad del cuerpo de la larva. Dentro de ellos se distinguen numerosos núcleos con gránulos de cromatina dispersos. La organización interna de estos esporangios es de tipo plasmodial.

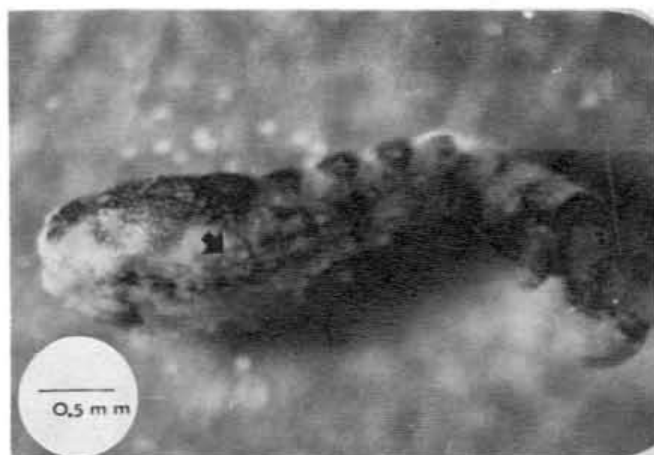


Figura 9. Larva de *Simulium ignescens* infectada con *Coelomycidium simulii*. La flecha señala los esporangios.

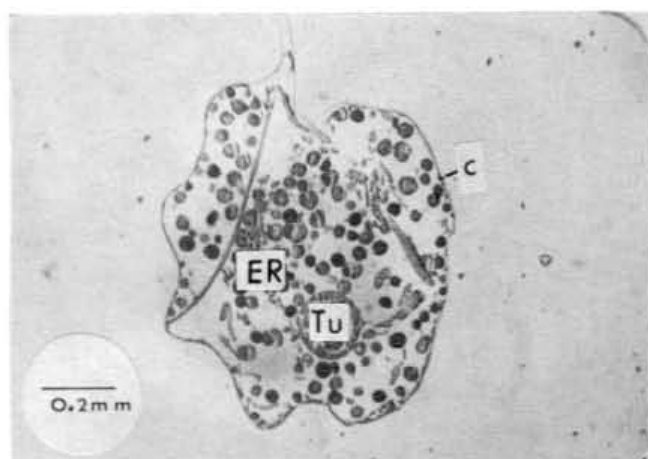


Figura 10. Sección transversal de una larva de *Simulium ignescens* infectada con *Coelomycidium simulii*. Los esporangios (ER) invaden la cavidad interna, conservándose el tubo digestivo (Tu) y la Cutícula (c). Hematoxilina-Eosina.

De acuerdo con las claves para hongos (Weiser & Briggs, 1971) el hongo hallado en larvas de *S. ignescens* corresponde a la especie *Coelomycidium simulii* (Chytridiales: Coelosporidiidae).

La separación de núcleos mediante membranas, que se ve en la Fig. 12, se puede relacionar con las observaciones de Loubès y Manier (1974) quienes señalan que al iniciarse la diferenciación de las zoósporas, los núcleos del plasmodio se alargan y mediante anastomosis de las vesículas del retículo endoplasmático, se originan las membranas que individualizan las zoósporas.

Con excepción del trabajo de Loubès y Manier (1974) se tiene muy poca información sobre la ultraestructura de *C. simulii*. Weiser y Zizka (1969) aseguran que se presentan ligeras diferencias morfo-

lógicas entre razas del hongo provenientes de diferentes regiones.

Puesto que el patógeno es cosmopolita (aunque no infecta todas las especies de simúlidos) es posible que estudios ultraestructurales comparativos de muestras del hongo tomadas en diferentes regiones biogeográficas, conduzcan a la descripción de especies distintas. Dubitskii (citado por Weiser & Undeen, 1981) halló "cepas aberrantes" de un hongo similar a *C. simulii*, en una región de Asia Central.

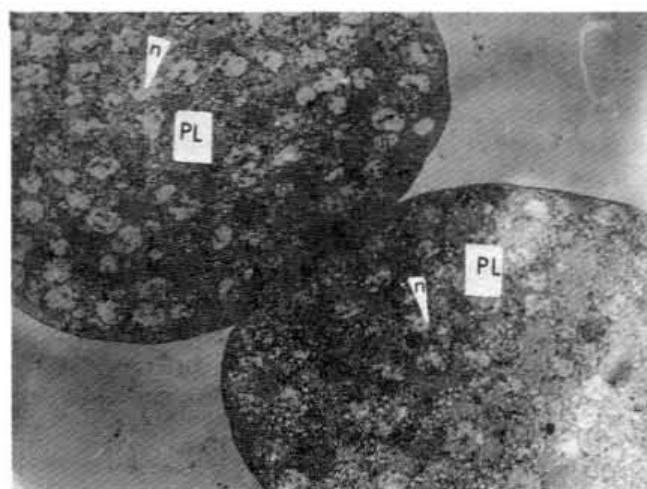


Figura 11. Electromicrografía de plasmodios (PL) de *Coelomycidium simulii* hallado en *Simulium ignescens*. Los núcleos (n) contienen gránulos de cromatina dispersa. 1130 x.

Según Nolan (1981) *C. simulii* es uno de los microorganismos que presenta grandes perspectivas para biocontrol de simúlidos. Ha sido cultivado "in vitro" utilizando diferentes medios para cultivo de tejidos, aunque sin la producción de zoósporas. El perfeccionamiento de las técnicas de cultivo "in vitro" para la producción masiva del hongo, haría posible la utilización de este enemigo natural en control biológico de simúlidos.

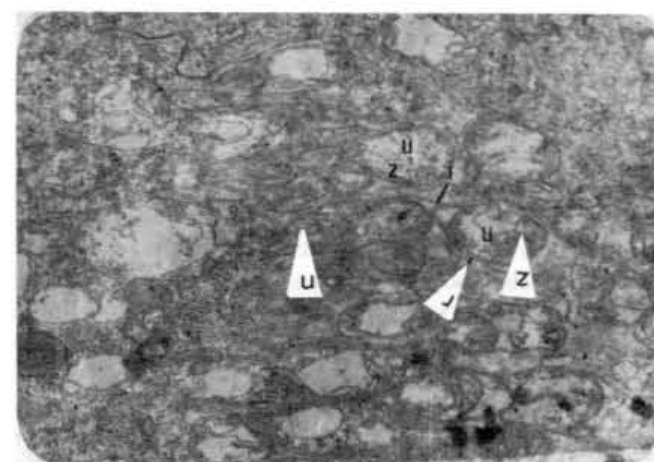


Figura 12. Detalle de la posible diferenciación de zoósporas de *Coelomycidium simulii* de *Simulium ignescens*. z: Zoóspora, n.: Núcleo, r: Membrana formada a partir del retículo endoplasmático. 12.000x.

Incidencia del parasitismo

Las tres especies de simúlidos encontradas en el sitio de estudio presentan algún tipo de parasitismo. Sin embargo, sólo *S. ignescens* es afectado por microsporidios, nemátodos y hongos. Es importante anotar que no se observaron larvas afectadas por 2 o más parásitos simultáneamente. La incidencia comparada de los tres grupos de patógenos se evidencia en la Tabla 2.

Tabla 2.

Incidencia del parasitismo en larvas de *S. ignescens*, *S. muiscorum* y *Gigantodax ortizi*

Hospedero	No. larvas examinadas	Mermithidae	Microspora	<i>Coelomyxium simulii</i>
<i>S. ignescens</i>	3.432	311 (9.1%)	124 (3.6%)	57 (1.7%)
<i>S. muiscorum</i>	557	5 (0.9%)	—	—
<i>G. ortizi</i>	303	—	1 (0.3%)	—
Total	4.292			

Los nemátodos fueron los de más alta incidencia en cada uno de los muestreos y en el acumulado total (9.1%). La frecuencia de microsporidiosis fue de 3.6% y la del hongo del 1.7%. Sin embargo, en las recolecciones efectuadas en las dos primeras fechas (III-19-87 y IV-27-87), la incidencia del hongo fue mayor a la de microsporidios. *S. muiscorum* es parasitado únicamente por mermítidos aunque en baja frecuencia, 5 larvas de 557 examinadas (0.9%). En *G. ortizi* solamente se halló un ejemplar infectado con *Microspora* de un total de 303 larvas examinadas. Su incidencia es aparentemente muy baja (0.33%).

Microsporidiosis. La literatura señala datos de incidencia de infecciones por microsporidios en un amplio rango (desde un 0.5 hasta un 50%). Sin embargo, esta información se refiere, por lo general, a observaciones puntuales y carentes de una metodología adecuada de muestreo. Quizás el estudio más representativo es el realizado por Maurand (1973) en la región de Montpellier, Francia. Este autor, además de realizar muestreos frecuentes, en varios sitios y durante las diferentes estaciones, consideró características ecológicas tales como, sustrato de cría de las larvas, velocidad de la corriente, oxígeno disuelto y temperatura del agua. No encontró relación entre estos factores ambientales y la incidencia de la infección. Este investigador señala una relación directa entre la tasa de infección y la edad de las larvas. De un total de 4.500 ejemplares examinados halló una incidencia del 3.3%, la que aumentó al 8% en larvas de cuarto estadio. Takaoka (1980) examinó en Guatemala 23.346 larvas y encontró sólo el 1.2% infectado por microsporidios; es importante resaltar el hecho de que larvas de los vectores *S. metallicum*, *S. ochraceum* y *S. callidum* están incluidas en estos datos.

En los 4 muestreos se hallaron incidencias que fluctúan desde el 0.2% hasta 5.5% para microspori-

dios en *S. ignescens*. Pero al considerar el dato global, de un total de 3.432 larvas examinadas, la incidencia de la infección es del 3.6% similar al valor señalado por Maurand (1973).

Es difícil interpretar la baja incidencia en *G. ortizi* debido a que poco se conoce sobre el parasitismo en este género endémico de los Andes. Por otra parte, *G. ortizi* vive normalmente en fondos fangosos de pequeñas corrientes (Moncada & Bueno, 1977) y los muestreos para este trabajo se hicieron en el río. Una evaluación de microsporidios en el hábitat normal de *G. ortizi* podría arrojar resultados diferentes.

Tal vez la principal dificultad en el estudio de la epizootiología de microsporidios en simúlidos es la falta de conocimiento sobre los mecanismos de transmisión de estos patógenos. Maurand (1973, 1975) afirma que las crecientes en los ríos arrastran la población larvaria y por lo tanto es necesario que la infección se preserve en los adultos, lo cual constituiría una evidencia en favor de la transmisión vertical. Sin embargo, Undeen et al (1984), después de demostrar que la infección se presenta en larvas de ambos sexos y con carácter letal, aseguran que es indispensable la transmisión horizontal para mantener el microsporidio en la población. Además, si el patógeno requiere del adulto para completar su ciclo de vida, pueden intervenir en la incidencia otros factores tales como condiciones ambientales y la disponibilidad de sangre para las hembras.

Mermítidos. Estos son los principales agentes de control biológico natural en simúlidos debido a que presentan una alta incidencia de parasitismo. Para *S. ignescens* la incidencia de estos nemátodos es mucho más significativa comparada con la de microsporidios y *C. simulii*.

Weiser (1964) señala una mortalidad del 30 al 60%, de simúlidos, incluyendo los adultos, ocasionada por mermítidos. Rubtsov (citado por Welch, 1965) registra un promedio del 17% para la región de Leningrado y afirma que en algunos ríos soviéticos ha ocurrido la erradicación de la población larvaria de simúlidos por acción de los mermítidos. Ezenwa (1973), al examinar 3.144 larvas de simúlidos de cinco especies en la península del Labrador (Canadá), halla una incidencia del 11.2%. Takaoka (1980), al examinar 23.346 larvas de simúlidos de Guatemala, indica una incidencia del 2.4%. Para la especie vectora *S. callidum* la incidencia es del 4.9% (variando desde 0.7 hasta 50%) y para *S. metallicum* 8.9% (oscilando entre 1.5 y 75%). Walsh et al. (1981), sugieren la posibilidad de suspender la aplicación de larvicidas químicos en el río Volta (zona de oncocercosis en el Africa occidental) durante los meses de octubre y noviembre debido a la alta incidencia de mermítidos durante este período. Takaoka (1982) al examinar 29.084 larvas provenientes de 54 quebradas de Oita, en el Japón, señala una incidencia de 1.15%.

La baja incidencia de mermítidos en *S. muiscorum* podría explicarse por los sitios de localización de las larvas de esta especie. Estas prefieren los lugares de mayor velocidad de la corriente, lo cual dificulta la permanencia de los estados libres de los nemátodos y su contacto con el huésped. Weiser (1964) indica que se encuentran más larvas parásitas por mermítidos en las corrientes más lentas. Los resultados del parasitismo en *S. ignescens* confirman esta apreciación; las larvas de esa especie se hallan preferencialmente en lugares donde la velocidad de la corriente no es muy alta.

G. ortizi comparte sitios similares con *S. ignescens* en el río, sin embargo, parece no ser afectado por mermítidos de acuerdo con las observaciones realizadas por Moncada y Bueno (1977) y las efectuadas en el presente estudio. Poinar (1981) hace una detallada relación de simúlidos parasitados por mermítidos en todo el mundo y señala a *G. wrighti* afectada por *Gastromermis cloacachilus* en Guatemala. Camino (1985) informa que *G. chilensis* es infectada por *Mesomermis crassivaginae* y *M. subandina* en la Argentina.

Coelomycidium simulii. Tal como ocurre con Microsporida, se tiene poca información acerca de la incidencia de infecciones por *Coelomycidium simulii*. Weiser (1964) señala un promedio en general del 15 al 20%. Jamnback (1973) revela que en New York la incidencia no supera el 1%. Weiser y Undeen (1981) registran una frecuencia máxima del 40% durante el invierno en Europa Central. También se desconoce la razón por la cual *C. simulii* no afecta a todas las especies de simúlidos, a pesar de ser cosmopolita. La incidencia promedio de *C. simulii* en *S. ignescens* (1.7%) parece indicar que este patógeno no es muy importante como agente de control natural. Sin embargo, se requiere un estudio más completo durante todo el año, con muestreos más frecuentes, para llegar a una conclusión más acertada.

De acuerdo con los datos encontrados en la literatura y las observaciones efectuadas en este trabajo, particularmente en larvas de *S. ignescens*, los tres principales grupos de patógenos de simúlidos, parecen mutuamente excluyentes, es decir que solamente uno de ellos se desarrolla exitosamente dentro de una misma larva. Maurand y Loubès (1978) señalan que generalmente un sólo patógeno se encuentra en la cavidad celómica de una misma larva, aunque informan un caso de infección simultánea por Microspora y *C. simulii* en *Tetisimulium bezzi*. Torres (1988) halló una larva de *S. ignescens* proveniente del río Tunjuelito, Municipio de Usme, Cundinamarca a una altura de 3000 m.s.n.m., infectada con *Polydispyrenia simulii* y *C. simulii*.

La acción histopatológica de Microspora, Mermithidae y *C. simulii* está especialmente dirigida al tejido graso de la larva (Maurand & Manier, 1968a; Condon & Gordon, 1977). Esta "competencia por

el sustrato nutricional" podría explicar la presencia de uno solo de los enemigos naturales en una misma larva.

Se requieren más investigaciones sobre la epizootiología de estos importantes grupos de patógenos. El conocimiento profundo de su papel como enemigos naturales de los imúlidos es indispensable para establecer programas de control biológico que permitan disminuir la utilización de larvicidas químicos.

Bibliografía

- Anderson, J. & G. De Foliart. 1962. Nematode parasitism of blackfly (Diptera: Simuliidae) larvae in Wisconsin. Ann. Ent. Soc. Amer., 55: 542-546.
- Armstrong, E. & L. Bass. 1986. Effects of infection by *Nosema whitei* on the mating frequency and fecundity of *Tribolium castaneum*. J. Invert. Pathol., 47: 310-316.
- Avery, S. & L. Bauer. 1984. Iridescent Virus from *Prosimulium* collected in Maine. J. Invert. Pathol., 43: 430-431.
- Batson, B. 1986. A small Iridescent Virus (Iridovirus) in the South Pacific Island of New Caledonia. J. Invert. Pathol., 48: 384-387.
- Brooks, W. 1971. Protozoan infections of insects with emphasis in inflammation. Proc. 4th. Int. Colloq. Insect Pathol. College Park Md., pp. 11-27.
- Bueno, M., L. Moncada & P. Muñoz de Hoyos. 1979. Simuliidae (Insecta: Diptera) de Colombia. I. Nueva especie de *Simulium* (*Hemicnetha*). Caldasia, 12: 581-594.
- Camino, N.B. 1985. Estudio de cuatro especies del género *Mesomermis* Dady, 1911 (Nematoda: Mermithidae) parásitas de larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae). Revista del Museo de la Plata (Zoología) 14: 1-19.
- Canning, E. & E. Hazard. 1982. Genus *Pleistophora* Gurley, 1893: An assemblage of at least three genera. J. Protozool., 29: 39-49.
- Canning, E. & J. Lom. 1986. The Microsporidia of Vertebrates. Academic Press, London. 289 p.
- Condon, W. & R. Gordon. 1977. Some effects of mermithid parasitism on the larval blackflies *Prosimulium mixtum fuscum* and *Simulium venustum*. J. Invert. Pathol., 29: 56-62.
- Currán, J. 1982. Infectivity and development of a blackfly (Simuliidae) mermithid in mosquitoes. J. Invert. Pathol., 39: 401-402.
- Debaisieux, P. 1919a. Une chytridiné nouvelle: *Coelomycidium simulii*, nov. gen. nov. spec. C.R.S. Soc. Biol., 82: 899-900.
- , 1919b. Microsporidies parasites des larves de *Simulium*: *Thelohania varians*. Cellule, 30: 47-79.
- , 1926. A propos d'une microsporidie nouvelle *Octosporea simulii*. Ann. Soc. Sci. Bruxelles, 46: 594-601.
- Debaisieux, P. & L. Gastaldi. 1919. Les microsporidies parasites des larves de simules. Cellule, 30: 187-213.
- Dubitskii, A. 1978. Biological control of bloodsucking flies in the USSR. Citado por Weiser y Undeen (1981).

- Ezenwa, A. 1973. Mermithid and microsporidian parasitism of blackflies (Diptera: Simuliidae) in the vicinity of Churchill Falls, Labrador. *Can. J. Zool.*, 50: 1109-1111.
- Finney, J. 1981. Potential of mermithids for control and 'In vitro' culture. In: *Blackflies. The future for biological methods in integrated control.* Laird, M. Ed., Academic Press. London. pp. 325-333.
- Finney, J. & J. Mokry. 1980. *Romanomermis culicivora* and simuliids. *J. Invert. Pathol.*, 35: 211-213.
- Fisher, F. & R. Sanborn. 1962. Production of insect juvenile hormone by the microsporidian parasite *Nosema*. *Nature*, 194: 1193.
- Gordon, R., B. Ebsary & G. Bennett. 1973. Potentialities of mermithid nematodes for the biocontrol of blackflies (Diptera: Simuliidae). A review. *Exp. Parasitol.*, 33: 226-238.
- Guillet, P. 1984. The control of human onchocerciasis and the prospects for biological agents. *Entomophaga*, 29: 121-132.
- Hazard, E., E. Ellis & D. Joslyn. 1981. Identification of Microsporidia. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980.* Burgess, H., Ed. Academic Press. London. pp. 163-182.
- Henry, J. 1981. Natural and applied control of insects by Protozoa. *Ann. Rev. Entomol.*, 26: 49-73.
- Huger, A. 1960. Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect Pathol.*, 2: 84-105.
- Jamnbach, H. 1973. Recent developments in control of blackflies. *Ann. Rev. Entomol.*, 18: 281-304.
- Johnson, D. & E. Pavlikova. 1986. Reduction of consumption by grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) infected with *Nosema locustae* Canning (Microsporidia: Nosematidae). *J. Invert. Pathol.*, 48: 232-238.
- Lacey, L. & A. Undeen. 1986. Microbial control of blackflies and mosquitoes. *Ann. Rev. Entomol.*, 31: 265-296.
- . 1987. The biological control potential of pathogens and parasites of black flies: 327-340. In Kim, K.C. & R.W. Merritt (Eds.), *Black flies: ecology, population management, and annotated world list xv + 528 pp.* Pennsylvania State University, University Park & London.
- Larsson, R. 1983. Studies of the cytology and taxonomy of the microsporidia (Protozoa, Microspora). *Disertación inédita.* Department of Zoology, University of Lund, Lund Sweden. 33 p.
- . 1986a. Ultrastructure, function and classification of microsporidia. *Progress Protistol.*, 1: 325-390.
- . 1986b. Sporogony of microsporidia: ultrastructure features of taxonomic significance. *Proc. 5th Int. Colloq. Invert. Pathol. Veldhoven.* pp. 339-342.
- Léger, L. 1897. Sur une nouvelle Myxosporidié de la famille des Glugeidées. *Comptes Rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 125: 260-262.
- Levine, N. J., Corliss, F. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. Honingberg, G. Leedale, A. Loeblich, J. Lom, Lynn, E. Merinfeld, F. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra & F. Wallace. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37-58.
- Liu, T. 1984. Ultrastructure of the midgut of the worker honey bee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *J. Invert. Pathol.*, 44: 282-291.
- Loubés, C. 1979a. Ultrastructure, sexualité, dimorphisme sporogonique des microsporidies (Protozoaires). Incidences taxonomiques et biologiques. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier. 86 p.
- . 1979b. Recherches sur la méiose chez les microsporidies: conséquences sur les cycles biologiques. *J. Protozool.*, 26: 200-208.
- Loubés, C. & J. Manier. 1974. Étude ultrastructurale de *Coelomycidium simulii* Debaisieux, sa position systématique parmi les Chytridiomycetes. *Protistologica*, 10: 47-57.
- Lutz, A & A. Splendore. 1904. Über pebrine und verwandte mikrosporidien. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infekt. Krankh. Hyg.*, 36: 645-650 (citado por Maurand, 1973).
- . 1908. Über pebrine und verwandte mikrosporidien. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde Infekt. Krankh. Hyg.*, 46: 311-315 (citado por Maurand, 1973).
- Maurand, J. 1973. Recherches biologiques sur les microsporidies des larves de simulies. Thèse Doctorat es Sciences, Université des Sciences et Techniques de Languedoc. Montpellier. 199 p.
- . 1975. Les microsporidies des larves de simulies: systématique, données cytochimiques, pathologiques et écologiques. *Ann. Parasitol.*, 50: 371-396.
- Maurand, J. & C. Loubés. 1978. Les microsporidies des larves de simulies: données ultrastructurales. *Z. Parasitenkd.*, 56: 131-146.
- Maurand, J. & J. Manier. 1968. Actions histopathologiques comparées de parasites coelomiques des larves de simulies (Chytridiales, Microsporidies). *Ann. Parasitol.*, 43: 79-85.
- Mokry, J., M. Colbo, & B. Thompson. 1981. Laboratory colonization of blackflies. In: *Blackflies. The future for biological methods in integrated control.* Laird, M. Ed. Academic Press. London., pp. 299-315.
- Molloy, D. & R. Gaugier & H. Jamnbach. 1980. The patogenicity of *Neoplectana carpocapsae* to blackfly larvae. *J. Invert. Pathol.*, 36: 302-306.
- Moncada, L. & M. Bueno. 1977. Inventario específico y algunos aspectos biológicos de los simúlidos del río Teusacá. Tesis Biólogo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. 294 p.
- Mondet, B., G. Poinar & J. Bernadou. 1977a. Edute du parasitisme des simulies (Diptera, Simuliidae) par des Mermithidae (Nematoda) en Afrique de l'ouest. II. Description de deux nouvelles especes de *Gastromermis*. *Can. J. Zool.*, 55: 1275-1283.
- . 1977b. Etude du parasitisme des simulies (Diptera: Simuliidae) par des Mermithidae (Nematoda) en Afrique de l'ouest. IV. Description de *Isomermis lairdi*, n. sp., parasite de *Simulium damnosum*. *Can. J. Zool.*, 55: 2011-2017.
- Muñoz de Hoyos, P. 1972. Relationship between two species of Microsporidia (Sporozoa) and two related species of *Rhynchosciara* (Diptera). Thesis Master of Arts. The University of Texas at Austin. 85 p.
- Muñoz de Hoyos, P., M. Bueno & L. Moncada. 1982. Simuliidae (Insecta: Diptera) de Colombia. II. Especies de simúlidos registradas en Colombia. *Scientiae Fac. Ciencias U. Nal. Bogotá Colombia*, 1 (2): 141-146.
- Nolan, R. 1981. Mass production of pathogens. En: *Blackflies. The future for biological methods in integrated control.* Laird, M. Ed. Academic Press. London. pp. 319-324.

- Poinar, G. 1981. Mermithid nematodes of blackflies. In: Blackflies. The future for biological methods in integrated control. Laird, M. Ed. Academic Press. London, pp. 159-170.
- Roubaud, M. 1906. Simulies nouvelles de l'Amerique du Sud. Bull. Mus. Hist. Nat. Paris, 12: 106-110.
- Rubtsov, I. 1981. Mermithidae: taxonomic criteria for their juvenile stages and blackfly biocontrol prospects. In: Blackflies. The future for biological methods in integrated control. Laird, M. Ed. Academic Press. London., pp 171-180.
- Sprague, V. 1977. Systematics of the Microsporidia. Comp. Pathobiol., 2: 1-510.
- Sprague, V. & S. Vernick. 1968. Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporida, Nosematidae) in the 4-Spined Stickleback *Apeltes quadracus*. J. Protozool. 15: 547-571.
- Stempell, W. 1909. Uber *Nosema bombycis* Nageli. Arch. Protistenkd., 16: 281-358. (Citado por Canning y Hazard, 1982).
- Strickland, E. 1911. Some parasites of *Simulium* larvae and their effect on development of the host. Biol. Bull., 21: 302-338.
- . 1913. Further observations on the parasites of *Simulium* larvae: J. Morphol., 24: 43-95.
- Takaoka, H. 1980. Pathogens of blackfly larvae in Guatemala and their influence on natural populations of three species of onchocerciasis vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 467-472.
- . 1982. Mermithid, microsporidan and fungal parasitism of larval blackflies from Oita, in Japan. Jap. J. Sanit. Zool., 33: 149-154.
- Torres, O. 1988. Estudios preliminares de microsporidios y otros patógenos en larvas de simúlidos (Diptera: Simuliidae) de La Calera. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, 109 p.
- Undeen, A. 1978. Observations on the ovarian Phycomycete of Newfoundland blackflies. Proc. Int. Colloq. Invert. Pathol. and XIth. An. Meet. Soc. Invert. Pathol Prague., pp. 251-255.
- Undeen, A. & R. Nolan. 1977. Ovarian infection and fungal spore oviposition in the blackfly *Prosimulium mixtum*. J. Invert. Pathol., 30: 97-98.
- Vavra, J. & A. Undeen. 1981. Microsporidia (Microspora: Microsporida) from Newfoundland blackflies (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool., 59: 1431-1446.
- Walsh, J., J. Davies & B. Cliff. 1981. World Health Organization Onchocerciasis Control Program in the Volta River Basin. In: Blackflies the future for biological methods in integrated control. Laird, M. Ed. Academic Press. London., pp. 85-103.
- Weiser, J. 1964. Parasitology of blackflies. Bull. Wld. Org., 31: 483-485.
- . 1968. Iridescent virus from the blackfly *Simulium ornatum* Meig. in Czechoslovakia. J. Invert. Pathol., 12: 36-39.
- . 1970. Recent advances in insect pathology. Ann. Rev. Entomol., 15: 245-256.
- Weiser, J. & J. Briggs. 1971. Identification of pathogens. In: Microbial Control of Insects and Mites. Burges, H. y N. Hussey. Eds., Academic Press. London, pp 13-66.
- Weiser, J. & A. Undeen. 1981. Diseases of blackflies. In: Blackflies. The future for biological methods in integrated control. Laird, M. Ed. Academic Press. London. pp. 181-196.
- Weiser, J. & Z. Zizka. 1969. *Coelomycidium simulii* in larval blackflies Proc. 3th. Inter. Cong. Protozool. Leningrad, pp. 249.
- Welch, H. 1962. New species of *Gastromermis*, *Isomermis*, and *Mesomermis* (Nematoda: Mermithidae) from blackfly larvae. Ann. Ent. Soc. Amer., 55: 535-542.
- . 1964. Mermithid parasites of blackflies. Bull. Wld. Hlth. Org., 31: 857-863.
- . 1965. Entomophilic nematodes. Ann. Rev. Entomol., 10: 275-302.
- Westphal, A. 1977. Protozoos. Ediciones Omega, Barcelona, 229 p.
- Wygodzinsky, P. 1973. Diagnoses of new species of *Gigantodax* Enderlein (Simuliidae: Diptera) from the Northern Andes. J. N. York Entomol. Soc., 81: 243-246.
- Yeboah, D., A. Undeen & M. Colbo. 1984. Phycomycetes parasitizing the ovaries of blackflies (Simuliidae). J. Invert. Pathol., 43: 363-373.