

GENERALIDADES Y POTENCIALIDAD EN BIOCONTROL DE LAS GREGARINAS ENTOMOPARÁSITAS

FILIBERTO REYES VILLANUEVA*

Las gregarinas son protozoarios cuyo grupo ha sido tradicionalmente ubicado en el *Phyllum protozoa* y en la clase Sporozoa,¹ la cual fue propuesta hace poco más de un siglo.² La taxonomía en esta clase ha sido ambigua, debido a que son grupos parafiléticos (grupos con ancestro común, pero que no incluyen todos sus descendientes)³ y, por lo mismo, varios esquemas han sido propuestos. Uno, el más aceptado y actualmente vigente, es el de Levine,⁴ quien propuso el *Phyllum apicomplexa* para las gregarinas en general, y después lo dividió en dos clases: Perkinsida (con sólo una especie parásita de ostras, *Perkinsus marinus*) y Sporozoasida. Esta última la dividió en tres subclases: Gregarinasina, Coccidiasina y Piroplasmasina. Según Levine, al apicomplexa agrupa ~ 4,000 especies y más de 300 géneros, y para gregarinas señala que hay ~ 218 géneros. Al nivel de orden, Levine adoptó el criterio de Grassé,⁵ dividiendo la clase Gregarinasina en tres órdenes: Archigregarinida (cuatro géneros y ~ 15 especies), Neogregarinida (14 géneros y ~ 50 especies) y Eugregarinorida (~ 200 géneros y 1,400 especies).

Por otro lado, otra propuesta⁶ ha sugerido la clase Gregarinea, *Phyllum Sporozoea* y Reino protista. Con un enfoque más natural, se ubica a los microsporidios en un *phyllum* aparte (microspora) debido a sus peculiares características. Posteriormente, con un ángulo artificial y basado en el criterio anterior,⁶ otro zoólogo⁷ propuso una clasificación para los protozoarios, ordenándolos en siete grupos y diez *phylla* dentro del Reino protista. Aquí,

las gregarinas también quedan en la clase Gregarinea, *Phyllum sporozoea* y en el grupo siete, de los esporozoarios sin medios obvios de locomoción.

Aquí se adopta el sistema de los cinco reinos para los seres vivos⁸ que después fue modificado⁹ en: *Monera* (prokariotes unicelulares), *Protista* (eukariotes unicelulares), *Fungi* (hongos), *Animalia* (animales) y *Plantae* (plantas).

Por otro lado, con la biología molecular ya se está buscando una clasificación menos artificial. Las secuencias genómicas en el ARN ribosómico de las gregarinas difieren de las del resto de los grupos de Sporozoea, y se ha postulado que comprenden un grupo monofilético.¹⁰ Se especula que este grupo se originó como una rama primigenia dentro del árbol filogenético del resto de los grupos conocidos como esporozoarios. Una posible explicación es el tipo de gamogonia que presentan (formación de gametos a partir de gamontes) con un rara unión de gamontes o formas sexuales llamadas syzygy (del griego syn = junto, zygon = huevo). En este fenómeno, numerosos gametos masculinos y femeninos se diferencian dentro de cada "tipo" o "sexo" de gamonte, en lo que es el gamotocito.¹¹

Las gregarinas son parásitos monoxenos o estenoxenos de cavidades corporales de invertebrados, con trofozoitos (gamontes) y fases sexuales grandes extracelulares.⁷ Artificialmente, las gregarinas se di-

* Profesor investigador. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza, N.L. Apdo. Postal 109-F, 66450 E-mail: freyesv@rt.nl.

viden en dos grupos por la morfología del trofozoito. El primero son las gregarinas cefalinas (*Cephaline*), en donde el trofozoito o gamonte se divide en tres partes: el epimerito (órgano apical para adhesión), protomerito (sección anterior de la célula) y deutomerito (sección posterior de la célula). El segundo es el de las gregarinas acefalinas (*Acephaline*) con sólo dos partes: el protomerito y el deutomerito. La división celular múltiple o esquizogonia sirve para una clasificación de las gregarinas en los tres órdenes ya mencionados:

- Orden Archigregarinida.- Sin esquizogonia y trofozoitos con microtúbulos subpeliculares y movimientos pendulares. Parásitos de invertebrados marinos, por ejemplo, *Selenidioides*.
- Orden Eugregarinorida.- Sin Merogonia y trofozoitos que se deslizan mediante ondas a lo largo de la célula. Parásitos de insectos y otros invertebrados, por ejemplo, *Ascogregarina* spp. común en Díptera (*insecta*). Pueden ser acefalinas (*Acephalinas*) o cefalinas (*Cephalinas*).
- Orden Neogregarinida.- Merogonia presente y parásitos de insectos. Se pueden reproducir por merogonia en epitelio o cuerpo graso del huésped, y, por lo mismo, son más virulentas que las eugregarinas, por ejemplo, *Mattesia grandis*, parásito de *Anthonomus grandis* (plaga del algodonero). Más pequeñas que Eugregarinas y gamonte aseptado.

Actualmente existen 214 géneros y ~ 1,450 especies de gregarinas que parasitan insectos.⁴ Algunos géneros tienen rango limitado de huéspedes, como el caso de *Ascogregarina* (*Lecudinidae*) que está asociado a ocho especies de mosquitos (Diptera: *Culicidae*).¹² Respecto a la merogonia (división celular múltiple), existen dos tipos en las Neogregarinas y son las siguientes:

1. Micronuclear. Ocurre en esporozoitos, cuando se transforman en parásitos intracelulares. En *Mattesia trogodermae*, una vez que sus oocistos son ingeridos y dan lugar a los esporozoitos, éstos emigran al cuerpo graso de su huésped, *Trigoderma granarum* (una plaga de granos almacenados).¹³
2. Macronuclear. En la misma interacción parásito/huésped, los merozoitos pequeños a su vez, por esquizogonia, dan lugar a núcleos más gran-

des (~ 2 μ m diámetro) apareciendo ~ 20 merozoitos.¹⁴

Ciclo de vida y morfología

Una vez que los oocistos (usualmente en forma de un balón de fútbol americano) están en el estómago del huésped, cada uno origina ocho (o más) esporozoitos.¹⁵ Se transforman en parásitos intracelulares o merozoitos mediante esquizogonia, como sucede en la neogregarina *Lipocystis polyspora* en su huésped *Panorpa communis* (figura 2, fases 1–4).¹⁶

Otra opción es que sólo viven como parásitos intracelulares en fase de trofozoito temprano, sin reproducción esquizogónica, como se observa en la eugregarina *Ascogregarina taiwanensis* en su huésped *Aedes albopictus*.¹⁷ En este caso, la fase parásita intracelular dura las primeras 60 – 72 horas después que ocurre la infección vía oral, para después romper la célula huésped y salir al lumen mesentérico larval.¹⁸ También existe la modalidad de que los esporozoitos recién eclosionados pasen a la cavidad corporal (celoma) o sólo se adhieran como parásitos extracelulares a las células epiteliales mesentéricas, como se han reportado en la Eugregarina *Leydana canadensis* en su larva huésped, el

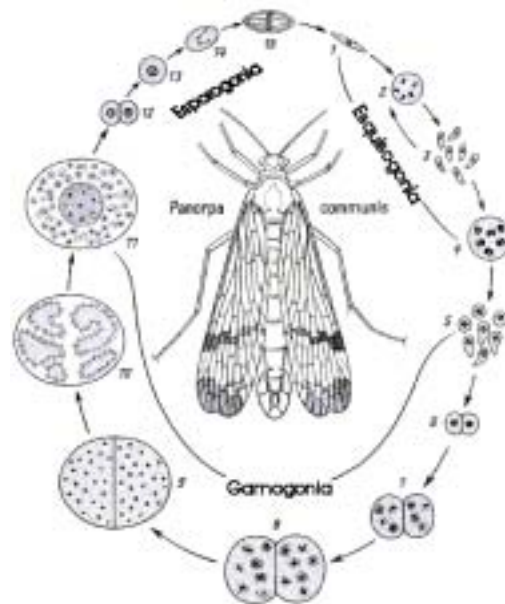


Fig. 1. Diagrama del ciclo de vida de la Neogregarina, *Lipocystis polyspora*, mostrando la esquizogonia (merogonia), gamogonia y esporogonia (Redibujado de Corliss y Grell 2000).

lepidóptero *Lambdina fiscellaria*,¹⁹ o en *Gregarina blattarum*, parasitando el estómago de la cucaracha *Blatella humberian*.²⁰

Después de crecer un tiempo, como intra o ectoparásitos celulares, los trofozoitos se desprenden del epitelio y se transforman en gamontes, formas libres que se desplazan en el espacio ectoperitrófico. Los gamontes son formas sexuales (haploides) idénticas morfológicamente, por lo que al encontrarse dos de diferente signo o sexo, se fusionan en una syzygy (figura 1, fase 6). Después ambos se rodean de una cubierta protectora y se transforman en un gametocito, el cual, en el caso de *Hoplorhynchus* spp. en el odonato *Enallagma boreale*, es excretado en ~ dos semanas después de la infección.²¹

En el gametocito, cada gamonte o forma sexual entra en una serie de divisiones múltiples o gametogonia (= gamogonia) para originar gametos masculinos -biflagelados- y femeninos -no flagelados -redondeados- (figura 1, fases 7 - 11). Cada par de gametos se fusiona para dar origen a un oociste o forma infecciosa (también la forma de resistencia). Así, el gametocito se transforma en un esporocito, el cual libera cientos de oocistes que van a dar al medio ambiente para reiniciar el ciclo (figura 1, fases 12 - 15). De un oociste (=espora) emergen ocho esporozoitos, pero a veces emergen 16, 32 y hasta 64 esporozoitos a través de canales que salen del oociste, como se ha reportado en *A. Bostrichidorum*, que ejerce una fuerte patogenicidad en *Prostephanus truncatus*.²²

Los esporozoitos pueden ser parásitos intracelulares tempranos, como se observa en *A. taiwanensis* en larvas del mosquito *A. albopictus*, donde no hay una merogonia vegetativa.²³ Sin embargo, en la neogregarina *Ophryocystis electroscirra*, sí existe una merogonia cuando los esporozoitos invaden las células epiteliales de las larvas de *D. plexippus* (la mariposa monarca) para la cual es altamente patogénica. A lo largo de los cinco estadios larvales, los parásitos tienen dos ciclos merogónicos. Después de la pupación, el parásito completa una fase sexual (gametogonia) y forma el oociste alrededor de las escamas de la mariposa en formación en el capullo pupal. La mayor densidad de oocistes se encuentra en el abdomen.²⁴ Otra opción es que los esporozoitos sólo se adhieren a las células epiteliales, como sucede con *G. blattarum* en *Blatella germanica*.²⁵

Rutas de infección para el huésped en el ciclo de transmisión

Las gregarinas son diseminadas en las poblaciones de sus huéspedes mediante ingestión de su fase infecciosa que es el oociste (= espora). Las diferentes rutas que sigue el oociste en el ciclo de transmisión son:

1. Transmisión horizontal (de individuo a individuo por ingestión de la forma infecciosa del parásito, o por infección mediante un vector). Esta ruta es la común en la epizootiología de enfermedades de insectos y tiene tres formas de infección:

- Vía oral desde el agua.- El oociste puede estar en el fondo lodoso de los criaderos larvales de mosquitos, a donde llega al descomponerse el cuerpo de adultos infectados con *Ascogregarina* que mueren sobre la superficie del agua.²⁶ También se ha postulado esta ruta infecciosa para las gregarinas *Monoica apis* y *Apigregarina stammeri*, que reducen la longevidad de la abeja *Apis mellifera* L. en Venezuela.²⁷
- Vía heces fecales.- La infección ocurre por ingestión de heces fecales con oocistes, como sucede con *G. blattarum* en la cucaracha *B. germanica*.²⁵
- Vía presa.- El oociste es ingerido cuando está dentro del cuerpo de su huésped y éste es devorado por algún depredador, el cual termina infectado por la gregarina. Como en los adultos de *E. boreale* (Odonata: Coenagrionidae), donde las hembras se infectan con la gregarina *Hoplorhynchus* spp., cuyos oocistes están adheridos a las patas de moscos *Chironomidae*, presas comunes de Odonata.²¹
- Vía venérea.- *O. electroscirra* también se transmite entre macho y hembra de *D. plexippus* durante la cópula, cuando el macho infectado transmite los oocistes que trae en su aparato reproductor a la hembra sana.²⁸

2. Transmisión vertical o materna (la forma infecciosa del parásito pasa de los padres a la progenie). Usualmente tiene tasas bajas de transmisión en la población huésped, y existe la hipótesis de que

el parásito puede evolucionar hacia la extinción, si infringe algún efecto nocivo (virulento) significativo sobre el huésped.²⁹ Si estos parásitos evolucionan hacia formas benignas, pueden tomar la ruta evolutiva del simbiote. Las modalidades de infección son:

- **Transovum.**- En mosquitos, las hembras también depositan oocistos sobre el corion de los huevos, vía recto, sobre el agua al momento de la oviposición. Los oocistos están en los túbulos de Malpighi, y son desplazados al proctodeo, cuando la hembra contrae los músculos abdominales para ovipositar.¹² Lo mismo pasa para la neogregarina *O. electroscirra* en la mariposa monarca, *D. plexippus*. Los oocistos son transmitidos cuando hembras infectadas diseminan oocistos sobre el corión de los huevos puestos en la superficie de las plantas hospederas (Asclepiadáceas).³⁰
- **Transovárica.**- Una verdadera transmisión vertical o transovárica, ocurre cuando el parásito/patógeno está dentro de los huevos (u oocitos) al momento de la oviposición, y ésta no está documentada para el caso de gregarinas de insectos.

Síntomas y patogenicidad

Las gregarinas de insectos no matan al huésped, salvo en pocas excepciones. Su impacto negativo se expresa sobre el grado de adaptabilidad del huésped, como disminución del tamaño corporal, longevidad y fecundidad. Por lo mismo, el efecto se espera que ocurra a largo plazo en las poblaciones.¹²

Otra cualidad es que tienen un rango estrecho de huéspedes, y la mayoría tiende a tener un huésped específico natural, sobre el cual el efecto patogénico es mínimo. Estudios *in vivo*, inoculando esporozoitos de nueve especies de gregarinas (cuatro especies de *Stylocephalus*, tres de *Xiphoccephalus* y dos de *Cystocephalus*) en el lumen de larvas de ocho especies de *Tenebrionidae* (Coleoptera), demostraron que sólo cinco gregarinas fueron capaces de producir oocistos viables, lo cual confirmó la especificidad de huésped de estos protozoarios.³¹ En cambio, cuando una gregarina infecta de manera cruzada a un huésped no natural o extraño, también se puede observar que el ciclo del parásito se trunca por respuestas inmunológicas del huésped, o, contrariamente, que su patogenicidad se incre-

menta dramáticamente.

A. taiwanensis es un parásito patogénico común en el mosquito *A. albopictus* en Malasia, con una LC_{50} de 3,790.5 oocistos por larva. También *A. culicis* ataca a *A. albopictus* y, aunque produce oocistos viables en este huésped, finalmente lo parasita a tasas más bajas de infección.³²

Para *A. chagasi*, parásita de *L. longipalpis* con transmisión vertical transhuevo, bajo condiciones de insectario, reduce la longevidad y fecundidad de su huésped. En Inglaterra se le considera responsable de la destrucción de las colonias de este díptero. Si se lavan los huevos del huésped con una solución de formol al 0.1%, se eliminan a los oocistos del parásito.³³ Cuando esta gregarina infecta artificialmente a cepas brasileñas (no naturales) del huésped, aunque las tasas de infección son bajas, sí reducen su longevidad en comparación a las cepas colombianas.³⁴

Casos de una alta patogenicidad son descritos para *A. bostrichidorum*, la cual mata a su huésped, el barrenador *Prostephanus truncates*, a cuyas larvas les destruye el epitelio mesentérico.²²

Conclusiones

Las gregarinas entomoparásitas conocidas hasta ahora exhiben baja patogenicidad. Sólo tienen un impacto de debilitamiento en el huésped. Su posible uso como agentes de biocontrol depende de tres aspectos: 1) alta especificidad del huésped; 2) desencadenan reacciones defensivas inmunológicas en el huésped, y 3) carecen de merogonia en el huésped (excepto las neogregarinas). Por lo tanto, su uso en control microbiológico de insectos plaga o vectores, depende de que las investigaciones se enfoquen a: 1) estudiar la patogenicidad de las eugregarinas en huéspedes no naturales; 2) determinar el rango de huéspedes para las neogregarinas conocidas, y 3) llevar a cabo estudios de campo, sobre todo en los trópicos, para buscar especies nuevas de neogregarinas que parasiten insectos plaga u otros insectos nocivos, dado el pobre conocimiento que se tiene de este grupo de entomoparásitos.

Resumen

Se presenta una descripción general de la taxonomía, ciclo biológico, rango de huéspedes y patogenicidad de las gregarinas parásitas de insectos. Se mencionan los factores responsables más importan-

tes que determinan su patogenicidad, usando ejemplos de especies con baja, moderada y alta patogenicidad sobre insectos plaga y vectores de patógenos al hombre. Finalmente, se recomiendan líneas de investigación como una guía para estudios futuros orientados hacia el posible uso de estos protozoarios entomoparásitos en biocontrol.

Palabras clave: Apicomplexa, Gregarina, Entomoparásito, Insecto, Patogenicidad.

Abstract

An overview is presented comprising of taxonomy, biological cycle patterns, host range, and pathogenicity of entomoparasitic gregarines. The most remarkable and responsible factors in determining the extent of pathogenicity are described. Information is based on species with low, middle, and high pathogenicity toward their hosts; their hosts being agricultural pests and human disease vectors. At last, some concepts are suggested as a guide to conduct further research to gather information about the possible use of these entomoparasitic protozoa in biocontrol.

Keywords: Apicomplexa, Gregarina, Entomoparasitic, Insect, Pathogenicity.

Referencias

1. Kudo, R. Protozoology. 4th Edition. Charles C. Thomas, Springfield. 1954. Ill. 1, 174 pp.
2. Butscheli, O. Bron's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs. Leipzig. (1883 – 1889).
3. Lipscomb, D. Broad Classification: The Kingdoms and the Protozoa. En: Eds. J. P. Kreier and J. R. Baker. Parasitic Protozoa. Academic Press, Inc., San Diego, CA., 1991. 2nd Edicion, Vol. I. 277 pp.
4. Levine, N. D. Phylum II. Apicomplexa Levine, 1970. En: An Illustrated Guide to the Protozoa, Eds. John J. Lee, Seymour H. Hunter and Eugene C. Bovee. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. 1985. pp. 322 – 341.
5. Grassé, P. P. Classe des gregarinomorphes (Gregarinomorpha n. nov.: Gregarinae Haeckel, 1866; Gregarinidea Lankester, 1885; gregarines des auteurs). En: Traité de Zoologie, (Ed.) Grassé, P. P., Masson et Cie., Paris, 1953. 1: 550 – 690.
6. Sleigh, M. A. Protozoa and Other Protists. Edward Arnold, London. 1989.
7. Cox, F. E. G. 1991. Systematics of Parasitic Protozoa. En: Eds. J. P. Kreier and J. R. Baker. Parasitic Protozoa, 2nd Edicion vol. I. Academic Press, Inc., San Diego, CA., 277 pp.
8. Whittaker, R. R. H. On the broad classification of organisms. Quart. Rev. Biol. 1959. 34: 210 – 226.
9. Grant, V. The Origin of Adaptations. Columbia University Press, New York. 1963.
10. Carreño, R. A., D. S. Martín and J. R. Basta. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than the coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small – subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 1999. 85: 899 – 904.
11. Schrevel, J. and M. Philippe. The Gregarines. En: Ed. J. P. Kreier. Parasitic Protozoa, 2nd Edicion, vol. 4. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1993. 323 pp.
12. Beier, J. C. and G. B. Craig Jr. Gregarine parasites of mosquitoes. En: M. Laird and J. W. Wiles (Eds.), Integrated Mosquito Control Methodologies, Vol. 2, Biocontrol and Other Innovative Components, and Future Directions. Academic Press, 1985. pp. 167 – 184.
13. Canning, C. U. observations on the life history of *Mattesia tragodermae* sp. n., a Schizogregarine parasite of the fat body of the kharpra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. J. Insect Pathol. 1964. 6: 305 – 317.
14. Ormieres, R., C. Louis, and G. Kuhl. *Mattesia oryzaephili* n. sp. neogregarine parasite d'*Oryzaephilus surinamensis* L., (Colept. Cucujidae): Cycle et action pathogene. Bull. Soc. Zool. 1971. 96: 547 – 556.
15. Åbro, A. The mode of gregarine infection in zygoptera (Odonata). Zool. Scr. 1976. 5: 25–275.
16. Corliss, J. O. Karl G. Grell and the mid – 20th century renaissance of Protozoology in Germany. Protist. 2000. 151: 81 – 94.
17. Reyes-Villanueva, F. Effects of the gregarines *Ascogregarina culicis* (Ross) and *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine) (Apicomplexa: Lecudinidae) upon their corresponding hosts, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse)

- (Diptera: Culicidae) when both species are under larval competition. Ph. D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, FL, 2001a. 78 pp.
18. Walsh, Jr., R. D. and C. S. Gallaway. The fine structure of the gregarine *Lankesteria culicis* parasitic in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. J. Protozool. 1969. 16: 536 – 545.
 19. Lucarotti, C. J. Cytology of *Leidyana canadensis* (Apicomplexa: Eugregarinida) in *Lambdina fiscellaria fiscellaria* larvae (Lepidoptera: Geometridae). J. Invertebr. Pathol. 2000. . 75: 117 – 125.
 20. Bhoopathy, S. Intestinal parasites of some cockroaches. J. Ecobiol. 1996. 8:51-53.
 21. Åbro, A. The gregarine infection in different species of Odonata from the same habitat. Zool. Scr. 1974. 3: 111–120.
 22. Purrini, K. and H. Keil. *Ascogregarina bostrichidorum* n.sp. (Lecudinidae, Eugregarinida), a new gregarine parasitizing the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn (1878) (Bostrichidae, Coleoptera). Archiv fur Protistenkunde. 1989.137: 165-171.
 23. Chen, W. J., S. T. Wu, C. Y. Chow and C. H. Yang. Sporogonic development of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine) (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 1997. 44: 326 – 331.
 24. Leong, K. L. H., H. K. Kaya, M. A. Yoshimura and D. F. Frey. The occurrence and effect of a protozoan parasite, *Ophryocystis elektroscirrha* (Neogregarinida: Ophryocystidae) on overwintering monarch butterflies, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Danaidae) from two California winter sites. Ecol. Entomol. 1992. 17: 338–342.
 25. Clopton, R. E. and R. E. Gold. Host specificity of *Gregarina blattarum* von Siebold, 1839 (Apicomplexa: Eugregarinida) among five species of domiciliary cockroaches. J. Invertebr. Pathol. 1996. 67: 219 – 223.
 26. Reyes-Villanueva, F., J. J. Becnel, and J. F. Butler. Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. J. Invertebr. Pathol. 2001b. 77: 227 – 229.
 27. Stejskal, M. Gregarine des abeilles au Venezuela. Bull. Apicole 1965. 8: 17 – 26.
 28. Altizer, S. M. and K. S. Oberhauser. Effects of the protozoan parasite *Ophryocystis elektroscirrha* on the fitness of monarch butterflies *Danaus plexippus*. J. Invertebr. Pathol. 1999.74: 76–88.
 29. Ewald, P.W. 1983. Host–parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. Annu. Rev. Ecol. Syst. 14: 465–485.
 30. McLaughlin, R. E., and Myers, J. *Ophryocystis elektroscirrha* sp. n. a neogregarine pathogen of the monarch butterfly *Danaus plexippus* (L.) and the Florida queen butterfly *Danaus gilippus berenice* Cramer. J. Protozool. 1970. 17: 300–305.
 31. Patil, C. C., S.D. Amoji and Y. F. Neelgund. Studies on cross infection of cephaline gregarines of tenebrionid insects. Archiv fur Protistenkunde. 1985. 129: 179-182.
 32. Sulaiman, I., A. Saaidah, V. Somasundram and A. R. Aliza. Infection of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with *Ascogregarina* species. Trop. Biomed. 1993. 10: 35-39.
 33. Dougherty, M. J.; R. D. Ward and M. Maroli. Methods of reducing *Ascogregarina chagasi* parasitaemia in laboratory colonies of *Lutzomyia longipalpis*. Proceedings of the First International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Rome, 4-6 September 1991. Parasitologia-Roma. 1991, 33: Suppl. 1, 185-191.
 34. Wu, W. K. and R. B. Tesh. Experimental infection of Old and New World phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) with *Ascogregarina chagasi* (Eugregarinorida: Lecudinidae). J. Med. Entomol. 1989. 26: 237 – 242.