

Nueva especie de *Parathelohania* (Microsporidia) en larvas de *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) en Venezuela

Frances Osborn

Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente. Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. Fax: 58-293-4521297; fosborn2001@yahoo.com

Recibido 17-V-2001. Corregido 06-VI-2002. Aceptado 13-VI-2002.

Abstract: The symptoms of *Anopheles aquasalis* larvae naturally infected by a microsporidium, and the ultrastructure of the infecting spores is described. The larvae were maintained under laboratory conditions in salt concentrations of 10 g/l and 20 g/l of water. Daily recordings of the mortality of the larvae were made and the dates of change of instar were noted. Infected larvae were processed for transmission electronic microscopy using conventional methods at pH 7.2 and 260 mOsm/l. The infection by the microsporidia was positively correlated with an increase in the mean duration of the fourth instar of 2.88 to 6.33 days in 10 g/l of salt and of 2.47 to 6.14 days in 20 g/l of salt. Larval mortality also increased by approximately 50% during this instar in both salt concentrations. Development time and survival were not affected during the other immature stages. The mature spores found in the intestines of infected larvae were barrel shaped and measured approximately 2.6 x 2.4 μ m. The exospore has a collar shaped prolongation at the posterior end of the spore. The spores are uninuclear with a posterior vacuole. The polar filament is anisofilar with nine rings, five with a diameter of 58 nm each and four with a diameter of 23 nm each. The polarplast is lamellate, and more tightly packed in the apical region. The reduction of the survival of *A. aquasalis* larvae infected with the microsporidia, and the increase in the development time suggest that this parasite might have a potential as a biological control of this pest. The microsporidium described here has similar characteristics to that of the genus *Parathelohania*. I suggest that the microsporidium found in *A. aquasalis* represents a new species and I propose the name *Parathelohania aquasalisensis*. This is the first report of a microsporidium from a dipteran in Venezuela.

Key words: *Anopheles aquasalis*, larvae, microsporidia, *Parathelohania*, parasite.

Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis Curry 1932 ha sido reconocido como un importante vector de malaria en toda la costa Noroeste y Noreste de Sur América; desde Panamá hasta Ecuador en el Pacífico (Moreno y Berti 1997), y desde Guatemala hasta el sur de Brasil, incluyendo las Antillas Menores y Trinidad y Tobago en el Atlántico (Faran 1980, Flemming 1986). En Venezuela, *A. aquasalis* presenta una distribución en los estados Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Delta Amacuro, Dtto. Federal, Falcón, Miranda, Monagas, Sucre, Trujillo, Yaracuy y Zulia (Sutil 1980); sin embargo, es en el estado de Sucre donde tiene mayor importancia como vector de la malaria.

Los estadios inmaduros de *A. aquasalis* se encuentran en diversos hábitats acuáticos, tales como lagunas, caños, pantanos, manglares, potreros inundados, los cuales muestran variaciones en la salinidad entre 0.4 y 38.4 g/l (Berti *et al.* 1993). Estudios realizados en el laboratorio han revelado que el desarrollo de los estadios inmaduros es más rápido, y la sobrevivencia de los mismos es mayor en concentraciones de salinidad de entre 10 y 20 g/l (Gómez y Osborn 2002).

El ente encargado para el control de *A. aquasalis* en el estado Sucre es el Servicio de Endemias Rurales de Malariología. Éste emplea un manejo integrado del vector, utilizando

la bacteria *Bacillus thuringiensis* como medida de control biológico del estado larval y compuestos organofosforados y piretroides como medida de control químico de los adultos. Sin embargo, el uso de los insecticidas en algunas regiones de Sucre, ha provocado el desarrollo de resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *A. aquasalis* (Molina *et al.* 1997). Este tipo de problemas puede causar resistencia cruzada con organofosforados (Bisset *et al.* 1997). Es de hacer notar que, en años recientes, aún con el uso de insecticidas biológicos y químicos para el control de las poblaciones del vector, los casos anuales de malaria en el estado Sucre han oscilado entre 9 000 y 15 500 (Anónimo 2003). Por lo tanto, es importante investigar otras alternativas de control, como por ejemplo, depredadores y parásitos que actúan como enemigos naturales de *A. aquasalis*.

Los microsporidios son protozoarios parásitos que atacan diferentes grupos de insectos, además de otras especies de invertebrados y vertebrados. El primer caso de un microsporidio parasítico reportado fue *Nosema bombycis*, aislado de larvas de *Bombyx mori*, el gusano de seda (Nägeli 1857). Balbiani (1882) sugirió el nombre "microsporidies" para ubicar a *N. bombycis*, el único microsporidio conocido para la época. En 1977, Sprague creó el phylum Microspora. Actualmente existen 42 géneros de microsporidios los cuales utilizan a miembros del orden Diptera como hospederos (Undeen y Vávra 1997, Becnel y Andreadis 1999), de los cuales por lo menos 17 son parásitos en especies de la familia Culicidae (Undeen y Vávra 1997), y cinco géneros; *Parathelohania* (Hesse 1904), *Nosema* (Alger y Undeen 1970), *Amblyospora* (Hazard y Oldacre 1975), *Issia*, (Issi y Pankova 1983), *Duboscquia* (Sweeney *et al.* 1993) han sido reportados como parásitos de especies del género *Anopheles*. Aunque el empleo de los microsporidios como controladores biológicos no ha sido explorado extensivamente, *Edhazardia aedis*, ha sido investigado como un controlador biológico potencial de larvas de *Aedes aegypti*, vector de varias enfermedades tropicales, incluyendo el dengue y la fiebre amarilla (Becnel y Undeen 1992, Nasci

et al. 1992). En este trabajo se describen los síntomas de larvas de *A. aquasalis* naturalmente infectadas con un microsporidio parasítico, y se describe la ultraestructura de las esporas del mismo. Este es el primer reporte de un microsporidio parásito de un díptero en Venezuela y el primer reporte de un microsporidio en larvas de *A. aquasalis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cría de larvas: Hembras adultas de *A. aquasalis*, fueron recolectadas usando un succionador en los marcos metálicos de un potrero cerca de la población Muelle de Cariaco, Edo. Sucre (10° 20' N y 63° 34' 02" O). Inmediatamente fueron transferidos a envases de cartón parafinado, para el traslado al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente, Cumaná.

Una vez en el laboratorio, las hembras fueron colocadas por separado en vasos plásticos de 60 ml, con el fondo relleno de algodón húmedo y cubierto con tres círculos de papel absorbente. Las hembras fueron mantenidas en condiciones ambientales de 28.5 ± 1.5 °C, $80.0 \pm 10.0\%$ de humedad y 12:12 horas de fotoperíodo normal.

Las posturas obtenidas de hembras de *A. aquasalis* fueron colocadas en bandejas plásticas de 30 x 22 x 7 cm. Las larvas recién eclosionadas (entre seis y ocho horas de edad) se distribuyeron en dos grupos de 50 larvas por bandeja, en 200 ml de agua potable, con concentraciones de salinidad de 10 y 20 g/l respectivamente, para obtener una densidad larval de aproximadamente 0.15 larvas por cm² (Delgado 1998, Gómez y Osborn 2002). La temperatura ambiental se mantuvo entre 31 ± 2 °C, y una humedad de $70.0 \pm 5.0\%$. A las larvas se les suministró una dieta diaria que consistió en una mezcla pulverizada de 55% Ictiosan® (alimento para peces), 15% de levadura deshidratada, 15% de hígado de res deshidratado, 7.5% de espinacas deshidratadas y 7.5% de hojuelas de avena Quaker®. Esta mezcla fue añadida a las bandejas con las larvas

una vez por día, hasta el segundo estadio (0.1 mg/larva) y dos veces al día, a partir del tercer estadio (0.4 mg/larva) (Delgado 1998).

Se revisaron las bandejas diariamente a la misma hora y se registró la fecha de cambio de estadio y la mortalidad. Es necesario enfatizar que estas larvas de *A. aquasalis* no fueron infectadas experimentalmente, simplemente se observó que la progenie de las hembras adultas colectadas, exhibió una sintomatología característica de infección por microsporidios, es decir, las larvas en el cuarto estadio tomaron una coloración blanca, opaca, lechosa, no mudaron al estado de pupa y eventualmente murieron.

Construcción de los cuadros horizontales de vida: A partir del número diario de larvas vivas (N_x), se construyeron los cuadros horizontales de vida por día y por edad, y las curvas de supervivencia por día, según los métodos de Rabinovich (1980) y Service (1993), para la fase inmadura de *A. aquasalis* infectada con los microsporidios. Estos fueron comparados con cuadros horizontales de vida de larvas sanas a la misma temperatura y las mismas concentraciones de salinidad.

La duración promedio de cada uno de los estadios se calculó a través de la siguiente fórmula (Reisen y Siddiqui 1979):

$$\text{Duración Promedio Estadio} = \frac{[(\text{larvas} * \text{día}_n)]}{\text{Total larvas estadio}}$$

$n = 1$ es el día en que se observan por primera vez larvas del estadio en cuestión.

No se realizaron análisis estadísticos debido a que los datos del desarrollo de las larvas infectadas fueron obtenidos a partir de una sola réplica. (Los datos del desarrollo de las larvas sanas fueron obtenidos a partir de dos réplicas).

Procesamiento de las muestras para MET: Algunas larvas naturalmente infectadas, se prepararon para microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello, se cortó el abdomen de las larvas en trozos de 1 mm³ y se sumergieron inmediatamente en pre-fijador fresco (glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 1%) en solución buffer fosfato pH 7.2 y 260

mOsm/L. Después de tres lavados con solución buffer fosfato pH 7.2, se postfijaron los cortes en una solución de tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en solución buffer fosfato durante 90 minutos, y luego los tejidos se lavaron tres veces en buffer fosfato. Luego se deshidrataron en una serie creciente de etanol (Stobbart y Shaw 1964, Crossley y Waterhouse 1969, Lu y Chow 1991). Después de la deshidratación, las muestras fueron infiltradas con óxido de propileno, para luego ser incluidas en resina epóxica Polybed 812, y polimerizadas a 60 °C por 48 horas. Se realizaron cortes ultra finos, de 60-70 nm, con un ultra micrótopo Reichart-Jung, y se tiñeron con acetato de uranilo al 6% por cinco minutos y citrato de plomo por tres minutos. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión, Hitachi H-600.

RESULTADOS

La duración de las fases inmaduras de *A. aquasalis* naturalmente infectadas con los microsporidios fue de 16 y 18 días (desde el día en que se comenzó la cría hasta el día en el cual emergió la última pupa en adulto) a las dos concentraciones utilizadas, a diferencia de las larvas sanas cuya duración fue de diez días independientemente de la salinidad (Fig. 1a). En esta misma figura se observa una reducción de la supervivencia aproximadamente en un 50% de las larvas infectadas con los microsporidios comparado con las larvas sanas para ambas concentraciones de salinidad. Todas las curvas de la esperanza de vida mostraron tendencias similares, observándose una reducción lineal y constante en la e_x . Sin embargo, hubo una esperanza de vida aparentemente mayor en las larvas infectadas, comparada con las larvas sanas, lo que se debe al aumento de la duración de la fase inmadura de estas larvas y no a la proporción de la supervivencia de las mismas (Fig. 1b). La probabilidad de morir entre la edad x y $x + 1$ (q_x) (Fig. 1c) fue similar en las larvas sanas y las infectadas hasta el día 13, cuando aumentó la mortalidad de las larvas

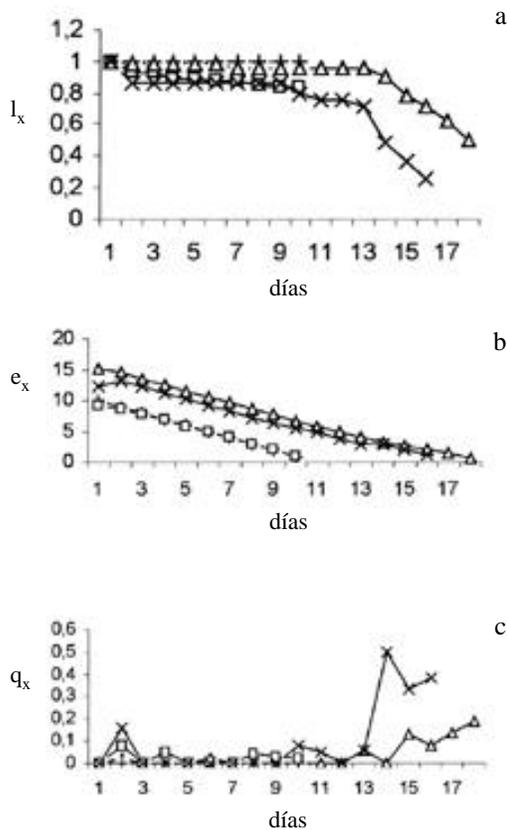


Fig. 1. Efecto de la infección por microsporidios sobre algunos parámetros demográficos de la fase inmadura de *A. aquasalis* criadas en dos concentraciones de salinidad. Larvas sanas en una salinidad de 10 g/l (○), larvas infectadas en una salinidad de 10 g/l (△), larvas sanas en una salinidad de 20 g/l (□), larvas infectadas en una salinidad de 20 g/l (X). [(a) Proporción de supervivencia (I_x), (b) Esperanza de vida (e_x), (c) Tasa de mortalidad específica por edades (q_x)].

Fig. 1. Effect of the microsporidia infection on some demographic parameters of the immature phase of *A. aquasalis* raised in two salt concentrations. Healthy larvae raised in a concentration of 20 g/l of salt (○), infected larvae raised in a concentration of 10 g/l of salt (△), healthy larvae raised in a salt concentration of 20 g/l (□), infected larvae raised in a concentration of 20 g/l of salt (X). [(a) Proportion of survival (I_x), (b) Life expectancy (e_x), (c) Rate of age-specific mortality (q_x)].

a infectadas mientras que las larvas sanas ya habían pasado a la fase adulto.

La infección de las larvas con los microsporidios produjo un incremento en la mortalidad de las mismas en el cuarto estadio para ambas concentraciones de salinidad, y el factor de mortalidad clave fue sustancialmente mayor en este estadio (Cuadros 1 y 2). El tiempo total de desarrollo desde el primer estadio hasta la emergencia de los adultos se calculó a partir de la sumatoria de la duración promedio de los estadios larvales. En las larvas infectadas, el número de días de desarrollo total aumentó de 7.7 a 13.33 días para la concentración de salinidad de 10 g/l (Cuadro 1) y de 7.86 a 11.69 días para la de 20 g/l (Cuadro 2). Esto se debe principalmente a que la duración del 4to estadio larval fue de 2.2 a 2.5 veces mayor en las larvas infectadas que en las larvas sanas.

El microsporidio encontrado en las larvas fue identificado como perteneciente al género *Parathelohania* Codreanu 1966, basada en la ultraestructura de las esporas maduras. Las medidas de los microsporidios se tomaron exclusivamente de fotografías de microscopía electrónica de transmisión de los microsporidios, utilizando un limitado número de ejemplares. Dichas medidas son aproximadas debido a la dificultad de evaluar con precisión los tamaños de las estructuras basadas en los cortes ultra finos, ya que las imágenes son afectadas por la dirección del corte.

Las esporas y esporoblastos de los microsporidios en el tejido abdominal de las larvas se ilustran en las Figs. 2-5. Se pudo observar una alta densidad de esporas y esporoblastos en todo el tejido cortado. Las esporas estaban organizadas en grupos de cuatro a seis, con cada grupo rodeado por una vesícula esporífera (Fig. 2). Durante el proceso de esporogonia se observó que la exoespora tenía una forma de estrella con cinco puntas (Fig. 3). Las esporas maduras presentaron una exoespora de forma irregular, con una prolongación en forma de collar en la parte posterior de la espora. Las endoesporas fueron pentagonales y las esporas tenían un sólo núcleo. La zona de anclaje y el

CUADRO 1

Efecto de la infección por los microsporidios sobre la supervivencia, factor de mortalidad y duración de los estadios de las fases inmaduras de A. aquasalis, criadas en una concentración de salinidad de 10g/l bajo condiciones de laboratorio

TABLE 1

Effect of the microsporidia infection on the survival, mortality factor and duration of instars of the immature phases of A. aquasalis in laboratory conditions, raised in a concentration of 10 g/l of salt

Estadio	Ii (No =50)		Ki		Estadio (días)	
	Sanas	Infectadas	Sanas	Infectadas	Sanas	Infectadas
L-I	1	0.98	0	0.009	1.02	2.02
L-II	1	0.96	0	0.009	1.02	1.76
L-III	1	0.96	0	0	1.18	1.9
L-IV	1	0.5	0	0.283	2.88	6.33
Pupa	1	0.5	0	0	1.60	1.32
		Total	0	0.301	7.70	13.33

L_i = Proporción de supervivencia por estadio, K_i = Factor de mortalidad clave ($\log N_i - \log N_{i+1}$), Duración promedio estadio = [(larvas * día_n)] / Total larvas por estadio, n = 1 es el día en que se observan por primera vez larvas del estadio en cuestión.

L_i = Proportion of survival per instar, K_i = Key mortality factor ($\log N_i - \log N_{i+1}$), Mean duration of instar = [(larvae * day_n)] / Total larvae per instar, n = 1 is the first day in which larvae of the instar in question were observed.

CUADRO 2

Efecto de la infección por los microsporidios sobre la supervivencia, factor de mortalidad y duración de los estadios, de las fases inmaduras de A. aquasalis, criadas en una concentración de salinidad de 20g/l bajo condiciones de laboratorio

TABLE 2

Effect of the microsporidia infection on the survival, mortality factor and duration of instars of the immature phases of A. aquasalis, in laboratory conditions raised in a concentration of 20g/l of salt

Estadio	Ii (No =50)		Ki		Estadio (días)	
	Sanas	Infectadas	Sanas	Infectadas	Sanas	Infectadas
L-I	0.93	0.86	0.032	0.066	1.10	2.4
L-II	0.87	0.86	0.029	0	1.11	1.05
L-III	0.85	0.86	0.010	0	1.76	1.35
L-IV	0.84	0.26	0.005	0.52	2.47	6.14
Pupa	0.83	0.26	0.005	0	1.42	1.15
		Total	0.082	0.586	7.86	11.69

L_i = Proporción de supervivencia de larvas por estadio, K_i = Factor de mortalidad clave ($\log N_i - \log N_{i+1}$), Duración promedio de estadio = [(larvas * día_n)] / Total larvas por estadio, n = 1 es el día en que se observan por primera vez larvas del estadio en cuestión.

L_i = Proportion of survival of larvae per instar, K_i = Key mortality factor ($\log N_i - \log N_{i+1}$), Mean duration of instar = [(larvae * day_n)] / Total larvae per instar, n = 1 is the first day in which larvae of the instar in question were observed.

filamento polar se pudo observar claramente. Los nueve anillos del tubo polar se presentaron en forma alineada, son anisofilares, cinco con un diámetro de 58 nm cada uno, y cuatro con un diámetro de 23 nm cada uno (Fig. 4). El polarplasto posterior se distribuyó en forma lamelar, con el polarplasto posterior más denso que el polarplasto anterior (Figs. 4 y 5). En la Fig. 5 se observa el polarplasto anterior claramente, con gránulos entre los filamentos.

Descripción de la especie

Parathelohania aquasalensis n. sp.

Hospedero tipo. *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* Curry 1932

Espora. Espora en forma de barril, 2.6 x 2.4 μm . Espora uninuclear con una vacuola posterior grande. Exoespora con una prolongación en forma de collar en la parte posterior de la espora. Polarplasto organizado en forma lamelar, con los lamelos más densos en la región apical. Filamento polar anisofilar con nueve anillos, de los cuales cinco anillos son anchos proximales y cuatro angostos distales, organizados en una sola línea.

Localidad tipo. La infección fue detectada en la progenie de hembras adultas colectadas en un potrero de vacas cerca de Muelle de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela (10° 20' N y 63° 34' 02" O).

DISCUSIÓN

La infección por microsporidios afectó sustancialmente el desarrollo de la fase inmadura de *A. aquasalis*, y su sobrevivencia, especialmente durante el cuarto estadio larval. En este estadio se observó que las larvas, aunque siguieron comiendo, no mudaron al estado de pupa y eventualmente murieron. La sintomatología descrita aquí es similar a la reportada para *Amblyospora connecticus*, que normalmente mata a su hospedero, *Aedes cantator* en el cuarto estadio, liberando las esporas al agua (Becnel y Andreadis 1999).

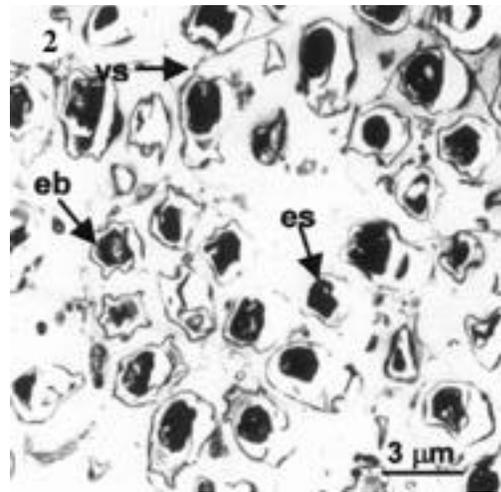


Fig. 2. Vista panorámica de las esporas y los esporoblastos, es: espora, eb: esporoblasto, vs: vesícula esporífera.

Fig. 2. General view of the spores and sporoblasts, es: spore, eb: sporoblast, vs: sporiferous vesicle.

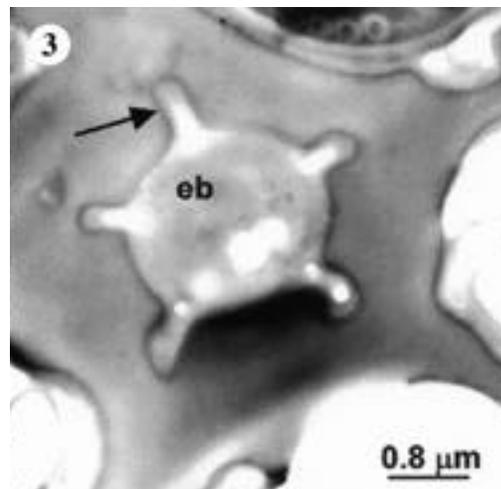


Fig. 3. Vista de un esporoblasto. Nótese la forma de estrella (flecha), eb: esporoblasto.

Fig. 3. View of a sporoblast. Note the star shape (arrow), eb: sporoblast.

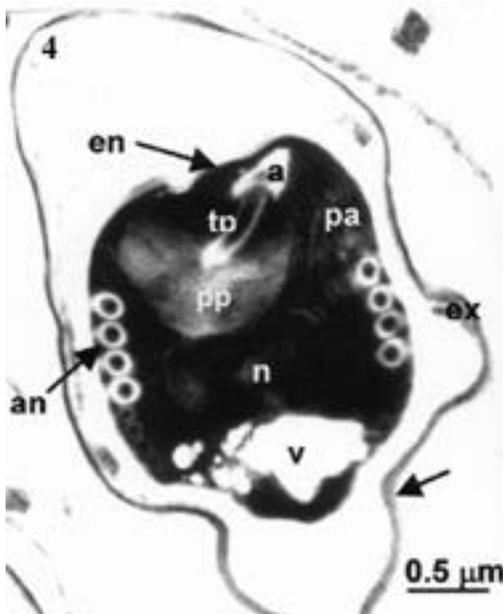


Fig. 4. Detalle de una espora, ex: exospora, en: endospora, a: disco de anclaje, tp: tubo polar, n: núcleo, v: vacuola posterior, pa: polarplasto anterior, pp: polarplasto posterior, an: anillos del tubo polar.

Fig. 4. Detail of a spore, ex: exospore, en: endospore, a: anchoring disc, tp: polar tube, n: nucleus, v: posterior vacuole, pa: anterior polarplast, pp: posterior polarplast, an: coils of the polar tube.

Debido a las buenas condiciones de cría de las larvas, es muy probable que la infección fuese causada por transmisión transovarial. Sin embargo, el alto porcentaje de mortalidad en el cuarto estadio de las larvas sugiere que la transmisión horizontal de los microsporidios también ocurre. La combinación de transmisión ovarial y horizontal ha sido reportado para otras especies de microsporidios, por ejemplo, especies del género *Amblyospora* que infecta un amplio rango de especies de culícidos (Becnel y Andreadis 1999) y *Edhazardia aedis* que parasita larvas de *Aedes aegypti* (Becnel *et al.* 1989, Johnson *et al.* 1997).

La reducción en la supervivencia de las larvas de *A. aquasalis* infectadas con los microsporidios, y el alargamiento del período de desarrollo sugiere que este parásito podría tener un uso potencial como controlador biológico de *A. aquasalis*. Una de las ventajas de los

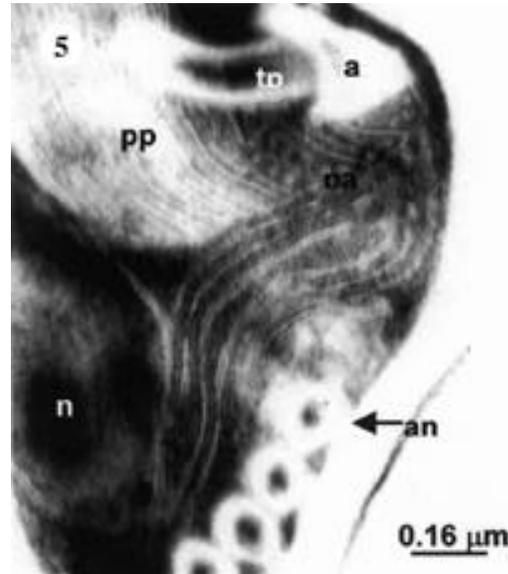


Fig. 5. Detalle de la zona del disco de anclaje, a: disco de anclaje, tp: tubo polar, pa: polarplasto anterior, pp: polarplasto posterior, an: anillos del tubo polar, n = núcleo.

Fig. 5. Detail of the zone surrounding the anchoring disc, a: anchoring disc, tp: polar tube, pa: anterior polarplast, pp: posterior polarplast, an: coils of the polar tube, n = nucleus.

microsporidios del género *Parathelohania* es que se caracterizan por ser específicos al hospedero (García y Becnel 1994, Baker *et al.* 1998), lo que garantizaría la acción específica de este parásito para *A. aquasalis*. Además, el alargamiento del desarrollo de las larvas aumentaría el tiempo disponible para que actúen otros controles biológicos. Por ejemplo, larvas de *Lymantria dispar* (Lepidoptera) pre-infectadas con el microsporidio *Nosema* sp. estaban más susceptibles a un patógeno viral que larvas no infectadas previamente (Bauer *et al.* 1998).

El microsporidio descrito aquí fue incluido en el género *Parathelohania* por las siguientes características: presencia de vesículas esporíferas, la prolongación en forma de collar de la exospora en la parte posterior de la espora, una espora uninuclear que posee un tubo polar anisofilar de nueve anillos, un polarplasto organizado en forma lamelar y una vacuola

posterior grande (García y Becnel 1994). No obstante estas similitudes, el tamaño de la espora de la especie descrita aquí (2.6 x 2.4 μm) es sustancialmente más pequeño que en las otras especies de *Parathelohania* (3.07 – 8.0 x 2.12-4.2 μm) (García y Becnel 1994). Además la forma de la espora de la especie presentada es de barril, mientras que otras especies de *Parathelohania* tienden a ser ovoides (Undeen y Vávra 1997). Debido a estas diferencias y tomando en cuenta que la mayoría de las especies de *Parathelohania* son específicas al hospedero (García y Becnel 1994, Baker *et al.* 1998), se propone que la especie aquí descrita representa una nueva especie para la ciencia y se sugiere el nombre; *Parathelohania aquasalis*. Este representa el primer reporte de un microsporidio encontrado en un díptero en Venezuela, y el primer reporte de un microsporidio en *A. aquasalis*. Se espera que este estudio preliminar estimule investigaciones posteriores para la caracterización del ciclo de vida completo de esta especie, y su posible uso como control biológico de *A. aquasalis*.

AGRADECIMIENTOS

A Cruz Gómez por su ayuda en la cría de *A. aquasalis* en el laboratorio. A Milagro Moreno, Antonio Gómez y Gilma Hernández por su ayuda técnica en el procesamiento de las muestras para MET. A Lucila Arcay (Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela) por comentarios que ayudaron a mejorar una primera versión del manuscrito. Este trabajo fue posible gracias a la ayuda financiera del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente a través del Proyecto No. CI-5-1901-0957/00.

RESUMEN

Se describen los síntomas en larvas de *A. aquasalis* infectadas naturalmente con un microsporidio parasítico, y la ultraestructura de las esporas del mismo. Las larvas fueron criadas bajo condiciones de laboratorio en concentraciones de salinidad de 10 g/l y 20 g/l, registrándose diaria-

mente la mortalidad y la fecha del cambio de estadio de las mismas. Las larvas infectadas fueron procesadas por microscopía electrónica de transmisión usando métodos convencionales con pH 7.2 y 260 mOsm/l. El incremento de la infección por los microsporidios estuvo correlacionado positivamente con un aumento en la duración promedio del cuarto estadio de 2.88 a 6.33 días en 10 g/l de sal y de 2.47 a 6.14 días en 20 g/l. La mortalidad de las larvas también aumentó en aproximadamente 50% durante este estadio a ambas concentraciones de salinidad. No se observaron estas alteraciones en los otros estadios. Las esporas maduras de los microsporidios fueron encontradas en el intestino de las larvas. Estas esporas mostraron forma de barril y dimensiones de 2.6 x 2.4 μm aproximadamente. La reducción en la supervivencia de las larvas de *A. aquasalis* infectadas con los microsporidios, y el aumento del tiempo de su desarrollo sugiere que este parásito podría ser un posible controlador biológico de esta plaga. El microsporidio descrito presenta características similares a las del género *Parathelohania*. Se sugiere que el microsporidio encontrado en las larvas de *A. aquasalis* es una especie nueva y se propone nombrarla *Parathelohania aquasalis*. Este trabajo representa el primer reporte de un microsporidio encontrado en un díptero en Venezuela.

REFERENCIAS

- Alger, N. & A. Undeen. 1970. The control of a microsporidian, *Nosema* sp. in an anopheline colony by an egg rinsing technique. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 321-327.
- Anónimo. 2003. Informe interno, Servicio de Endemias Rurales, Región XI, Estado Sucre, Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Venezuela.
- Balbani, G. 1882. Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *C. R. Acad. Sci.* 95: 1168-1171.
- Baker M., C. Vossbrinck, J. Becnel, & T. Andreadis. 1998. Phylogeny of *Amblyospora* and related genera based on small subunit ribosomal DNA data: a possible example of host parasite cospeciation. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 199-206.
- Bauer L., D. Miller, J. Maddox, & M. Mcmanus. 1998. Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Invertebr. Pathol.* 74: 147-153.
- Becnel J., & T. Andreadis. 1999. Microsporidia in insects. pp. 447-501. *In* Wittner & Weiss (eds.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM, Washington, D.C.
- Becnel J. & A. Undeen. 1992. Influence of temperature on developmental parameters of the parasite/host system *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Amblyosporidae)

- and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 60: 299-303.
- Becnel J., V. Sprague, T. Fukuda & E. Hazard. 1989. Development of *Edhazardia aedis* (Kudo, 1930) n.g., n. comb. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J. Protozool. 36: 119-130.
- Berti, J., R. Zimmerman & J. Amarista. 1993. Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88: 353-362.
- Bisset, J., M. Rodriguez, A. Soca, N. Pasteur & M. Raymond. 1997. Cross-Resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the Southern House mosquito (Diptera: Culicidae) from Cuba. J. Medical Entomology. 34: 244-246.
- Crossley, A. & D. Waterhouse 1969. The ultrastructure of the osmeterium and the nature of its secretion in *Papilio* larvae (Lepidoptera). Tissue and Cell 1: 525-554.
- Delgado, N. 1998. Parámetros demográficos de las fases inmaduras de *Anopheles aquasalis* Curry 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Bol. Entomol. Venezolano. 13: 27-43.
- Faran, M. 1980. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revisión of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contrib. Am. Entomol. Inst. 15: 1-215.
- Flemming, G. 1986. Biología y ecología de los vectores de la malaria en las Américas. PAHO/WHO, PNSP/86.72. 54p.
- García J. & J. Becnel. 1994. Eight new species of microsporidia (Microsporida) from Argentine Mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 64: 243-252.
- Gómez, C. & F. Osborn. 2002. Efectos de diferentes concentraciones salinas sobre el desarrollo de larvas y pupas de *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Entomotrópica 17(2): 121-127.
- Hazard E. & S. Oldacre. 1975. Revisión of microsporidia (Protozoa) close to *Theloania* with descriptions of one new family, eight new genera and thirteen new species. Tech. Bull. U.S. Dept. Agric. 1530: 1-104.
- Hesse, E. 1904. *Thelohania legeri* n. sp., microsporidie nouvelle, parasite des larves d'*Anopheles maculipennis* Meig. C.R. Soc. Biol. 57: 570-571.
- Issi, I. & T. Pankova. 1983. New species of microsporidian *Issis globulifera* sp. n. (*Nosema*) in the malarial mosquito *Anopheles maculipennis*. Parazitologija 17: 189-194.
- Johnson, M., J. Becnel & A. Undeen. 1997. A new sporulation sequence in *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae), a parasite of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 70: 69-75.
- Lu, C. & Y. Chow. 1991. Fine structure of the larval osmeterium of *Papilio demoleus libanius* (Lepidoptera: Papilionidae). Annals. Entomol. Soc. America 84: 294-302.
- Molina, D., F. Romero, J. Bisset, O. Hidalgo, M. Castillo, W. Anaya, J. González, O. Salas & H. Barazarte. 1997. Establecimiento de la línea de susceptibilidad de la fase adulta de *Anopheles* spp. a insecticidas químicas. Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb. 37: 55-69.
- Moreno, J. & J. Berti. 1997. Estudio de la susceptibilidad de *Anopheles aquasalis* Curry 1932, a la infección con *Plasmodium vivax* en Venezuela. Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb. 37: 84.
- Nägeli, C. 1857. Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Botan. SEIT. 15: 760-761.
- Nasci, R., K. Tang, J. Becnel & T. Fukuda. 1992. Effect of per os *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Amblyosporidae) infection on *Aedes aegypti* mortality and body size. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 8: 131-136.
- Rabinovich, J. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Continental, México. 313 p.
- Reisen, W. & T. Siddiqui. 1979. Horizontal and vertical estimates of immature survivorship for *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in Pakistan. J. Med. Entomol. 16: 207-218.
- Service, M. 1993. Mosquito ecology: field sampling methods. 2nd ed. Chapman & Hall. Londres. 988p.
- Sprague, V. 1977. Systematics of the Microsporidia. pp. 1-510. In L. Bulla & T. Cheng (ed.). Comparative Pathobiology 2. Plenum, New York.
- Stobart, R. & J. Shaw. 1964. Salt and water balance: excretion. pp. 189-235. In Rockstein (ed.). The physiology of insects, vol 3. Academic, Nueva York, Londres.
- Sútil, E. 1980. Enumeración histórica y geográfica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas según su taxonomía. Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb. 20: 1-31.
- Sweeney, A., S. Doggett & R. Piper. 1993. Life cycle of a new species of *Duboscquia* (Microsporidia: Thelohaniidae) infecting the mosquito *Anopheles hilli* and an intermediate copepod host, *Apocyclops dengizicus*. J. Invertebr. Pathol. 56: 415-418.
- Undeen A. & J. Vávra. 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. pp. 117-151. In A. Undeen & J. Vávra (ed.). Manual of techniques on insect pathology. Academic, San Diego, California.