

Morfología del desarrollo larval de *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) en cultivos de citrus de Tucumán

Vaca, Gloria V.; Adriana A. Michel

Instituto de Morfología Animal, Área Zoología, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. Correo electrónico: gwaca@lillo.org.ar; gloriavaca@yahoo.com.ar

► **Resumen** — *Phyllocnistis citrella* es un microlepidóptero que afecta áreas citrícolas del NOA. Sus larvas se alimentan de hojas tiernas formando galerías que disminuyen el crecimiento de la planta y favorecen el desarrollo de enfermedades bacterianas, afectando la producción. Considerando la importancia económica de la actividad citrícola en Tucumán y los daños ocasionados por esta plaga, el objetivo es analizar mediante un estudio histomorfológico el desarrollo larval de *P. citrella* y su efecto en el cultivo, aportando datos para el Manejo Integrado de Plagas. Las larvas se obtuvieron de una quinta de limonero mantenida sin aplicación de insecticidas para control del minador. Se fijaron en Bouin y conservaron en alcohol n-butílico. Se coloreó con Hematoxilina-Eosina. En base al comportamiento alimenticio, la morfología cefálica y longitud del cuerpo se establecen tres estadios. En el segundo estadio las características celulo-tisulares y la presencia de bacterias simbiotes en la luz del intestino indicarían plena funcionalidad del sistema, esto sumado al desarrollo de las fibras musculares esqueléticas abdominales le permitirían alimentarse vorazmente de la hoja, disminuyendo su capacidad fotosintética. Durante el desarrollo larval se observa incremento del cuerpo graso con características citológicas que infieren síntesis lipídica. A partir del tercer estadio las glándulas sericígenas producen abundante secreción acidófila. En el segundo estadio se diferencian testículos unifoliculares y genitales del macho y en el tercero los ovarios con ovariolos en formación. Los resultados obtenidos aportan datos sobre el desarrollo de *P. citrella* en campo y permitirán evaluar en futuros estudios el efecto de los métodos utilizados para el control del minador sobre el desarrollo normal de la especie.

Palabras claves: Minador de los cítricos.

► **Abstract** — “Morphology of larval development of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera, Gracillariidae) in citrus growing of Tucuman”. *Phyllocnistis citrella* is a serious pest in citrus growing of the NOA region. During larval development it feeds on young leaves producing galleries, and constraining trees growth which in turn increases the susceptibility to bacterial diseases, affecting the production. Due to the economic importance of the citric industry in Tucumán and the damage caused by this pest, in the present work, we perform a study on histological larval development of *P. citrella* and its effect on the crop, providing information for integrated pests management programs. The larvae were collected in a lemon growing free from pesticides control of leafminer. They were fixed in Bouin's solution, preserved in n-butyl alcohol and the tissues were stained with Hematoxylin-Eosin. Based on the feeding behaviour, the cephalic morphology and body length of the larvae, three stages were established. In the second stage the cellular-tissue features and the presence of symbiotic bacteria in the intestinal lumen would indicate full system activity that together with development of abdominal skeletal muscles would allow the pest to voraciously eat the leaves causing reduction in photosynthesis. During larval development increase of the fat body and histological feature that allow us to infer lipids synthesis. In the third stage the silk glands produced abundant acidophil secretion. Testes with single follicle and genitalia in second stage and ovaries with growing ovarioles in third stage were differentiated. These results will assess the effect of control methods in the normal development of this species.

Keywords: Citrus leafminer.

INTRODUCCIÓN

Phyllocnistis citrella «el minador de la hoja de los cítricos» fue descrito por primera vez en la India por Stainton en 1856 y posteriormente se amplía su área de distribución a zonas de Asia, Australia, África y diversas islas del pacífico. En América se registra su presencia por primera vez en mayo de 1993 en la región de la Florida, en 1995 en Venezuela y en 1996 se lo ubica en Brasil. Este microlepidóptero invade Argentina en 1995 y se dispersa rápidamente afectando las áreas citrícolas del Norte del país. En la provincia de Tucumán está presente todo el año, afectando especialmente las brotaciones de verano y otoño (Garijo y García, 1994; Robles-González *et al.*, 2005; Casmuz *et al.*, 2007).

P. citrella afecta a las especies del género *Citrus* y a todas las variedades de híbridos y plantas relacionadas con la familia Rutaceae. Durante su estado larval se alimenta del contenido de las células epidérmicas de las hojas recién formadas de los brotes nuevos, formando una mina serpenteante (Sánchez *et al.*, 2002). Esta actividad ocasiona un deterioro del brote joven causando una disminución en el vigor vegetativo del árbol, y por consiguiente en la futura producción (Garijo y García, 1994). Asimismo, este daño directo puede contribuir a la penetración y desarrollo de cáncer de los cítricos ocasionado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Chagas *et al.*, 2001).

Entre los países productores de cítricos, la República Argentina es el octavo productor de cítricos y primer productor de limón, y exporta frutas cítricas frescas, jugos y aceites esenciales desde 1970. El desarrollo de los cultivos de citrus en el país se extiende en 2 regiones: el Noroeste (NOA), donde se producen naranjas, pomelos y limones (principalmente en la provincia de Tucumán), y el Noreste (NEA), donde predominan los cultivos de naranjas y mandarinas (Fuente: Federación Argentina de Citrus, <http://www.federacitrus.org/fruta.asp/>).

Entre las provincias productoras de limón, Tucumán concentra actualmente alre-

dedor del 88% de la producción y el 86% de la superficie total de Argentina destinada al cultivo de limón, lo que posiciona a la provincia como el centro productor más importante de este cítrico. Más del 70% de la producción se destina a la industria, para la elaboración de jugos concentrados, cascara deshidratada y aceites esenciales. El resto se comercializa como fruta fresca para cubrir las demandas del mercado interno y externo (Paredes *et al.*, 2011).

Para la comercialización del limón y de los cítricos en general, la fruta debe cumplir con ciertos parámetros de calidad sanitaria y fitosanitaria que el mercado establece. Las principales plagas y enfermedades cuarentenarias que afectan la producción de cítricos argentinos son la cancrrosis y mancha negra (Ghezán *et al.*, 2010). Si bien *P. citrella* no es considerado un insecto vector de la bacteria responsable de la cancrrosis, las galerías excavadas por las larvas generan nuevos puntos de entradas para la misma, aumentando la incidencia y severidad de esta enfermedad (SINAVEF, 2012).

Los estudios realizados en *P. citrella*, si bien son escasos, la mayoría comprenden diversos aspectos de su biología, ciclo de vida, reproducción, ecología y control de plaga (Garijo y García, 1994; Castillo-Carrillo y Cornejo-Hidalgo, 1995; Rodríguez y Cermeli, 1997; Margaix *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2002). Las características del desarrollo larval establecidas por diferentes autores, se determinaron considerando principalmente la ubicación de la larva en la hoja y la relación entre la región cefálica con el resto del cuerpo larval (Sánchez *et al.*, 2002; Baeza Nahed, 2008; Asplanato, 2009).

El adulto de *P. citrella* es de color blanco y brillo nacarado de 4mm de longitud, las alas son plumosa con franjas oscuras en disposición longitudinal y transversal y una mancha negra en su margen (Garijo y García, 1994).

Los adultos, presentes todo el año en el cultivo, son más activos durante el crepúsculo y el alba y copulan por la noche. La hembra deposita los huevos 24 horas después de

la copula, poniendo mas de 50 huevos durante su vida y hasta 20 por noche. En condiciones de cría la primera cópula se realiza a las 9 o 10 horas de emergencia del imago y la primera puesta a los 4 u 8 días del imago, pudiendo poner más de 70 huevos durante quince días. En condiciones controladas de temperatura la fecundidad media es de 31 huevos por hembra a 20° C y 70 a 25°C. Las hembras presentan una vida mas prolongada que los machos. Los adultos del minador pueden soportar por tiempo prolongado las bajas temperaturas del invierno, sin necesidad de realizar puesta, de modo que cuando las temperaturas les sean favorables y existan brotes receptivos puedan reanudar su ciclo (Beattie, 1992 citado por Margaix *et al.*, 1998; Garijo y Garcia, 1994; Margaix *et al.*, 1998; Beattie y Hardy, 2004).

Los huevos de *P. citrella* son de aspecto lenticular y se localizan en las proximidades de las nervaduras de las hojas. La larva en su primer estadio es translúcida y posteriormente durante el segundo, el tercero y el estadio de prepupa es amarilla. Durante esta última fase el insecto no consume alimento y está abocado a construir una cámara pupal con fibras de seda. La pupa es de tipo obtecta, de forma muy delgada, marrón amarillenta tornándose más oscura con el tiempo (Sánchez *et al.*, 2002).

En condiciones de campo el tiempo de desarrollo de la fase de huevo es de 10 días, del periodo larval es de 12 días y de la fase de pupa es de 16 días; mientras que en condiciones controladas, a una temperatura 27, 6°C y a una humedad relativa de 61,3%, el tiempo de desarrollo de la fase de huevo es de 2 días, del periodo larval es de 4 días y de la fase de pupa es de 6 días. La duración del ciclo de vida es muy variable. Dependiendo de la temperatura, oscila entre 13 y 52 días y durante el invierno, con el descenso de la temperatura, la duración del ciclo puede prolongarse hasta 98 días (Garijo y García, 1994; Sánchez *et al.*, 2002; Goane, 2009).

Teniendo en cuenta la importancia económica que tiene la actividad citrícola en la provincia de Tucumán y los daños ocasionados por esta importante plaga del cultivo de

citrus en la región, el presente trabajo tiene como objetivo realizar un estudio histomorfológico del desarrollo larval de *Phyllocnistis citrella* y su efecto en el cultivo, con el fin de aportar datos para la aplicación de métodos de control de la especie que se enmarquen dentro de un programa de Manejo Integrado del Cultivo dirigido a mejorar la capacidad competitiva del sector.

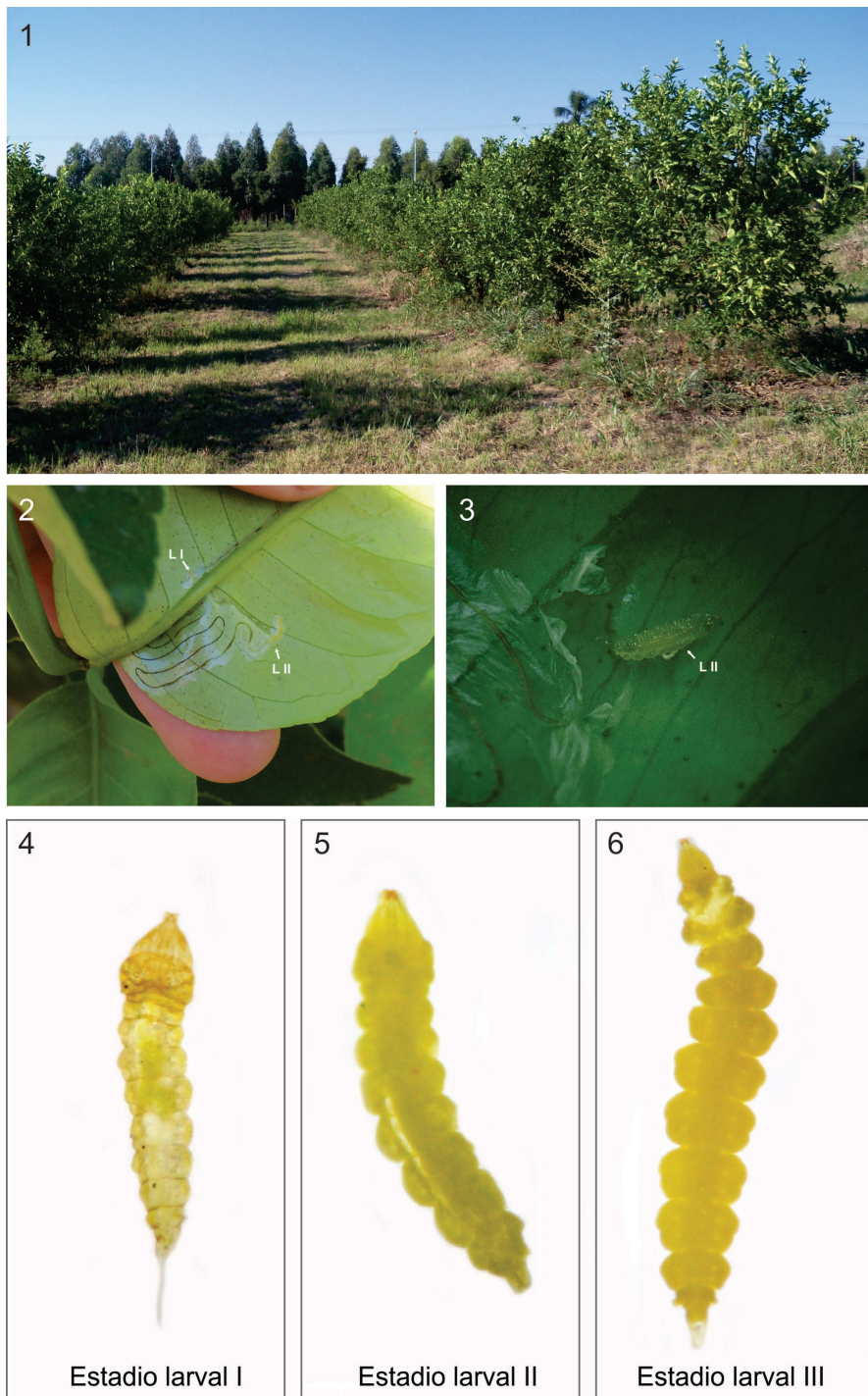
MATERIAL Y MÉTODOS

El material de estudio se obtuvo a partir de hojas colectadas de una quinta de limonero, *Citrus limón* (L), ubicada en calle Constitución 1625 (26°44'39.2"S, 65°14'17.5"W), Departamento Tafi Viejo, Provincia de Tucumán, Argentina, durante los meses de marzo y mayo del 2014; periodo en el cual se registraron valores de temperaturas favorables para el desarrollo de huevos y larvas. Dicha quinta se mantuvo siempre solo bajo condiciones de poda y limpieza de senderos, sin aplicaciones de insecticidas para control del minador (Fig. 1).

Los muestreos se realizaron cada diez días y la toma de muestras se hizo de la siguiente manera: se seleccionaron 10 árboles al azar en distintos puntos del área de muestreo, ubicados tanto en el centro como en los bordes de la quinta; de cada árbol se tomó un brote tierno, extraído del dosel medio de la copa. Las muestras se colocaron en bolsa plásticas y se trasladaron al laboratorio para la identificación y separación de ejemplares de diferentes estadios para el procesamiento con técnicas histológica de rutina (Figs. 2 y 3).

Para la diferenciación y separación de los estadios larvales se analizó bajo lupa tanto el haz como el envés de cada hoja. De las hojas observadas se colectó un total de 87 ejemplares en los diferentes estadios de desarrollo larval (Figs. 4, 5 y 6). Para el estudio histomorfológico se tomaron 23 muestras de tres ejemplares cada una.

Las larvas se fijaron en Bouin (solución acuosa saturada de ácido pícrico, formol puro y ácido acético 70:25:5) durante 24 horas. Se deshidrataron en una batería as-



LAMINA 1. **Fig. 1.** Zona de muestreo, quinta de limoneros, Constitución 1625, Tafí Viejo, Tucumán, Argentina (26°44'39.2"S, 65°14'17.5"W). **Fig. 2.** Brotes tiernos de *Citrus limón* (L) con galerías y larvas en estadio LI y LII de *Phyllocnistis citrella*. **Fig. 3.** Larva LII de *Phyllocnistis citrella* extraída de galería. **Figs. 4, 5 y 6.** Vista dorsal de larvas en estadio LI, LII y LIII de *Phyllocnistis citrella*.

cedente de etanol y se conservaron en alcohol 70° las destinadas para el estudio de la morfología externa y en alcohol n-butílico las destinadas para el estudio histomorfológico. Para dicho estudio, debido al tamaño reducido de las muestras, se realizó un método de doble inclusión en agar-paraplast y se realizaron cortes seriados de $6 \mu\text{m}$ de espesor con orientación sagital y frontal. Los cortes se colorearon con Hematoxilina de Erlich-Eosina.

Las observaciones de morfología externa se realizaron bajo microscopia estereoscópica simple marca Leica EZ4. Las observaciones celulo-tisulares se realizaron en un microscopio fotónico trinocular de alta resolución marca Leica DM2000 y los resultados obtenidos se ilustraron con microfotografías tomadas con una cámara digital incorporada al microscopio marca Leica ICC 5 HD, y las imágenes analizadas con el programa Leica V 4,7. Las medidas promedio de longitud total y del ancho de la región cefálica y torácica de larvas como así también de las gónadas de ambos sexos en los diferentes estadios se determinaron por la observación de cinco (5) ejemplares para cada estadio realizadas con un microscopio ZEISS Lab. A1 utilizando el programa ZEISS 2012 (blue edition) con medidas estandarizadas para diferentes aumentos 5x y 40x (optover 1.0X, cámara Adapter 1.0X). Los preparados histológicos se incorporaron a la Colección de Preparados Histológicos del Instituto de Morfología Animal (FML).

RESULTADOS

En base a observaciones realizadas sobre el comportamiento alimenticio y los cambios en la morfología cefálica y longitud del cuerpo durante el desarrollo postembrionario de *Phyllocnistis citrella* en campo se establecen tres estadios larvales. Mediante el estudio histomorfológico se analizaron los procesos de morfogénesis y las variaciones anatomo-histológicas de órganos y sistemas durante el desarrollo larval de la especie.

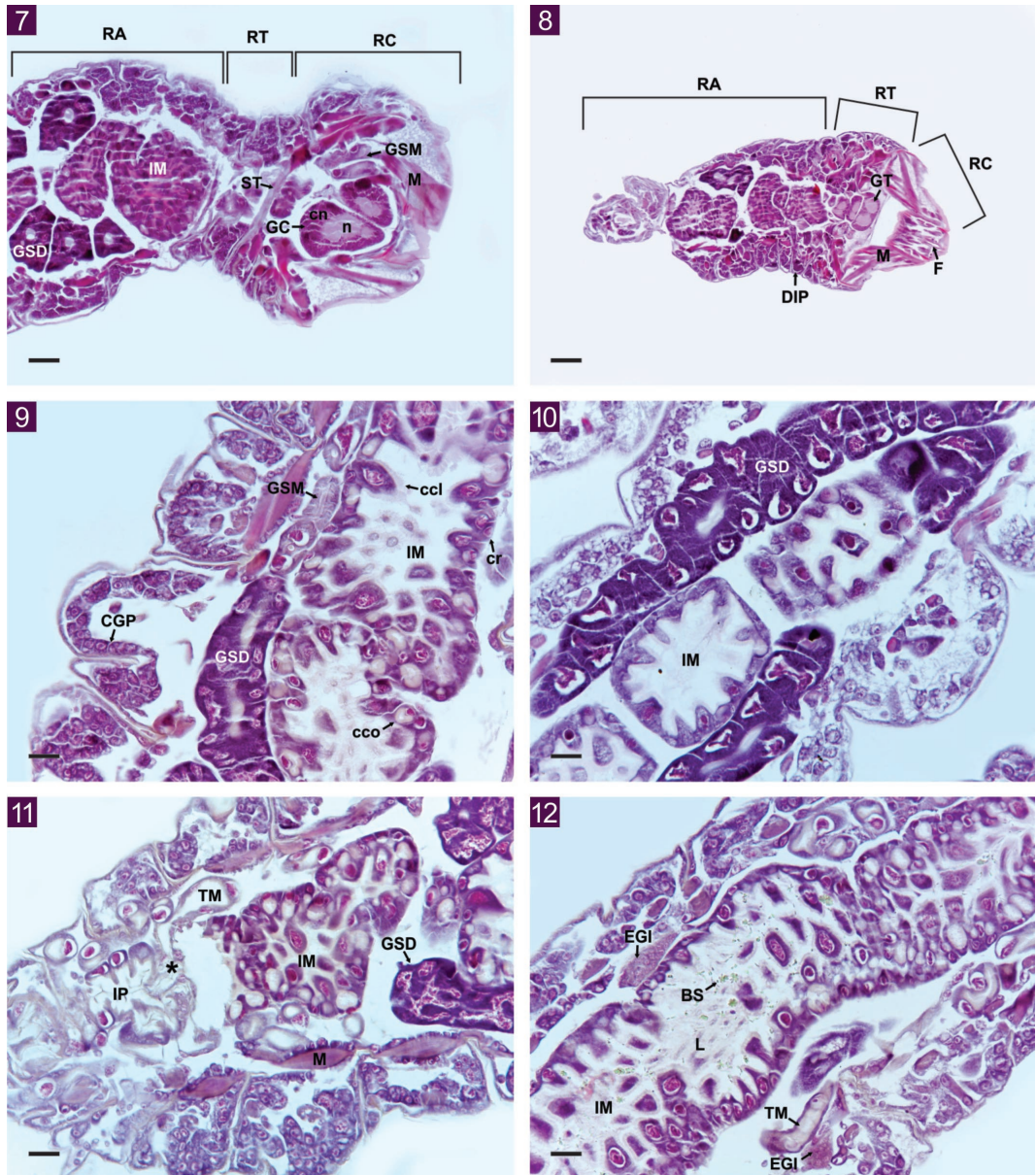
ESTADIO LARVAL I (LI)

Durante el primer estadio las larvas LI de *P. citrella* se ubican cercanas a la nervadura central de las hojas, en galerías rectilíneas que corren paralelas a la misma. La larva del primer estadio es transparente de color verde claro, aplanada dorso-ventralmente y mide en promedio $0,72 \pm 0,02 \text{ mm}$ de longitud. En estas larvas se identifican claramente tres regiones: la **región cefálica** de forma globosa es más ancha que el resto del cuerpo, siendo el ancho de la cabeza de $0,16 \pm 0,04 \text{ mm}$ y del protórax $0,12 \pm 0,02 \text{ mm}$. La **región torácica** constituida por tres segmentos y la **región abdominal** con diez segmentos claramente diferenciados. Durante este estadio en la región cefálica se observan estructuras larvales como el labro de aspecto lobular y un par de antenas cortas (Fig. 4).

Las larvas del primer estadio presentan un **tegumento** constituido por una cutícula elástica, flexible y translúcida, en la cual se diferencia una delgada epicutícula color ámbar y una gruesa procutícula fuertemente acidófila; la cutícula se apoya sobre una delgada epidermis constituida por células cúbicas bajas fuertemente basófilas.

En la **región cefálica** se observa un importante desarrollo de las fibras musculares estriadas intensamente acidófila asociadas a las piezas bucales y las antenas (Fig. 7). El límite entre la región cefálica y torácica está marcado por un delgado surco tegumentario de aspecto granular y color ámbar. En la **región del tórax** se observan dorsalmente los discos imaginales de las alas anteriores y posteriores, mientras que en posición ventral en los segmentos pro, meso y metatorácicos se observan los discos imaginales de las patas. Estos discos se presentan como un leve engrosamiento epitelial de células cilíndricas con citoplasma basófilo y un núcleo en posición central con cromatina condensada intensamente basófilo (Fig. 8).

Tanto en la región torácica como abdominal de estas larvas se observa **cuerpo graso** parietal con una marcada disposición segmentaria y organizado en capas bien delimitadas (Fig. 9). El mismo está constituido



LAMINA 2. **Fig. 7.** Corte frontal de ejemplar en estadio LI. En la región cefálica (RC) se destaca el desarrollo de los ganglios cefálicos (GC) en posición media dorsal, grandes fibras musculares (M) en la zona anterior y posterior de la misma y la región media de la glándula sericígena (GSM) próxima a su desembocadura en la hipofaringe. En los ganglios cefálicos se diferencian la zona de cuerpos neuronales (cn) y del neuropilo (n). Entre región cefálica y torácica (RT) se observa el surco tegumentario (ST) que separa ambas regiones. En la región abdominal (RA) se observa el intestino medio (IM) y la región distal de la glándula sericígena (GSD). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 39 μ m. **Fig. 8.** Corte sagital de ejemplar en estadio LI. En la región cefálica (RC) se observa la desembocadura del intestino anterior a través de la faringe (F) rodeado de grandes haces musculares (M). En la región torácica (RT) se observan tres pares de ganglios torácicos (GT) y los discos imaginales de las patas (DIP). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 79 μ m. **Fig. 9.** Corte sagital de la región abdominal de una larva

por trofocitos con citoplasmas levemente basófilo y núcleos redondeados, en posición central. Asimismo, en estas regiones se observan delgadas **fibras musculares** esqueléticas de estriación oblicua que corren paralelas al tubo digestivo (Fig. 11).

En el primer estadio larval de *P. citrella* el **sistema traqueal** se encuentra en una etapa inicial de su diferenciación, observándose solamente con gran aumento en la región torácica pequeñas traqueolas que rodean los discos imaginales de alas y patas, y pequeños espiráculos en la membrana intersegmentaria de algunos segmentos abdominales.

En estas larvas el **sistema nervioso** está constituido por un par de ganglios cerebrales y tres pares de ganglios torácicos fusionados en la línea media, en los cuales se visualizan claramente la capa de cuerpos neuronales en la periferia y el neuropilo en posición central constituido por una masa de fibras nerviosas levemente acidófilas (Figs. 7 y 8). En larvas que se encuentran al final del primer estadio se puede observar en la región abdominal la presencia de pequeñas masas ganglionares que formarán la cadena ganglionar ventral.

A partir del primer estadio y durante todo el desarrollo larval el **tubo digestivo** es recto y largo, con la abertura bucal y anal claramente visibles y constituido por tres regiones: el **intestino anterior** es un tubo corto, visible a la altura del ganglio del

mesotórax, formado por un epitelio simple de células aplanadas, recubierto por una intina cuticular delgada; el **intestino medio** es largo y de paredes plegadas, abarca desde el primer al octavo segmento abdominal, constituido por un epitelio simple donde se observan varios tipos celulares: a) *células columnares* con microvellosidades apical largas que forman un borde estriado, citoplasma granular levemente basófilo y núcleo esférico de posición central, estas células estarían implicadas en la secreción de enzimas y en la absorción de nutrientes, b) *células en copa* cuya membrana apical con microvellosidades se invagina formando una cámara, poseen escaso citoplasma y núcleo en posición basal, tendrían función secretora y de transporte de iones a través de la pared intestinal y c) *células regenerativas o de reemplazo*, son pequeñas y se las observan en grupo pocos numerosos ubicadas en la base del epitelio, serían las responsables de reemplazar las células que se pierden durante la digestión (Fig. 9); el **intestino posterior** cuyo comienzo está marcado por la inserción de los tubos de Malpighi, presenta diferentes regiones, el *píloro* revestido por un epitelio simple de células aplanadas, el *ilion* y el *colon* que forman una cámara revestida de epitelio simple con células de núcleos grandes y poco citoplasma plegado en la región del colon y, el *recto* también revestido por un epitelio simple de células aplanadas, con un

en estadio LI. Se observa el cuerpo graso parietal (CGP) con disposición segmentaria. En el epitelio que constituye la pared del intestino medio (IM) se destacan células columnares (ccl), células en copa (cco) y células regenerativas (cr). En posición latero-ventral paralelo al tubo digestivo se observan las regiones secretoras media (GSM) y distal (GSD) de las glándulas sericígena. Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 µm. **Fig. 10.** Corte frontal de la región abdominal de una larval en estadio LI. Se observa región secretora distal (GSD) de la glándula sericígena a ambos lados del intestino medio (IM). Coloración: H-E. Escala 1 cm = 20 µm. **Fig. 11.** Corte sagital de la región posterior del abdomen de una larval en estadio LI. Se destaca zona de inserción (✱) de los túbulos de Malpighi (TM) entre el intestino medio (IM) y posterior (IP). Entre el tubo digestivo y el cuerpo graso parietal se observan grandes fibras musculares abdominales (M) y la región distal de la glándula sericígena (GSD). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 µm. **Fig. 12.** Corte sagital región abdominal entre el quinto y séptimo segmento de una larva en estadio LI. En posición dorsal a ambos lados del intestino medio (IM) se observan los esbozos gonadales indiferenciados (EGI) y la región distal de los túbulos de Malpighi (TM). En el intestino medio (IM) se destaca la luz (L) con escaso contenido levemente acidófilo y bacterias simbiotes (BS). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 µm.

delgado recubrimiento cuticular sobre la membrana apical del epitelio (Fig. 11). En la luz del intestino medio se observa escaso contenido levemente acidófilo y bacterias simbiotes (Fig. 12).

A partir del primer estadio larval de *P. citrella*, se identifican seis **túbulos de Malpighi**, los cuales están organizados en tres ramas a cada lado del tubo digestivo, cuyo extremo proximal parte de un tallo común que nace entre la unión del intestino medio y posterior (Fig. 11). Dichos túbulos se identifican como tubos largos y delgados que alcanzan la región torácica y cuyo extremo distal desemboca en la última región del intestino posterior el recto, formando el sistema criptonefridial. Cada túbulo está formado por una capa de células epiteliales gruesas. Estas células presentan un citoplasma levemente basófilo, una membrana apical con borde estriado levemente acidófilo y un núcleo esférico de posición central (Figs. 12 y 16).

La **glándula sericígena** presente desde el primer estadio larval, glándula serosa de secreción continua, está constituida por un par de tubos glandulares largos y sinuosos, que corren latero-ventralmente a lo largo del tubo digestivo (Fig. 10). El extremo proximal de los tubos glandulares se une formando un conducto común cuyas paredes están constituidas por un epitelio cúbico con un delgado recubrimiento cuticular sobre la membrana apical de sus células epiteliales; dicho conducto abre al exterior a través de un pequeño conducto cilíndrico llamado espinerete que desemboca ventralmente en la hipofaringe (Fig. 7).

Morfológica y fisiológicamente en estas glándulas se pueden distinguir tres regiones: la *región distal y media* de función secretora y la *región proximal* que corresponde al conducto secretor. La *región distal* de mayor longitud y diámetro, está constituida por un epitelio simple ligeramente plegado con células cilíndricas bajas, citoplasma granular intensamente basófilo y grandes núcleos purpuras de forma ramificada ubicado en posición basal; las características citológicas del epitelio en esta región de la glándula indicarían activa síntesis proteica y sería la res-

ponsable de la síntesis de fibrina (Fig. 9 y 10). La *región media* es de menor diámetro y está formada por un epitelio cilíndrico simple cuyas células secretoras presentan citoplasma granular levemente basófilo con un núcleo grande basófilo; esta región sería la responsable de la síntesis y almacenamiento de sericina, además de acumular en su luz la fibrina producida por la región distal (Figs. 7 y 9). El paso de la región media a la distal está marcado por un pequeño grupo celular con características citológicas distintas a los epitelios que forman dichas regiones. Este complejo celular se compone de células cúbicas con citoplasma basófilo y núcleo de posición central. La *región proximal* de la glándula es un conducto de pequeño calibre, formado por un epitelio de células aplanadas en cuya membrana apical se observa un delgado recubrimiento cuticular (Fig. 7). En la luz de la región distal y media se observa escaso contenido secretorio levemente acidófilo (Figs. 9 y 10).

En el primer estadio larval de *P. citrella* se observa un par de **esbozos gonadales** indiferenciados, ubicados entre el quinto y séptimo segmento abdominal, en posición dorsal al tubo digestivo. El esbozo gonadal tiene forma de huso con el extremo distal de mayor diámetro y está constituido por una masa de células germinales dispuestas en forma irregular rodeado externamente por una delgada capa de células mesodérmicas que se prolonga en el extremo proximal en un delgado cordón celular. En este estadio el esbozo gonadal mide en promedio 25,18 μm de longitud (Fig. 12).

ESTADIO LARVAL II (LII)

Durante el segundo estadio larval de *P. citrella* se observa un cambio en la dirección de las galerías generadas por las larvas LII, las cuales se alejan de la nervadura principal de la hoja y son de mayor longitud y profundidad, aumentando la superficie expuesta y los daños causados por las mismas.

La larva LII es de color amarillo claro y aplanada dorso-ventralmente, mide en promedio $1,27 \pm 0,01$ mm de longitud. El ancho de la **región cefálica** es similar al del

tórax (en promedio ancho de la cabeza $0,15 \pm 0,01$ mm y del protórax $0,16 \pm 0,02$ mm). En la base de las antenas y de las piezas bucales larvales se observa un engrosamiento epidérmico a partir del cual se formarán los discos imaginales que darán origen a las antenas y las piezas bucales del adulto.

Asimismo, en la **región torácica** se observa una intensa actividad mitótica en los discos imaginales de las alas y patas, que ha producido un importante engrosamiento de los cordones epiteliales y el consecuente inicio de los procesos de invaginación y formación de la cavidad peripodial en los mismos (Fig. 13).

En larvas del segundo estadio se observa un aumento del **cuerpo graso** en la región abdominal, en el cual los trofocitos adoptan forma irregular, con numerosas vacuolas citoplasmáticas y núcleo de forma irregular, otorgando al mismo un aspecto esponjoso. Estos cambios en la morfología del cuerpo graso indicarían una activa síntesis y almacenamiento de lípidos en el citoplasma de las células (Fig. 16).

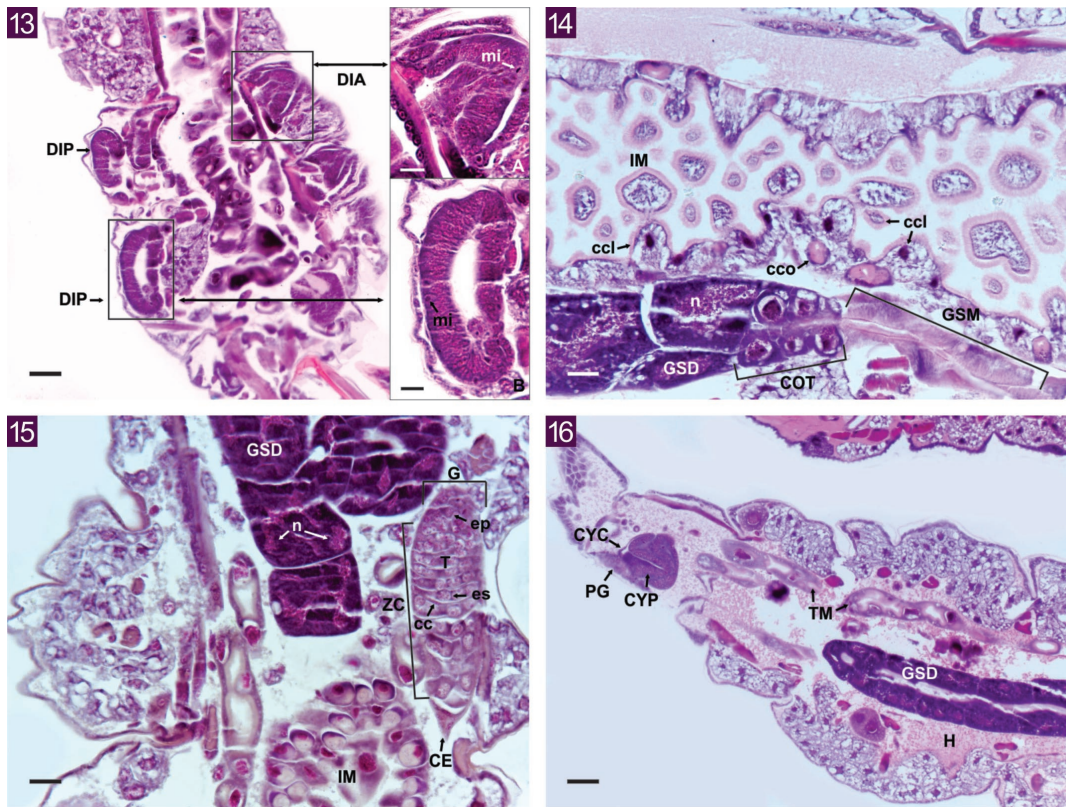
En relación al **sistema traqueal**, en larvas del segundo estadio se identifican externamente desde el primer al noveno segmento abdominal un par de espiráculos por segmento, constituidos por un epitelio de células bajas levemente basófilas con una delgada epicutícula sobre la membrana apical del mismo y externamente en contacto con la membrana basal una delgada capa de fibras musculares. Los espiráculos se continúan internamente con tráqueas de gran diámetro y a nivel de los segmentos meso y metatorácicos, asociadas a los discos imaginales de las alas, se observan tráqueas de pequeño calibre.

Asimismo, en los segmentos abdominales de estas larvas se observa claramente la cadena ganglionar ventral con un par de ganglios en cada segmento fusionados en la línea media y unidos entre sí por delgados cordones nerviosos. Por otra parte, en la región abdominal de larvas del segundo estadio se observa un importante desarrollo de las **fibras musculares** esqueléticas de es-

triación oblicua fuertemente acidófilas, dispuestas entre el intestino medio y el cuerpo graso parietal, y **apodemas intersegmentarios** como puntos de inserción de estas fibras.

A nivel del **tubo digestivo** se observan cambios en las células columnares del **intestino medio**, las cuales muestran un citoplasma basal granular basófilo que indica un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso, el citoplasma apical cargado de grandes vesículas levemente basófilas y alrededor del núcleo se observa un halo blanco que representa la imagen negativa del Golgi; estos cambios probablemente indicarían activa síntesis y almacenamiento de enzimas digestivas. Asimismo, en esta región del intestino se observa un incremento en el número y tamaño relativo de las células en copa. Por otra parte, estas larvas presentan un incremento en el contenido acidófilo y de la flora bacteriana en la luz del intestino medio y por primera vez se observan bacterias simbiotas en la luz del **intestino posterior** (Fig. 14).

En el segundo estadio larval se observa un aumento del diámetro de la **glándula sericígena**. La *región distal secretora* es de mayor longitud y ocupa gran parte de la cavidad abdominal, con un diámetro mayor que el resto de la glándula. Durante este estadio adquiere importancia, por su marcada acidofilia, la íntima cuticular que recubre el epitelio de la región media. En esta región las células secretoras presentan un citoplasma granular levemente basófilo y un núcleo intensamente basófilo en posición central, mientras que en las células epiteliales secretoras de la región distal que presentan iguales características citoplasmáticas, el núcleo se vuelve ramificado presentando un halo blanco alrededor del mismo, lo que pondría en evidencia un importante desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y del complejo de Golgi. El lumen de la región distal presenta escaso material secretorio levemente acidófilo. Estas características citológicas indicarían una activa síntesis proteica en la región distal de las glándulas sericígenas (Figs. 14 y 15).



LAMINA 3. **Fig. 13.** Corte sagital de región torácica de una larva en estadio LII. Se destacan ventralmente los discos imaginales de las patas (DIP) y dorsalmente los discos imaginales de las alas (DIA). En las Fig. A y B se observa con mayor aumento las figuras mitóticas (mi) en las células epiteliales de discos imaginales de alas y patas. Coloración: H-E. Escalas Fig. 13: 1 cm = 39 μ m y Figs. A y B 1 cm = 12 μ m. **Fig. 14.** Corte sagital de región abdominal de larva en estadio LII. Se destaca en el intestino medio (IM) las células columnares (ccl) con citoplasma vacuolar basófilo y largas microvellosidades acidófilas y las células en copa (cco) con un depósito de secreción intensamente acidófilo. Se observan las diferentes regiones secretoras de la glándula sericígena (GS), destacándose el complejo celular (COT) ubicado entre las regiones secretoras media (GSM) y distal (GSD) de la glándula. En la región distal de la glándula sericígena se destaca además el núcleo ramificado (n). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 μ m. **Fig. 15.** Corte sagital de región abdominal de larva macho en estadio LII. Se observa un testículo (T) dorsal al intestino medio (IM) que se prolonga en su extremo proximal en el esbozo del conducto eferente (CE). En el folículo testicular se identifica en el extremo distal el Germario (G) con espermatogonias primarias (ep) y la Zona de Crecimiento con espermatogonias secundarias (es) agrupadas en cistos por células capsulares (cc). En las células epiteliales de la región secretora distal (GSD) de la glándula sericígena se destacan los núcleos ramificados (n). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 μ m. **Fig. 16.** Corte sagital del extremo posterior de la región abdominal de larva macho en estadio LII. Se observa placa genital (PG), el esbozo del conducto eyaculador común (CY) y su bifurcación en los conductos eyaculadores pares (CYP). Limitado por cuerpo graso parietal se observa el extremo distal de un túbulo de Malpighi (TM), la región distal de la glándula sericígena (GSD) y la hemolinfa (H). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 39 μ m.

En las larvas LII se observan importantes cambios en el desarrollo del **aparato reproductor**, ya que se produce la diferenciación sexual de la gónada y se diferencian estructuras del aparato reproductor que permiten identificar el sexo en la larva. En larvas machos se identifican los testículos, los esbozos de los conductos eferentes, la porción gonádica de los conductos deferentes y los esbozos de las glándulas accesorias y de las diferentes estructuras que formaran la genitalia externa del macho (Figs. 15 y 16).

En estas larvas el **testículo** está constituido por un solo folículo que en promedio mide $73,79 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de longitud y en él se identifica claramente en la región distal el *Germario* con espermatogonias primarias dispuestas irregularmente en activa división y en la región media y proximal la *Zona de Crecimiento* con espermatogonias secundarias agrupadas en cistos limitados por células capsulares (Fig. 15). Externamente el testículo está recubierto por una delgada vaina de células mesodérmicas que se prolonga en el extremo proximal formando un corto cordón que corresponde al esbozo del **conducto eferente** y la porción extragonádica del **conducto deferente**. Asimismo, en la región posterior del abdomen, ventralmente en el noveno segmento abdominal, se observa una invaginación ectodérmica media ventral que corresponde a la **cavidad genital** del macho revestida por una gruesa epidermis en activa división. La cavidad genital se prolonga interiormente en un corto conducto que corresponde al esbozo del **conducto eyaculador común**, el cual en su extremo distal se bifurca en dos cortas ramas que corresponden a los **conductos eyaculadores pares** (Fig. 16).

ESTADIO LARVAL III (LIII)

Durante el tercer estadio las larvas de *P. citrella* generan galerías excavadas en las hojas de los citrus, de recorrido sinuoso y dirigido hacia el borde de la hoja, lo que permite un fácil reconocimiento de las mismas. Las larvas LIII son de coloración amarillo verdoso y el cuerpo comienza a adquirir una ligera forma cilíndrica, alcanzando una

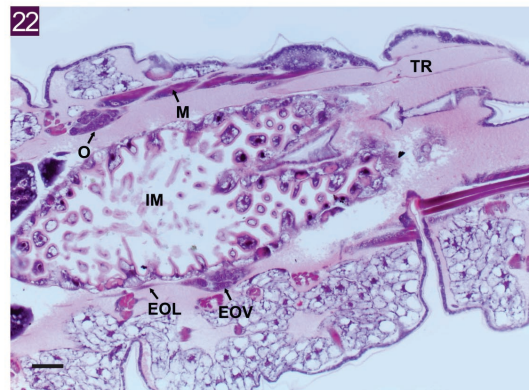
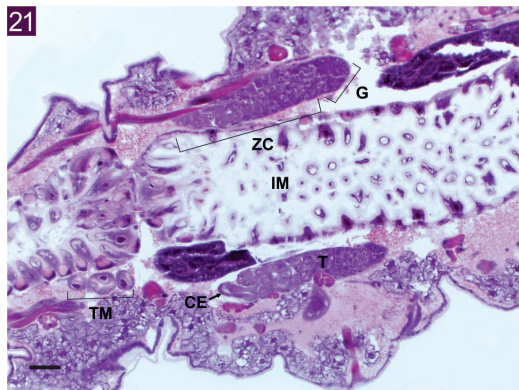
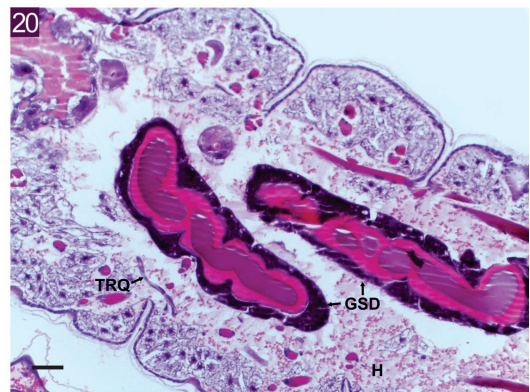
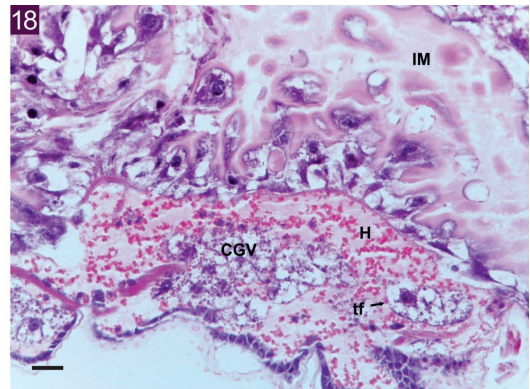
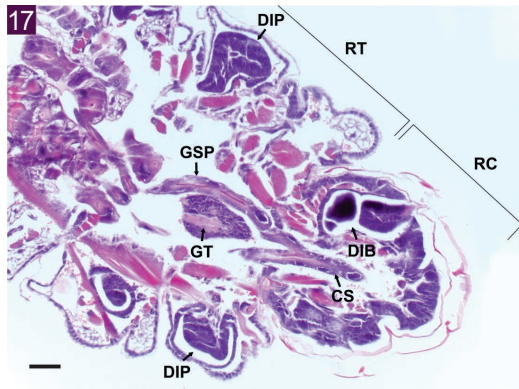
longitud promedio de $3,89 \pm 0,01 \text{ mm}$. Durante este estadio se observa una notable reducción de la región cefálica en relación al resto del cuerpo, siendo el ancho de la cabeza en promedio de $0,08 \pm 0,01 \text{ mm}$ y del protórax de $0,14 \pm 0,04 \text{ mm}$.

En estas larvas la **región cefálica** adquiere forma aguzada y se observa una importante actividad mitótica en las células epiteliales de los discos imaginales de las antenas y del aparato bucal, las cuales proliferan e invaden el interior de dichas estructuras (Fig. 17).

En la **región torácica** los cordones epiteliales de los discos imaginales de las patas, cuyas células se observan también en activa división mitótica, se disponen formando círculos concéntricos que darán origen a los segmentos de dicho apéndice. Mientras que los cordones epiteliales que forman los esbozos alares, ubicados dorsalmente y en activa proliferación celular, adquieren forma alargada (Fig. 17). Por otra parte, en la **región abdominal** de larvas del tercer estadio se observa un incremento de grandes haces de **fibras musculares** esqueléticas de estriación oblicua intensamente acidófilas que se insertan en grandes **apodemas intersegmentarios** (Figs. 17 y 22).

En estas larvas se observa un importante desarrollo del **cuerpo graso parietal** y en los trofocitos, de gran tamaño, se observa un incremento en número y tamaño de las vacuolas citoplasmáticas que le dan un aspecto esponjoso, lo que indicaría una activa síntesis y almacenamiento de lípidos. El núcleo de estas células, de forma irregular y tamaño reducido, presenta un macronúcleo en posición central. Asimismo, en larvas del tercer estadio se diferencia el **cuerpo graso visceral** constituido por pequeñas masas de trofocitos, con citoplasma basófilo cargado de vacuolas, que se distribuyen en forma irregular en la cavidad abdominal, principalmente alrededor de las gónadas y el tubo digestivo (Fig. 18).

Por otra parte, es importante desatacar que en larvas del tercer estadio la **hemolinfia** de la cavidad abdominal, en íntimo contacto con el cuerpo graso visceral que



LAMINA 4. **Fig. 17.** Corte frontal de la región anterior de una larva en estadio LIII. En la región cefálica (RC) se observan discos imaginales de las piezas bucales (DIB) y el extremo proximal de los tubos glandulares de la glándula sericígena (GSP) que se unen al conducto secretor (CS) que abre ventralmente en esta región. En la región torácica (RT) se observan los discos imaginales de las patas (DIP) y los ganglios torácicos (GT). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 39 μ m. **Fig. 18.** Corte sagital de la región abdominal de una larva en estadio LIII. Se destaca el cuerpo graso visceral (CGV) próximo al intestino medio (IM) constituido por trofocitos de citoplasma vacuolar (tf). En esta región la hemolinfa (H) se observa cargada de grandes vesículas acidófilas. Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 μ m. **Fig. 19.** Corte sagital de la región abdominal de larva en estadio LIII. Se observa el cuerpo graso parietal (CGP) en contacto con la epidermis, constituido por trofocitos (tf) con citoplasma cargado de grandes vacuolas lipídicas que forman una masa de contorno irregular. Se destaca además la presencia de grandes enocitos (en) próximos al cuerpo graso con citoplasma va-

rodea a las gónadas y la porción secretora de las glándulas sericígenas, está cargada de pequeñas vesículas intensamente acidófilas; lo que indicaría un elevado contenido de sustancias proteicas en la composición de la misma (Fig. 18). Asimismo, inmersos en la hemolinfa y próximos al cuerpo graso parietal se observan numerosos **enocitos** solitarios de gran tamaño, cuyo citoplasma perinuclear es granular basófilo y el resto acidófilo con grandes vacuolas. El núcleo de estas células es esférico purpura en posición central y en algunos casos rodeado de un halo blanco en la zona perinuclear (Fig. 19).

A partir de este estadio en el **sistema traqueal** se identifican, tanto a nivel del tórax como del abdomen, traqueolas que se presentan como finas ramificaciones tubulares constituidas por un delgado epitelio de células basófilas. Estas ramificaciones se observan próximas a las fibras musculares, al intestino medio y a las regiones secretoras de las glándulas sericígenas (Fig. 20).

En larvas del tercer estadio, a nivel del **sistema nervioso** se observa un aumento de tamaño de las masas ganglionares y ligera separación de los lóbulos ganglionares de la región cefálica y torácica (Fig. 17).

En larvas LIII se observan cambios a nivel del **tubo digestivo**, ya que el intestino medio presenta un epitelio de menor espesor

que en los estadios anteriores y su luz está cargada de un contenido acidófilo de mayor intensidad que en estadios anteriores. Asimismo, se observan variaciones en las características citológicas de las células que lo componen: las *células columnares* presentan un aumento en el número y longitud de las microvellosidades, las cuales están recubiertas por un grueso glucocalix que le confiere una intensa acidofilia a la membrana apical del epitelio en esta región, el citoplasma basófilo está cargado de vacuolas y el núcleo se ubica en posición basal; mientras que en las *células en copa* se observa un importante depósito de material de secreción acidófilo en el citoplasma apical y el núcleo de menor tamaño en posición basal (Fig. 22).

En el tercer estadio larval se observa un importante aumento de espesor de las paredes de los **túbulos de Malpighi**, las células epiteliales son cilíndricas, con citoplasma vacuolado levemente basófilo, un núcleo grande y esférico de posición central y largas microvellosidades en la membrana apical del epitelio que forman un ribete en cepillo intensamente acidófilo (Fig. 21).

En larvas fijadas al comienzo de este estadio las **glándulas sericígenas** conservan las características histológicas presentes en el estadio anterior. Mientras que en una etapa más avanzada del tercer estadio larval de *P. citrella* el epitelio de la región distal de

cuolar intensamente basófilo y la abertura de una tráquea (TR) a través del espiráculos (E). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 20 μ m. **Fig. 20.** Corte sagital de la región media abdominal de una larva en estadio LIII. Se observa el extremo secretor distal de la glándula sericígena (GSD) cuya luz está cargada de secreción con dos componentes intensamente acidófilos, se destaca además la hemolinfa (H) cargada de vesículas acidófilas y segmentos de finas traqueolas (TRQ). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 39 μ m. **Fig. 21.** Corte sagital de la región abdominal de una larva macho en estadio LIII. Se observa un par de testículos (T) a ambos lados del intestino medio (IM). En el folículo testicular se identifica el Germario (G) y la Zona de Crecimiento (ZC) y en su extremo distal los esbozos de los conductos eferentes (CE). Se observa además el extremo distal de los túbulos de Malpighi (TM) próximos al intestino medio (IM). Coloración: H-E. Escala: 1 cm = 39 μ m. **Fig. 22.** Corte frontal de región abdominal de una larva hembra en estadio LIII. Dorsalmente a ambos lados del intestino medio (IM) se destaca un par de ovarios (O) en los que se observan los esbozos de ovariolas (EOV) y externamente al ovario una delgada capa de células mesodérmicas que se prolongan en el extremo proximal formando el esbozo del oviducto lateral (EOL). Rodeando al tubo digestivo se observan haces de fibras musculares (M) y grandes tráqueas (TR). Coloración: H-E. Escala 1 cm = 39 μ m.

la glándula es intensamente basófilo, con límites celulares poco claros y presenta numerosas vacuolas ubicadas en la región apical de las células, observándose abundante secreción acidófila acumulada en la luz de esta región. En larvas fijadas al final del tercer estadio se observa un importante adelgazamiento del epitelio glandular de la región distal de la glándula y abundante secreción acidófila acumulada en la luz de la misma. La secreción acumulada en la luz de la región distal presenta dos componentes: a) un componente periférico, en contacto directo con la membrana apical del epitelio, constituido por una secreción homogénea intensamente acidófila; b) un componente central de secreción levemente acidófila. Mientras que en la región proximal y media de la glándula solo se observa un notable incremento en el diámetro y en la luz de ambas regiones escasa secreción levemente acidófila. En larvas del tercer estadio se observa un delgado revestimiento cuticular por encima de la membrana apical del epitelio que reviste la luz de la región proximal o conducto secretor y la región media secretora de la glándula sericígena (Figs. 17 y 20).

En relación al **aparato reproductor**, durante el tercer estadio en **larvas macho** no se observan cambios significativos en el desarrollo de la espermatogénesis, ya que la gónada masculina conserva las características citológicas observadas en el segundo estadio larval; sin embargo, en los testículos de estas larvas se observa una activa división de las espermatogonias secundarias y como consecuencia de esto un crecimiento en longitud del folículo que alcanza en promedio los $117,96 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de longitud (Fig. 21). Por otra parte, en este estadio en **larvas hembras** se observa un par de **ovarios** de forma alargada que miden en promedio $32,67 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de longitud; estos se ubican en posición dorsal al intestino medio, entre el quinto y sexto segmento abdominal. Cada ovario está constituido por un grupo de pequeñas ovogonias, de citoplasma claro y núcleo grande con cromatina condensada, rodeadas por una delgada capa de células mesodérmicas que se prolonga en el extremo

proximal de cada ovario en un largo cordón de tejido conectivo que corresponde a la porción extragonádica de los **oviductos laterales**. En larvas fijadas en una etapa más avanzada del tercer estadio se observa que los ovarios están compartimentalizados en pequeñas **ovariolas** en formación, limitadas por una delgada capa de células mesodérmicas; identificándose claramente cuatro ovariolas en diferente grado de desarrollo constituidas por ovogonias, la mayoría de las cuales se encuentran en interfase y profase mitótica y un número reducido de las mismas en metafase y anafase (Fig. 22).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se aportan datos para un mejor conocimiento del desarrollo larval de *Phyllocnistis citrella* en campo sin aplicación de métodos de control para la especie. Los resultados obtenidos permitirán evaluar en posteriores investigaciones el efecto producido por los métodos utilizados para el control del minador sobre el desarrollo normal de la especie.

En referencia al número de estadios larvales de *P. citrella*, en base a las observaciones realizadas sobre el comportamiento alimenticio de las larvas visible a través de la epidermis de las hojas y en particular sobre los cambios en la morfología externa e interna de la región cefálica como así también de los procesos de morfogénesis y las variaciones anatomo-histológicas de órganos y sistemas observadas durante el desarrollo larval, coincidimos con Sánchez *et al.* (2002) en que *P. citrella* durante el desarrollo postembrionario pasa por tres estadios larvales. La relación existente entre el ancho de las regiones cefálica y torácica en los diferentes estadios larvales y los cambios histomorfológicos observados en la región cefálica durante los mismos permiten diferenciar y separar claramente para esta especie la etapa larval en tres estadios.

Sin embargo, Garijo y García (1994) y Vargas *et al.* (1998) mencionan para esta especie cuatro estadios larvales, incluyendo la prepupa. Teniendo en cuenta que según

Chapman (1969), Leftwich (1976), Gillot (1980), Wigglesworth (1984), Monteresino y Manfrini de Brewer (2001) la prepupa es un estadio de quietud entre el final del periodo larval y la pupa propiamente dicha durante el cual el insecto no se alimenta, en base a nuestras observaciones consideramos que en *P. citrella* la prepupa es la etapa inicial del estadio de pupa, estadio en el cual como en otros insectos holometábolos se dan los procesos de la metamorfosis.

En relación al desarrollo del sistema muscular, en *P. citrella* las fibras musculares esqueléticas abdominales se desarrollan gradualmente durante los diferentes estadios larvales, lo cual se ve reforzado a partir del segundo estadio larval por el desarrollo de apodemas intersegmentarios que fortalecen la unión de los músculos con la cutícula; permitiéndole a la larva mayor agilidad y desplazamiento en el interior de la mina.

En cuanto al desarrollo del tubo digestivo, a partir del primer estadio larval presenta abertura bucal y anal claramente visibles y está constituido por un intestino anterior, medio y posterior bien diferenciados, con un contenido acidófilo en la luz de estas regiones que aumenta progresivamente a lo largo del desarrollo larval.

Al igual que en otras larvas de lepidópteros como lo mencionan Srivastava (1959) para *Leucinodes orbonalis* y Correia *et al.* (2009) para *Spodoptera frugiperda*, el epitelio del intestino medio de *Phyllocnistis citrella* está constituido por tres tipos de células: columnares, en copa y regenerativas. En referencia al tipo de secreción de las células columnares, Santos (1984 citado por Cavalcante y Cruz-Landim, 1999) menciona para la especie de Lepidoptera *Cassava hornworm*, secreción de tipo apocrina para estas células. Las características morfológicas observadas en las células columnares del intestino medio de *P. citrella* durante el desarrollo larval sugieren secreción de tipo merocrina.

Teniendo en cuenta que según Cavalcante y Cruz-Landim (1999) y Correia *et al.* (2009) el epitelio del intestino medio tiene como función primordial la digestión y absorción de nutrientes como así también la

producción y secreción de enzimas digestivas, los cambios en la morfología de las células epiteliales del intestino medio y el aumento en número de las mismas observados durante el desarrollo larval de *P. citrella* en el campo, indicarían que el aparato digestivo de esta especie alcanza su máxima funcionalidad durante el segundo estadio larval; ya que las características citológicas del epitelio del intestino medio observadas a partir del segundo estadio sugieren actividad de absorción de nutrientes por parte de las células columnares y de secreción de mucus para la protección epitelial y enzimas para el mantenimiento del equilibrio químico del proceso digestivo por las células en copa. Asimismo, las bacterias simbiotas observadas tanto en la luz del intestino medio como del posterior contribuirían a una mayor eficiencia de las enzimas digestivas segregadas por las células epiteliales responsables de la degradación de proteínas y polisacáridos y por ende de los procesos digestivos antes mencionados; lo cual se ve corroborado por el aumento en la cantidad y acidofilia del contenido de la luz del mismo. Este aumento de eficiencia de los procesos digestivos por acción de bacterias simbiotas en el intestino observado durante el desarrollo larval de *P. citrella* también fue mencionado por Pilon *et al.* (2013) en sus estudios realizados sobre la actividad proteolítica de las bacterias intestinales de *Anticarsia gemmatalis*.

Estas modificaciones en el tubo digestivo sumado a una mayor capacidad de desplazamiento de las larvas en el interior de las minas indicado por el desarrollo de las fibras musculares esqueléticas abdominales le permitiría a la larva de *P. citrella* alimentarse vorazmente del mesófilo de las hojas a partir del segundo estadio larval, lo que se evidencia por un aumento en la longitud de la galería excavada; lo cual produce reducción en la superficie foliar y por ende ocasiona disminución de la capacidad fotosintética de la hoja y en la productividad de la planta. Estos resultados coincidirían con las observaciones de Asplanato (2009) para esta especie, quien sostiene que la larva de *P. citrella* se alimenta de las células epidérmicas

desplazándose por movimientos laterales y hacia delante de la región cefálica y el contenido de las células destruidas es consumido por la larva a través de una activa succión. Los excrementos del insecto se acumulan en forma de una línea visible en el centro de la mina, primero son blanquecinos y luego se oscurecen. A partir del segundo estadio larvario la mina se ensancha, adquiere la forma sinuosa característica y puede llegar a ocupar gran parte del limbo.

Durante el desarrollo larval de *P. citrella* se pueden diferenciar dos tipos de cuerpo graso: 1) un cuerpo graso parietal claramente visible a partir del primer estadio larval con una ubicación bien definida entre la epidermis y las fibras musculares abdominales, 2) un cuerpo graso visceral que se diferencia a partir del tercer estadio larval en forma de pequeñas masas que rodean en forma aislada al tubo digestivo. Ambos tipos de cuerpo graso incrementan gradualmente durante el desarrollo larval y este aumento va acompañado de un aumento de tamaño de los trofocitos y de una progresiva vacuolización del citoplasma que indicaría una activa síntesis y almacenamiento de lípidos, como lo demuestran las variaciones celulo-tisulares observadas a lo largo de los diferentes estadios larvales de la especie.

Esta clara identificación de dos tipos de cuerpo graso y la variación en la diferenciación de los mismos durante el desarrollo larval de *P. citrella*, coinciden con lo observado para otras especies de Lepidóptera como lo mencionan Haunerland y Shirk (1995) al analizar el desarrollo del cuerpo graso de *Helicoverpa zea* y Carvalho *et al.* (2013) en el análisis realizado sobre la histología y ultraestructura del cuerpo graso en el cuarto estadio larval de *Anticarsia gemmatalis*. Asimismo, el incremento gradual de ambos tipos de cuerpo graso acompañado de una activa síntesis y almacenamiento de lípidos también fue observado por Marques-Silva *et al.* (2003) para la especie *Thyrintina arnobia arnobia* y por Carvalho *et al.* (2013) para *Anticarsia gemmatalis*; mientras que Snodgrass (1935) también menciona que en algunos insectos en el periodo inicial del

desarrollo postembrionario los trofocitos almacenan material graso en su citoplasma en forma de glóbulos de grasa y en células maduras los glóbulos de grasa se vuelven más grandes y ocupan la mayor parte de la célula y los núcleos a menudo se deforman por la presión de los mismos. Estos resultados nos permiten concluir que durante la fase larval, periodo de intenso crecimiento, en *P. citrella* al igual que otros insectos holometábolos, el cuerpo graso sintetiza y almacena reservas, en preparación para la fase de pupa, periodo en la cual el insecto no se alimenta y donde ocurre un gran consumo de energía. Sin embargo, aunque coincidimos con Cruz-Landim (1983) en que el aumento del cuerpo graso durante el desarrollo larval es debido a un aumento en tamaño de los trofocitos, nuestras observaciones indicarían que durante el desarrollo larval de *P. citrella* en el cuerpo graso se sintetizan y almacenan solo lípidos. Asimismo, considerando que en larvas del tercer estadio de esta especie la hemolinfa está cargada de vesículas con un alto contenido de sustancias proteicas, podemos inferir que en *P. citrella* la síntesis y almacenamiento de proteínas y glucógeno en el cuerpo graso se produce posteriormente en el estadio de prepupa y no durante el desarrollo larval como lo menciona dicha autora para el himenóptero *Melipona quadri-fasciata anthidioides*.

Las diferencias observadas en la composición de los productos que se sintetizan y almacenan en el cuerpo graso de *Phyllocnistis citrella* con especies de otros grupos de insectos, nos sugiere la necesidad de realizar posteriores estudios con técnicas histoquímicas para determinar la composición química de las reservas almacenadas en el cuerpo graso durante el desarrollo postembrionario del minador, porque el mismo tiene influencia directa en el desarrollo de la especie en el cultivo.

En *Phyllocnistis citrella* durante el tercer estadio larval, etapa final del desarrollo en la cual la larva aún se alimenta vorazmente de la hoja, se observa un importante aumento de componentes proteico en la hemolinfa. Estas observaciones coincidirían con los con-

ceptos establecidos por Chapman (1969), quien sostiene que en Lepidoptera e Hymenoptera al final del desarrollo larval la concentración de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa es mayor que en otros grupos de insectos. Asimismo, considerando las características celulo-tisulares observadas en el cuerpo graso en los diferentes estadios larvales de *P. citrella*, coincidimos con Locke y Collins (1968), Chapman (1969), Cruz-Landim (1983) y Lakshmi Devi y Yellamma (2013) en que las proteínas y aminoácidos almacenados en la hemolinfa al final del desarrollo larval podrían ser utilizadas por los trofocitos del cuerpo graso para la síntesis de nuevas proteínas en respuesta a los requerimientos metabólicos del insecto para la metamorfosis.

Numerosos autores han estudiado en insectos el origen, función y relación de los enocitos con otros tejidos principalmente la epidermis y el cuerpo graso, entre estos podemos citar a Chapman (1969) quien sostiene que los «enocitos» son células que permanecen cercanas a su punto de origen cerca de la epidermis y Snodgrass (1935) y Roma *et al.* (2010) quienes mencionan que estas células se ubican debajo de la epidermis aisladas o en pequeños grupos cercanos a espiráculos y tráqueas; Martins y Ramalho-Ortigão (2012) al igual que los anteriores autores sostienen que los enocitos son células de origen ectodérmico y que usualmente se las encuentra asociadas a la epidermis o al cuerpo graso o a ambos tejidos dependiendo de la especie y del estado de desarrollo de la misma. En relación a la función de los enocitos, los autores antes mencionados concuerdan en que no está bien definida su función pero todos sugieren que estas células en insectos inmaduros están asociadas con los ciclos de muda y probablemente relacionadas con la secreción de lípidos o lipoproteínas de la epicutícula y en la síntesis de precursores de la cera.

Durante el desarrollo larval de *Phyllocnistis citrella*, los enocitos de esta especie se ubican próximos a la epidermis y en íntima relación con el cuerpo graso parietal, presentando en el tercer estadio larval caracte-

rísticas citológicas que indicarían que la función de los mismos durante el desarrollo larval estaría relacionada con la secreción de lípidos o lipoproteínas que participarían en la formación de la epicutícula y en la síntesis de precursores de la cera en estadios posteriores de su desarrollo. Teniendo en cuenta que la función de estas células aún no ha sido claramente definida, se cree que es necesario realizar en el futuro estudios con técnicas histoquímicas que permitan determinar claramente la función de los enocitos durante el desarrollo postembrionario en *P. citrella*.

En relación al número, estructura y disposición de los túbulos de Malpighi y su relación con la formación del sistema criptonefridial observados a partir del primer estadio larval de *P. citrella*, nuestros resultados coinciden con lo mencionado por Snodgrass (1935) y Chapman (1969) quienes mencionan igual características para esta condición del sistema criptonefridial en larvas de Lepidoptera y Coleóptera, como así también lo menciona Srivastava (1959) en su estudio sobre la morfología del canal alimenticio de larva de *Leucinodes orbonalis* (Lepidoptera, Pyraustidae) y Srivastava y Khare (1966) al estudiar el desarrollo de los túbulos de Malpighi y estructuras asociadas en *Philosamia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae).

Las características histomorfológicas determinadas para las diferentes regiones de las glándulas sericígenas a partir del primer estadio larval de *P. citrella* coinciden con las observadas por Tanaka (1911), Takahashi *et al.* (1990), Barsagade y Tembhare (2000) y Marchi *et al.* (2009) para otras especies de Lepidoptera. Sin embargo, el estudio histológico de la glándula sericígena de *P. citrella* realizado en el presente trabajo revela que el paso de la región secretora media a la distal de la glándula en esta especie está marcado por la presencia de un pequeño grupo celular con características citológicas distintas a los epitelios que conforman dichas regiones. Estos resultados no fueron mencionados con anterioridad por otros autores ni para Lepidoptera ni para otros grupos de insectos.

Asimismo, durante los diferentes estadios

larvales de *P. citrella* los epitelios de la región secretora de las glándulas sericígenas manifiestan cambios morfológicos que sugieren síntesis proteicas, alcanzando la glándula su mayor desarrollo durante el tercer estadio larval. Estos resultados coinciden con los de Tanaka (1911), Tashiro *et al.* (1968) y Barsagade y Tembhare (2000) quienes analizaron la estructura, el desarrollo, la actividad secretora de la glándula y la naturaleza química de la seda producida por *Bombyx mori* y *Antheraea mylitta*. Por otra parte, coincidimos con Lakshmi Devi y Yellamma (2013) en que el aumento de componentes proteicos en la hemolinfa observados en el tercer estadio larval de *P. citrella* estaría relacionado con las necesidades de proteínas y aminoácidos del cuerpo graso para la síntesis de nuevas proteínas en respuesta a los requerimientos metabólicos del insecto para la metamorfosis y por las glándulas sericígenas para la síntesis del material proteico que compone el hilo de seda que formará el capullo durante los estadios de prepupa y pupa.

En referencia al tipo de secreción que producen las regiones secretoras de la glándula sericígena, coincidimos con Tanaka (1911), Tashiro *et al.* (1968), Barsagade y Tembhare (2000) y Valantina Sangamithirai *et al.* (2014) en que dicha secreción es principalmente proteica; sin embargo, los diferentes grados de acidofilia observados en la secreción acumulada en la luz de región distal de la glándula en el tercer estadio larval *P. citrella*, nos sugiere que la composición química de la misma varía durante el desarrollo larval de la especie por lo que consideramos es necesario realizar en el futuro estudios histoquímicos que permitan determinar la composición química del material secretado por la misma en los diferentes estadios larvales de la especie.

En relación al desarrollo del aparato reproductor, los estudios realizados hasta el momento en diferentes especies de Lepidoptera, muestran considerables variaciones en relación a la ubicación, morfología y tiempos de desarrollo de los diferentes órganos que forman el sistema reproductor del macho y de la hembra en estos insectos.

Según las observaciones realizadas por Drecktrah (1966) y Jones (1973) en *Ostrinia nubilalis*, y las de Beckemeyer y Shirk (2004) en *Plodia interpunctella*, las características morfológicas observadas en el esbozo gonadal al comienzo del desarrollo larval de estas especies no permiten diferenciar estructuralmente la gónada masculina de la femenina. En relación a la diferenciación sexual de la gónada en *P. citrella*, las observaciones realizadas durante el desarrollo larval indicarían que en esta especie durante el primer estadio larval los esbozos gonadales permanecen indiferenciados, son pares y se ubican dorsal al intestino medio. Mientras que a partir del segundo estadio larval se produce la diferenciación sexual de la gónada y se diferencian estructuras del aparato reproductor masculino que permiten identificar el sexo en la larva.

Por otra parte, Drecktrah (1966) sostiene que en *Ostrinia nubilalis* los testículos se identifican a los dos días de larva, ubicados en el quinto segmento abdominal, compuestos por cuatro folículos; mientras que Bilha *et al.* (2012) en base solo al análisis anatómico realizado en larvas del primer estadio de *Diatraea saccharalis* identifica testículos pares, con aspecto de riñones, ubicados en el quinto segmento abdominal. En *P. citrella* a partir del segundo estadio se identifica el sexo en la larva, ya que en larvas macho se diferencian un par de testículos unifoliculares que abarcan desde el quinto y al séptimo segmento abdominal, los esbozos de los conductos eferentes, la porción gonádica de los conductos deferentes y los esbozos de las glándulas accesorias y de las diferentes estructuras que formarán la genitalia externa del macho.

Con respecto al proceso de espermatogénesis, Numata y Hidaka (1980) en *Papilio xuthus* y Chaudhury y Raun (1966) en *Ostrinia nubilalis* observaron testículos con espermatogonias y espermatocitos primarios recién a partir del tercer estadio larval y el inicio de la espermiogénesis a partir del cuarto estadio larval; mientras que Manogen (2002) en su estudio sobre espermiogénesis en *Spodoptera muritia* observó la presencia

de espermatogonias recién a partir del quinto estadio larval, espermátocitos en el sexto estadio larval y espermátidas a partir del primer o tercer día del estadio de prepupa. Considerando que *P. citrella* tiene un desarrollo larval más corto que incluye solo tres estadios, los resultados obtenidos muestran que en esta especie a partir del segundo estadio y hasta el final del desarrollo larval en el folículo testicular solo se encuentran células de la línea germinal al comienzo del proceso de espermatogénesis; ya que en el folículo se identifican claramente las regiones del Germario con espermatogonias primarias y la Zona de Crecimiento con espermatogonias secundarias.

En relación al desarrollo de la gónada femenina, los estudios realizados por Drecktrah (1966) en *Ostrinia nubilalis* demuestran que en esta especie al tercer día de larva se observan pequeños ovarios, ubicados en el quinto segmento abdominal, pero en ellos no identifican ovariolas. Suludere (1986) en cambio en *Agrotis ipsilon* observa ovarios con cuatro ovariolas sin estructuras bien definidas en el último estadio larval de esta especie. Sin embargo, Mandelbaum (1975 citado por Telfer, 2009) menciona cuatro pequeños brotes precursores de las ovariolas en ovarios del primer estadio larval de *Hyalophora cecropia* y Beckemeyer y Shirk (2004) señalan en *Plodia interpunctella* la presencia de ovariolas con un elevado nivel de organización estructural en el segundo estadio larval. En *P. citrella* la gónada femenina se identifica en el tercer estadio larval y está constituida por un par de ovarios de igual ubicación que los testículos pero de un tamaño considerablemente menor y en larvas hembras de mayor tamaño que se encuentran al final del tercer estadio se identifican claramente cuatro pequeñas ovariolas en formación.

En relación al desarrollo de las restantes estructuras del aparato reproductor y en particular aquellas que permiten identificar precozmente el sexo en la larva, autores como Metha (1933) quien estudió el desarrollo de la genitalia del macho y los conductos eferentes en varias especies de Lepidóptera, ta-

les como *Pieris rapae*, *Hepialus lupulinus*, *Earias fabia* y *Bombyx mori* y Jones (1973) que realiza estudios similares en *Ostrinia nubilalis*, mencionan que la formación de la invaginación ectodérmica o cavidad genital que dará origen al esbozo del conducto eyaculador común, se diferencia en los primeros estadios larvales en el noveno segmento abdominal y que la diferenciación de los conductos eyaculadores pares y glándulas accesorias del macho se produce durante el desarrollo larval y se continua y completa durante el periodo de pupa. Por otra parte, según Jones (1973) y Sendi *et al.* (1993) quienes realizaron estudios postembrionarios sobre el desarrollo del aparato reproductor de la hembra en *Ostrinia nubilalis* y *Papilio demoleus* respectivamente, sostienen que la formación del oviducto común se inicia durante el estado de larva y se continua y completa durante el estado de pupa. Sin embargo, para Joubert (1978) quien realizó estudios similares en *Dalaca rufescens* el desarrollo de los órganos internos del aparato reproductor de la hembra se diferencia en estadios tempranos de la pupa.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en *Phyllocnistis citrella* la invaginación ectodérmica ventral que da origen a la cavidad genital y el esbozo conducto eyaculador común en larvas macho es visible a partir del segundo estadio larval y se mantiene sin cambios morfológicos significativos hasta el final del desarrollo larval de la especie. Sin embargo, mediante el análisis histológico del aparato reproductor realizado para los diferentes estadios durante el desarrollo larval de esta especie no se identificaron estructuras morfológicas que indiquen el inicio de formación del oviducto común y bursa copulatrix, las cuales permitirían identificar el sexo en larvas hembras.

Con estos resultados podemos concluir que durante el desarrollo larval de *P. citrella* en campo, la gónada permanece indiferenciada durante el primer estadio larval y a partir del segundo estadio se diferencia la gónada masculina y las estructuras asociadas al aparato reproductor del macho que permiten la identificación temprana del sexo

en la larva. Asimismo, los resultados obtenidos indicarían que las etapas más importantes en el proceso de diferenciación del aparato reproductor de la hembra se producen durante los estadios de prepupa y pupa, por lo que teniendo en cuenta los antecedentes sobre el tema y la gran variación en diferentes especies de Lepidoptera, consideramos importante continuar en el futuro con estudios histológicos e histoquímicos durante la metamorfosis de *P. citrella*, con el fin de aportar datos complementarios sobre el proceso de diferenciación de los diferentes órganos que intervienen en la génesis y transferencia de las gametas del macho y la hembra de esta especie. Por otra parte, consideramos es importante complementar los resultados obtenidos en este trabajo con posteriores estudios histomorfológicos durante los estadios de prepupa y pupa en campo de la especie, con el fin de analizar los procesos de histólisis e histogénesis que se producen en órganos y sistemas durante la metamorfosis para formar las estructuras definitivas del adulto en ambos sexo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Sr. José Rodríguez por permitirnos realizar los muestreos en su quinta de limones en la Dpto. Tafí Viejo (Tucumán, Argentina) y al Sr. Franco J. Pucci Alcaide, técnico del Instituto de Morfología Animal, por la captura de imágenes y edición de microfotografías para la ilustración de los resultados obtenidos. Se agradece a los revisores de este trabajo por las observaciones y sugerencias realizadas que permitieron mejorar la calidad del mismo. Este trabajo se realizó en su totalidad con fondos de la Fundación Miguel Lillo.

BIBLIOGRAFÍA

- Asplanato, G. 2009. El minador de la hoja de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae): Bioecología y control biológico. Serie FPTA-INIA; 24. Montevideo, Uruguay, 64 pp.
- Baeza Nahed, U. 2008. Parasitoides del minador de la hoja de los cítricos y del psialido asiático en la costa de Oaxaca. Tesis de grado de Maestro en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales. Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca (CIIDIR-Unidad Oaxaca), México, 57 pp.
- Barsagade, D. D. y Tembhare, D. B. 2000. Development, structure and secretory activity of silk gland complex in the tropical tassar silkworm *Antheraea mylitta* (Drury) (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 40 (2): 231-245.
- Beattie, A. y Hardy, S. 2004. Citrus leafminer. NSW Department of Primary Industries. Agfad H2. AE. 4. Fourth edition. [Http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/137634/citrus-leafminer.pdf](http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/137634/citrus-leafminer.pdf)
- Beckemeyer, E. F. y Shirk, P. D. 2004. Development of the larval ovary in the moth, *Plodia interpunctella*. *Journal of Insect Physiology*, 50: 1045-1051.
- Bilha, J. K.; Brancalhão, R. M. C.; y Conte H. 2012. Testicles fusión of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera; Crambidae) during post-embryonic development. *Journal Entomology Research Society*, 14(3): 01-07.
- Carvalho, R. R. B., Goulart de Angrade, F., Levy, S. M., Moscardi, F., Ferreira Falleiros, A. M. 2013. Histology and ultrastructure of the fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Archives Biology and Technology*, 5 (2): 303-310.
- Casmuz, A. S., Goane, L., Salas, H., Lazcano, J., Zapatiel, S. A., Willink, E. 2007. Efecto de las aplicaciones aéreas de abamectin sobre *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitoide del minador de la hoja de los cítricos, en la provincia de Tucumán. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 84 (2): 1-7.
- Castillo-Carrillo, P. S. y Cornejo Hidalgo, R. 1995. *Phyllocnistis citrella*, minador de las hojas de los cítricos, nuevo insecto plaga para Tumbes. *Revista Peruana Entomológica*, 38: 105-107.
- Cavalcante, V. M. y Cruz-Landim, C. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*, 24: 19-40.
- Chagas, M. C. M., Parra, J. R. P, Namekata, T., Hartung, J. S., Yamamoto, P. T. 2001. *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citris* in Brazil. *Neotropical Entomology*, 30 (1): 55-59.
- Chapman, R. F., 1969. *The Insects, Structure and Function*. Elsevier, New York, 891 pp.
- Chaudhury, M. F. B y Raun, E.S. 1966. Spermatogenesis and testicular development of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyraustidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 59 (6): 1157-1159.
- Correia, A. A., Wanderley -Teixeira, V., Teixeira, A. A. C., De Oliveira, J., Torres, J. B. 2009. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. *Neotropical Entomology* 38 (1): 083-091.

- Cruz-Landim, C. 1983. O corpo gorduroso da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae: Meliponinae). *Naturalia*, 8: 7-23.
- Drecktrah, H. G. 1966. Morphology and histology of the internal reproductive system of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Retrospective theses and Disesertations. Paper 5310. Federación Argentina de Citrus (Federocitrus). 2016. Nuestra fruta. Disponible en <http://www.federocitrus.org/fruta.asp>.
- Garijo, C. y García, E. J. 1994. *Phyllocnistis citrella* (Staiton, 1856) (Insecta, Lepidoptera, Gracillariidae: Phyllocnistidae) en los cultivos de cítricos de Andalucía (Asur de España): Biología, ecología y control de plagas. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 20: 815-826.
- Ghezán, G., Cendón, M. L., Castro, M. 2010. La cadena global del limón: su dinámica y formas de coordinación en torno a las exigencias de calidad. XLI Reunión de la Asociación Argentina de Economía Agraria, ISSN 1666-0285, 23pp.
- Gillot, C. 1980. *Entomology* - Plenum Press. New York and London 729 pp.
- Goane, L. 2009. Interacciones Tritróficas: *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), sus plantas hospedantes y sus parasitoides en la provincia de Tucumán. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, 152 pp.
- Hauerland, N. H. y Shirk P. D. 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annual Review Entomology*, 40: 121-145.
- Jones, J. A. 1973. Postembryonic development of the reproductive system of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). Retrospective theses and Disesertations. Paper 4947.
- Joubert, P. C. 1978. The post-embryonic development and structure of the internal reproductive organs of *Dalaca rufescens* Hampson (Lepidoptera, Hepialidae). *Phytophylactica* 10: 1-6.
- Lakshmi Devi, K. y Yellamma K. 2013. Protein profiles in the silkworm, *Bombyx mori* (L) on exposure to trace element and nutrients. *Indian Journal of Applied Research*, 3 (10): 1-3.
- Leftwich, A. W. 1976. *A dictionary of entomology*. Constable and Co Ltd. London 359 pp.
- Locke, M., Collins, J. V. 1968. Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *Journal of Cell Biology*. 36: 453-483.
- Manogen E. M. 2002. Dynamics of spermiogenesis in *Spodoptera mauritia* Boisl (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis Doctoral. Departament of Zoology. University of Calcut. 130 pp.
- Marchi, S., Fodra, R. C., Marchi, L., Pereira, L.H., Santana, D.F., Signorini, T., Ruiz, H.B., Oliveira, J.R., Ferreira, G.A. 2009. Influência da alimentação na morfologia da glândula. *Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia da Unipar*. Umuarima, 12: 17-22.
- Margaix, C. Jacas, J y Garrido, A. 1998. Parámetros de reproducción de *Phyllocnistis citrella* (Staiton, 1856) (Lepidoptera, Gracillariidae) en condiciones controladas. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 24: 207-218.
- Marques-Silva, S., Gomes de Oliveira, H., Holtz, A. M., De Almeida Sarmento, R., Serrao, J. E. 2003. Fat body morphology of *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) larvae in function of two alimentary sources. *Revista Chilena Entomología*, 29: 105-110.
- Martins, G. F., y Ramalho-Ortigao, J.M. 2012. Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 139-152.
- Metha, D. R. 1933. On the development of the male genitalia and efferent duct in Lepidopteras. *Quarterly Journal Microscopical Science*, 78: 35-61.
- Monteresino, E. M y Manfrini de Brewer M. 2001. *Diccionario Entomológico*. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. 152pp.
- Numata, H. y Hidaka, T. 1980. Development of male sex cells in the Swallowtail, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) in relation to pupal diapause. *Applied Entomology Zoology*, 15 (2): 151-158.
- Paredes, V., Pérez, D., Rodríguez, G. 2011. El limón en Tucumán, la Argentina y el mundo: producción y exportación durante el periodo 1999/2000/-2010/2011. *Avance Agroindustrial*, 32 (2): 15-21.
- Pilon, F. M.; Visóotto, R. N.; Guedes, R. N. C.; Oliveira, M. G. A. 2013. Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of comparative physiology*, 183: 735-747.
- Robles-González, M., Medina-Urrutia, V. M., Morfín-Valencia, A. 2005. Daño de minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae) en limón mexicano. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11 (2): 379-386.
- Rodríguez, G. y Cermeli, M. 1997. El minador de la hoja nueva plaga de los cítricos en Venezuela. *Fonaip. Divulga (Ven)*. 58: 20-24.
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I. 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron* 41: 395-401.
- Sánchez, J. Cermeli, M., Morales, P. 2002. Ciclo biológico del minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae) en naranja (Citrus sinensis (L) Osbeck). *Entomotrópica* 17 (2): 167-172.
- Sendi, J. J., Srivastava, K. P., Singh, M. R. K. 1993. Postembryonic study on the development of the female efferent genital system in the lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera). *Journal of Research on the Lepidopteras*, 32: 162-169.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF). 2012. Ficha técnica Cancro de los cítricos *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

- (Xcc). Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, DF. 22 p.
- Snodgrass, R. E., 1935. Principles of Insects Morphology. Ed. McGraw-Hill, New York, 667 pp.
- Srivastava, B. P. 1959. Morphology of the alimentary canal of the larva of *Leucinodes orbonalis* Guen (Lepidoptera, Pyraustidae). Agricultural Institute, 25 (4): 184-200.
- Srivastava, U. S. y Khare, M. K. 1966. The development of malpighian tubules and associated structures in *Philosamia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae). Journal Zoology, London, 150: 145-163.
- Suludere, Z. 1986. A study on the fine structure of the ovarium of the last instar larval of *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). Communications Faculty Sciences Ankara Series C, 4: 25-43.
- Takahashi, R., Cruz-Landim, C, Kronka, S do N. 1990. Desenvolvimento da glândula sericígena do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) sob a influencia dos diferentes tipos de adubação na amoreira. Bole-tim da Indústria Animal, 42 (2): 121-125.
- Tanaka, Y. 1911. Studies on the anatomy and physiology of the silk -producing insects: I. On the structure of the silk glands and the silk formation in *Bombyx mori*. Journal of the college of Agriculture, Tohoku. Imperial University, Sapporo, Japon 4 (2): 1-172.
- Tashiro, Y., Morimoto, T., Matsura, S. y Nagata, S. 1968. Studies on the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. I. Growth of posterior silk gland cells and biosynthesis of teh fibroin during the fith larval instar. Journal of Cell Biology, 38: 574-588.
- Telfer, W. H. 2009. Egg formation in lepidópteras. Journal of Insect Science, Vol.9 (50): 1-21.
- Valantina Sangamithirai, A., Selvi Sabhanayakam, Su-sithara, N., Ganeshprabhu N., Mathivanan V., Hemalatha, S., y Elanchezian, C. 2014. Studies on histological chances in fatbody and silk gland of silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) fed with V₁ mulberry leaves and AG nanoparticles treated leaves. International journal of modern research and reviews. Vol. 2 (1): 20-25.
- Vargas, O. H., Bobadilla, G. D., Jimenez, R. M., Vargas, C. H. 1998. Algunas características biológicas del minador foliar de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) observadas en el Valle de Azapa, I Region, Chile. IDESIA (Chile), 15: 65-68.
- Wigglesworth, V. B. 1972. Principles of Insect Physiology – 7th Ed. London, Chapman and Hall, 827 pp.