

Artículo Original

Análisis histológico durante la metamorfosis de *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae)

Histological analysis during the metamorphosis of *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856
(Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae)

Gloria Valeria Vaca^{1*}  y Adriana Azucena Michel¹ 

¹Instituto de Morfología Animal, Área Zoología, Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251, (4000) San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. ✉ *gvvaca@lillo.org.ar; aamichel@lillo.org.ar

ZooBank: urn:lsid:zoobank.org:pub:97E8CEDB-F21E-426B-BAA4-06DB490384ED

<https://doi.org/10.35249/rche.48.1.22.16>

Resumen. La información relacionada con la morfología interna de los insectos plaga durante su desarrollo postembrionario es importante para mejorar los mecanismos de control y los estudios comparativos entre especies. Considerando la importancia de *Phyllocnistis citrella* como plaga del cultivo de los cítricos y la necesidad de conocer aspectos sobre el desarrollo y la reproducción de esta especie de importancia económica, el objetivo de este trabajo es analizar los cambios tisulares de órganos y sistemas durante la metamorfosis. Las muestras se fijaron en Bouin y conservaron en alcohol n-butílico. Se coloreó con Hematoxilina (Erlisch)-Eosina (H-E). Los resultados obtenidos evidencian en la prepupa la presencia de la glándula de Verson, con características citológicas que sugieren activa síntesis proteica relacionada con los procesos de muda. A nivel del sistema nervioso se produce la completa fusión de los ganglios cerebrales y el inicio de la diferenciación de las regiones del cerebro. En el estadio de pupa se destaca la activa formación y diferenciación de los principales centros sensoriales como los lóbulos ópticos y antenales. En el intestino medio se observan procesos de destrucción celular o apoptosis a lo largo del epitelio, indicando histólisis del epitelio larval e histogénesis a partir de las células regenerativas. La presencia de células fagocitarias en la región distal de la glándula sericígena indicaría lisis celular relacionada con las fases de regresión y degenerativa. Los testículos unifoliculares sufren procesos de migración y fusión. Los ovarios con ovariolas de tipo meroísticas politrofas presentan folículos ováricos constituidos por cuatro células nutricias y un ovocito. Los procesos de morfogénesis descritos durante la metamorfosis de *P. citrella* aportan datos sobre aspectos del desarrollo que serán de importancia para el mejor conocimiento de la biología de la especie.

Palabras claves: Desarrollo; minador de los cítricos; morfología; prepupa; pupa.

Abstract. The information regarding the internal morphology of plague insects during their post-embryonic development is important to enhance control mechanisms and comparative studies among species. Considering the importance of the *Phyllocnistis citrella* as a citrus pest and the need to know aspects of the development and reproduction of this species of economic importance, the objective of this work is to analyse the tissue changes of both organs and systems during the metamorphosis. The samples were fixed in Bouin's solution and preserved in n-butyl alcohol. The tissues were stained with Hematoxylin (Erlisch)-Eosin (H-E). The results obtained show the presence of the Verson's gland in the prepupa, with cytological characteristics that suggest active protein

Recibido 30 Diciembre 2022 / Aceptado 9 Marzo 2022 / Publicado online 31 Marzo 2022

Editor Responsable: José Mondaca E.

synthesis related to molting processes. At the level of the nervous system, the complete fusion of the cerebral ganglia and the beginning of the differentiation of the regions of the brain take place. In the pupal stage, the active formation and differentiation of the main sensory centers such as the optic and antennal lobes stand out. In the midgut, cell destruction processes throughout the epithelium were observed, indicating histolysis of the larval epithelium and histogenesis from regenerative cells. The presence of phagocytic cells in the distal region of the silk gland would indicate cell lysis related to the regression and degenerative phases. Testis, with a single follicle, undergo migration and fusion processes. Ovaries, with polytrophic meroistic ovarioles, show ovarian follicles made up of four nurse cells and one oocyte. The morphogenesis processes described during the metamorphosis of *P. citrella* provide data on aspects of its development that will be of importance for a better understanding of the species.

Key words: Citrus leaf miner; development; morphology; prepupa; pupa.

Introducción

La metamorfosis es una de las más amplias estrategias usadas por los animales, las marcadas diferencias entre la forma larval y adulta permiten que los estados exploten diferentes hábitats y fuentes de alimento como así también la adaptación extrema de una etapa para un rol particular, como la dispersión. En los insectos, los diferentes estados de larva, pupa y adulto les permite separar los recursos necesarios para el crecimiento y la reproducción; logrando en algunos casos ciclo de vida extremadamente rápidos (Truman y Riddiford 1999).

Las investigaciones realizadas sobre metamorfosis de insectos se han centrado tradicionalmente en los aspectos morfológicos mediante la diferencia de dos modelos básicos: hemimetábolos y holometábolos. En insectos hemimetábolos, con metamorfosis simple o incompleta, las fases inmaduras (ninfas) difieren del adulto en el desarrollo de pterotecas y genitalia externa. En estos insectos no hay intermuda pupal y crecen gradualmente, con estadios ninfales sucesivos hasta alcanzar el estado adulto, que se caracteriza por la exhibición de las alas funcionales y la presencia de genitales externos. Mientras que, en insectos holometábolos, con metamorfosis completa, los estadios inmaduros (larvas) son completamente diferentes al adulto, produciéndose en la pupa drásticos cambios morfológicos y funcionales que llevan a la formación del imago (Chapman 1998; Monteresino y Manfrini de Brewer 2001; Gomez-Orte y Belles 2009).

En los holometábolos, los diversos órganos son completamente remodelados o degeneran durante la metamorfosis y los eventos de autofagia ocurren exclusivamente para eliminar aquellos órganos y tejidos que son usados únicamente durante los estadios embrionarios y larvales (Tettamanti *et al.* 2011). Cuando las diferencias entre la larva y el adulto son extremas, muchos de los tejidos se destruyen y las estructuras del adulto se forman a partir de las células de los discos imaginales que se multiplican, pero no se diferencian por completo durante los estadios larvales (Snodgrass 1959; Gilbert y Schneirderman 1961).

Los estudios sobre metamorfosis de insectos holometábolos se han limitado a especies modelos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), el gusano de la harina *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) y la mosca azul *Calliphora* Robineau-Desvoidy, 1830, entre otros (Ge *et al.* 2015). Entre los lepidópteros las mariposas y las polillas han sido ampliamente usados para el estudio de los procesos relacionados con la metamorfosis, debido a que la larva es fácil de manejar para su utilización en diversos estudios biológicos, como lo demuestran las investigaciones realizadas por Judy y Gilbert (1969) sobre metamorfosis del canal alimenticio de *Hyalophora cecropia* (Linnaeus, 1758), Truman y Reiss (1995) sobre metamorfosis neuromuscular en larvas de *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763),

Wang *et al.* (2006) sobre dieta y ácidos grasos antes y después de la metamorfosis en *Morpho peleides* (Butler, 1872) y Hammer *et al.* (2014) sobre variación de la comunidad bacteriana durante la metamorfosis de *Heliconius erato* (Linnaeus, 1758), entre otros autores.

Phyllocnistis citrella (Stainton, 1856) “minador de la hoja de los cítricos” es una plaga potencialmente seria para los cítricos y otras plantas pertenecientes a la familia Rutaceae (Heppner 1993; Suárez Perera *et al.* 2005). La larva se alimenta de las hojas generando galerías que ocasionan 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; Achor *et al.* 1997; Vargas *et al.* 1998). Asimismo, este daño directo puede contribuir a la penetración y desarrollo del cáncer de los cítricos ocasionado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Chagas *et al.* 2001). Durante la prepupa, el insecto no consume alimento alguno, su función es la de construir la cámara pupal. En el estadio de pupa la cutícula se ha quitinizado y comienzan todas las transformaciones que conducen al adulto (Garrido Vivas 1995; Sánchez *et al.* 2002).

Recientemente se han incrementado los estudios sobre biología, métodos de control biológico y químico, entre otros, que han dado lugar a numerosas publicaciones que han contribuido al mayor conocimiento del minador de los cítricos (Garrido Vivas y Gascón López 1995; Jacas y Garrido 1996). Según Quicke *et al.* (1992), la información relacionada con la morfología interna de los insectos plaga durante su desarrollo postembrionario es importante para mejorar los mecanismos de control y los estudios comparativos entre especies. Los estudios sobre metamorfosis en *P. citrella* son escasos y están relacionados principalmente con genitalia externa (Jacas y Garrido 1996; Kim *et al.* 2015) y los recientes estudios sobre histología e histoquímica del cuerpo graso (Vaca *et al.* 2019).

Considerando la importancia del “minador” como plaga del cultivo de los cítricos y la necesidad de conocer aspectos sobre el desarrollo y la reproducción de esta especie de importancia económica, el objetivo de este trabajo es analizar los cambios tisulares de órganos y sistemas durante la metamorfosis de *Phyllocnistis citrella* en campo.

Materiales y Métodos

Las prepupas y pupas de *P. citrella* se obtuvieron a partir de hojas recolectadas de una quinta de limonero *Citrus limon* (L.) (Burm.), mantenida siempre bajo condiciones de poda y limpieza de senderos, sin aplicaciones de insecticidas para control del minador.

Los muestreos se realizaron cada quince 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. Los brotes se colocaron en bolsas plásticas y se trasladaron al laboratorio. La extracción e identificación de ejemplares se realizó bajo un estereomicroscopio Leica EZ4.

Las muestras se fijaron en Bouïn (solución acuosa saturada de ácido pícrico, formol puro y ácido acético 70: 25: 5) durante 24 horas. Se deshidrataron en una batería ascendente de etanol y se conservaron en alcohol n-butílico. Debido al tamaño reducido de las muestras, se realizó un método de doble inclusión en agar-paraplast y se realizaron cortes seriados de 6 μm de espesor, con orientación sagital y frontal. Los cortes se colorearon con Hematoxilina (Erich)-Eosina (H-E).

Las observaciones tisulares se realizaron en un microscopio fotónico trinocular de alta resolución Leica DM2000. Los resultados obtenidos se ilustraron con microfotografías tomadas con una cámara digital incorporada al microscopio, Leica ICC 5 HD, y se analizaron con el software Leica LAZ V4, 12. Los preparados histológicos se incorporaron a la Colección Histológica Instituto de Morfología Animal de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.

Resultados

En el presente trabajo se realizó un estudio histomorfológicos de órganos y sistemas, con el fin de analizar los cambios que ocurren durante la metamorfosis de *P. citrella*.

La prepupa del minador de los cítricos se desarrolla en los márgenes del limbo foliar de las hojas de limonero, externamente el cuerpo se caracteriza por ser cilíndrico de coloración amarillenta, con tres regiones claramente definidas: una región cefálica reducida, una región torácica con un marcado pronoto y una región abdominal constituida por diez segmentos. En esta etapa del inicio de la metamorfosis las glándulas de la seda secretan un fino hilo que al secarse se contrae haciendo que el borde de la hoja se pliegue formando la cámara pupal (Fig. 1).

Al inicio de la pupa la cutícula es marrón claro tornándose más oscura a lo largo de este estadio. Externamente en la región cefálica se destacan los ojos de gran tamaño, las antenas plegadas ventralmente, alcanzando los últimos segmentos abdominales, mientras que en la región torácica se destacan las pterotecas, adheridas al cuerpo, con una longitud que excede los segmentos de la región abdominal (Fig. 2).

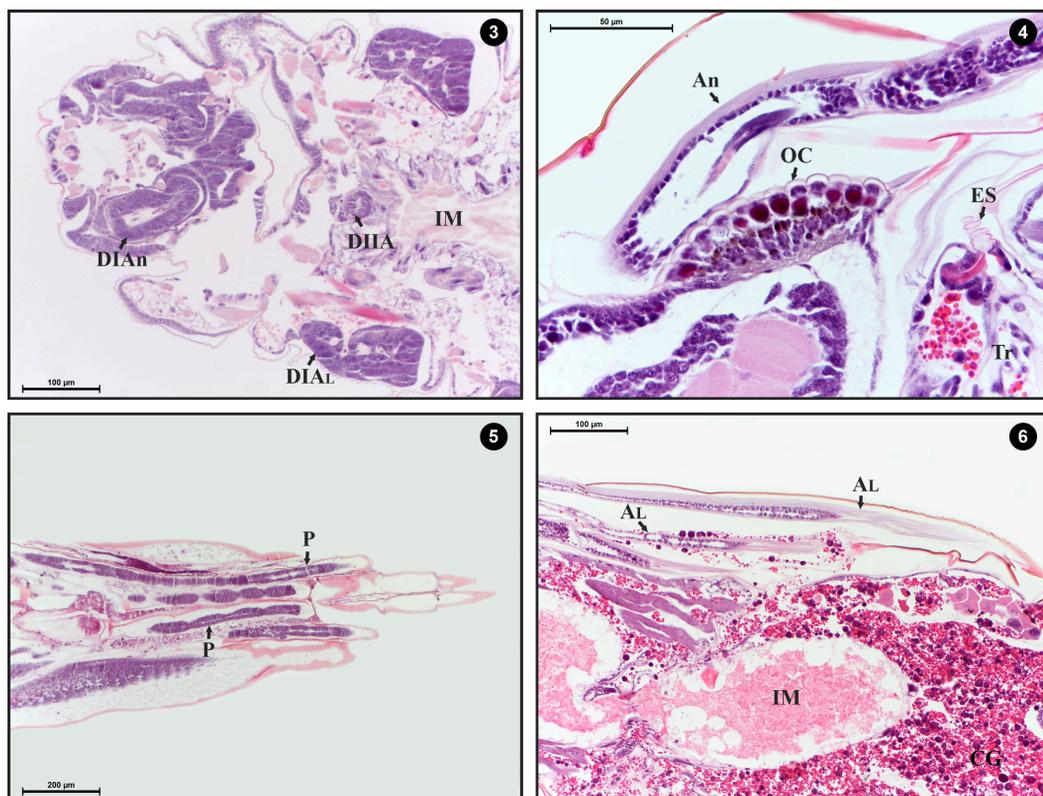


Figuras 1-2. *Phyllocnistis citrella*. 1. Prepupa extraída de la galería. 2. Pupa extraída de la cámara pupal / 1. Prepupae taken out from the gallery. 2. Pupae taken out from the chamber.

En relación con el desarrollo de los apéndices cefálicos, en la prepupa, se destacan los esbozos de las antenas y de las piezas bucales. Las cavidades peripodiales de los discos imaginales de las antenas son de forma alargada y en su interior es posible observar células sensoriales ligeramente acidófilas. Durante este estadio se produce aumento en longitud y tamaño de los esbozos de las antenas por activa división de las células imaginales (Fig. 3). En el estadio de pupa los esbozos de las antenas toman contacto con la cutícula y emerger al exterior quedando recubiertas por una delgada cutícula. En etapas más avanzadas de este estadio se inician los procesos de segmentación y diferenciación de los primeros segmentos antenales (Fig. 4). Asimismo, durante el estadio de prepupa en la región cefálica se observan grandes cavidades peripodiales de forma redondeada, a partir de las cuales se formará las piezas bucales. Durante el estadio de pupa se inicia la segmentación de los esbozos de estas estructuras.

Los apéndices torácicos en la prepupa presentan activa proliferación celular de la membrana peripodial de alas y patas. Los esbozos de las patas adquieren gran tamaño y se distingue claramente el inicio del proceso de segmentación. Durante el estadio de pupa las pterotecas y podotecas se presentan como apéndices evertidos, recubiertos por una delgada epicutícula de color ámbar. En este estadio en las patas se observa una segmentación completa con segmentos de mayor longitud (Fig. 5). Mientras que, las alas

se observaban como estructuras membranosas de color claro, presentando externamente pequeñas escamas con proyecciones de aspecto plumoso (Fig. 6).



Figuras 3-6. Prepupa y pupa de *Phyllocnistis citrella*. 3. Prepupa: corte frontal de la región anterior. Disco Imaginal de la Antena (DIAn), Disco Imaginal de Alas (DIAI), Intestino Medio (IM), Disco Imaginal del Intestino Anterior (DIIA). 4. Pupa: corte frontal región anterior. Antena (An), Ojo Compuesto (OC), Espiráculo (E), Tráquea (Tr). 5. Pupa: corte frontal región posterior. Patas (P). 6. Pupa: corte sagital región media. Alas (AL), Intestino Medio (IM), Cuerpo Graso (CG) / 3. Prepupae: frontal section of the anterior region. Antenna Imaginal Discs (DIAn), Wings Imaginal Discs (DIAI), Midgut (IM), Foregut Imaginal Discs (DIIA). 4. Pupae: frontal section of the anterior region. Antenna (An), Compound Eyes (OC), Spiracle (E), Trachea (Tr). 5. Pupae: frontal section of the posterior region. Legs (P). 6. Pupae: sagittal section of the middle region. Wings (AL), Midgut (IM), Fat body (CG).

El tegumento en la prepupa presenta una coloración amarillo claro, en la cutícula se diferencia una delgada epicutícula con pequeñas ornamentaciones y una endocutícula levemente acidófilas. En íntimo contacto con la cutícula y a lo largo de todo el cuerpo, se observa un delgado y continuo cordón de células cúbicas en activa división mitótica que corresponde a la hipodermis (Fig. 7). En el estadio de pupa la cutícula adquiere una coloración oscura, acentuada en la zona dorsal, presentando una capa externa que corresponde a la epicutícula con pequeñas proyecciones cuticulares en forma de espinas. En una etapa más avanzada de la pupa, entre la cutícula y la epidermis se observa un amplio espacio de separación ocupado por un contenido levemente acidófilo. La epidermis está constituida por una capa continua de células cúbicas de gran tamaño. En la región abdominal asociado al tegumento se observan gruesos haces musculares fuertemente acidófilos, destacándose en cada segmento los puntos de unión de la epidermis con el tejido muscular o desmosomas (Fig. 8).

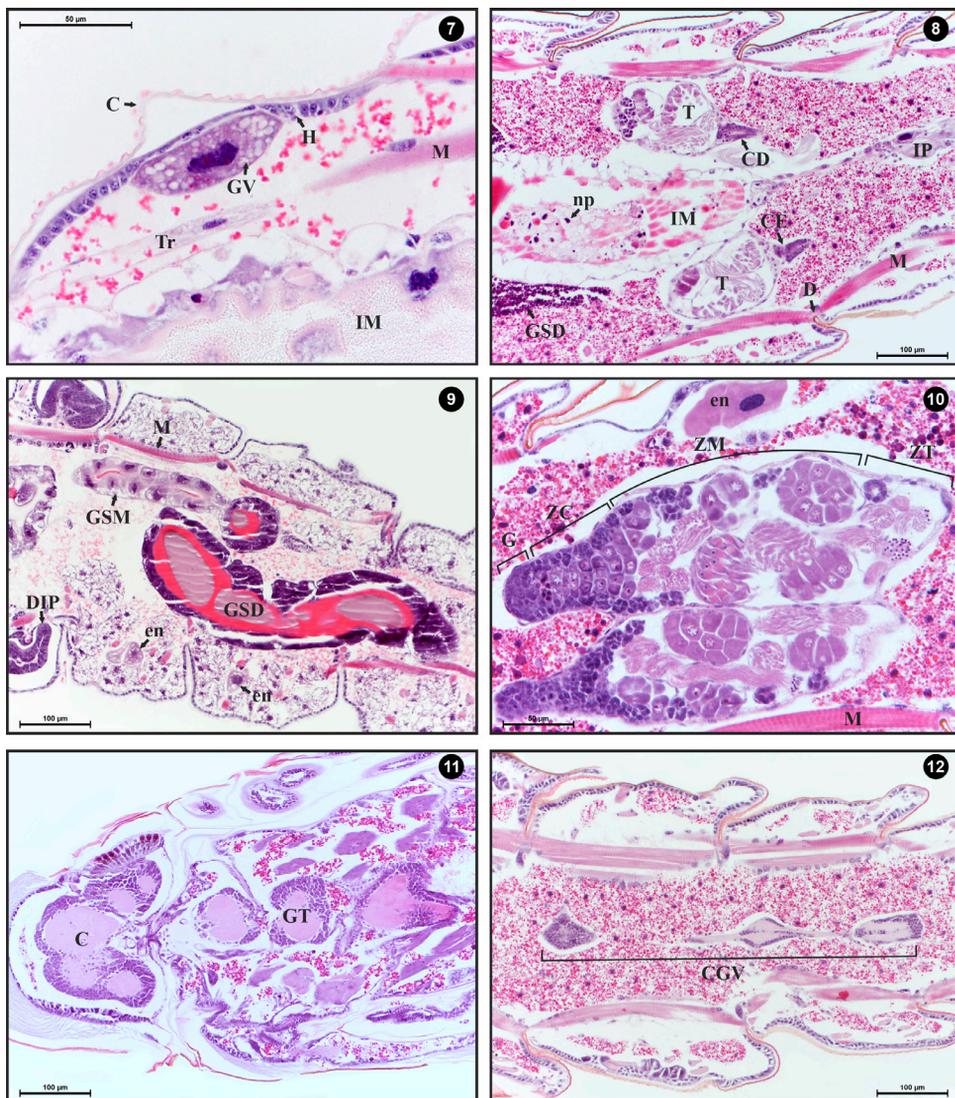
Los enocitos en la prepupa están en íntimo contacto con las células epidérmicas e inmersos en el cuerpo graso, son grandes esféricos o aguzados y pueden ser solitarios o dispuestos de a pares. El citoplasma de estas células es granular o vacuolar de coloración variable, tanto acidófilo como basófilo, y el núcleo fuertemente basófilo (Fig. 9). Mientras que, durante el estadio de pupa se observan enocitos esféricos con citoplasma granular acidófilo y un núcleo grande basófilo en posición central (Fig. 10).

Las glándulas de Verson están presentes en la prepupa, son pares y se disponen en cada segmento abdominal. En estas se identifican tres regiones: la región del conducto formada por una célula basófila de escaso tamaño, revestida por una delgada cutícula de color ámbar, la región del sáculo formada por una célula basófila de forma ligeramente esférica y con un núcleo central con cromatina granular, y la región secretora, que constituye la mayor parte de la glándula, formada por una célula con citoplasma basófilo homogéneo y núcleo en posición central. En etapas más avanzadas de este estadio se observa un aumento de tamaño de la célula secretora, el citoplasma adquiere aspecto vacuolado y el núcleo permanece en posición central comprimido por las vacuolas citoplasmáticas (Fig. 7). Mientras que, en el estadio de pupa estas glándulas están ausentes tanto en los segmentos torácicos como abdominales.

El sistema traqueal en la prepupa presenta espiráculos de gran tamaño, delimitados por células basófilas grandes que se continúan con la epidermis y recubiertos por una gruesa epicutícula acidófila. A partir de estos espiráculos se observa la emergencia de gruesas tráqueas de epitelio basófilo, que se ramifican en delgadas traqueolas basófilas, concentradas principalmente en la región abdominal alrededor del cuerpo graso, las glándulas sericígenas y las gónadas (Fig. 7). En el estadio de pupa se destacan las tráqueas con un grueso revestimiento cuticular color ámbar y las finas traqueolas, casi imperceptibles por su delgado calibre (Fig. 4).

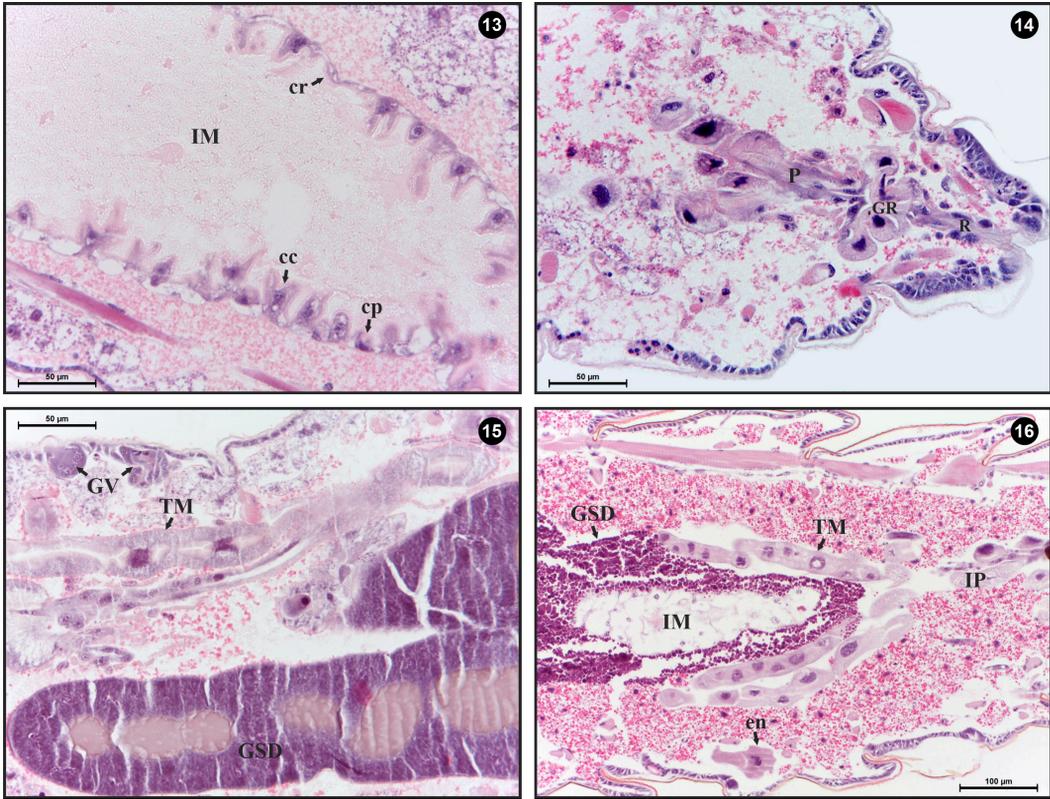
En el sistema nervioso de la prepupa se comienza a diferenciar las regiones del protocerebro, deutocerebro y tritocerebro, siendo la primera la región más desarrollada. En la región del tórax se observa un par de grandes ganglios fusionados por segmento, mientras que en la región abdominal los ganglios son pequeños y están conectados por finas fibras acidófilas. Durante el estadio de pupa se destaca el desarrollo de las prolongaciones laterales del protocerebro que forman los lóbulos ópticos. En etapas más avanzadas de este estadio se forman los ojos compuestos y a partir del deutocerebro el lóbulo antenal constituido por una importante zona de cuerpos neuronales. En este estadio la cadena ganglionar ventral permanece sin modificaciones significativas (Figs. 4, 11, 12).

El aparato digestivo en la prepupa presenta un intestino anterior constituido por un epitelio de células cúbicas con citoplasma y núcleo basófilo. El epitelio del intestino medio presenta abundantes células columnares, con citoplasma de aspecto vacuolar basófilo y núcleo basófilo, escasas células en copas con citoplasma acidófilo y núcleo basófilo comprimido en posición basal y numerosas células regenerativas basófila. El lumen de esta región presenta abundantes sustancias levemente acidófilas (Fig. 13). El intestino posterior es un tubo de diámetro reducido, cuyo epitelio está constituido por células cilíndricas, con citoplasma granular basófilo y núcleo fuertemente basófilo, destacándose en el extremo anterior del píloro la inserción de los túbulos de Malphigi y en el extremo anterior del recto la presencia de las glándulas rectales (Fig. 14). Asimismo, en el extremo anterior y posterior del intestino medio se observan estructuras a modo de anillos formadas por numerosas células basófilas en activa división (Fig. 3). Durante el estadio de pupa el epitelio del intestino medio esta considerablemente adelgazado y a lo largo del mismo se destaca la presencia de numerosas células con citoplasma completamente vacuolar y núcleo de aspecto granular levemente basófilo. Las células regenerativas aumentan de tamaño y presentan núcleos fuertemente basófilos que ocupan casi todo el citoplasma de la célula. El contenido intestinal adquiere aspecto vacuolado levemente acidófilo con escasas bacterias simbiotas y abundantes células de contorno irregular y núcleos picnóticos (Fig. 8). En este estadio no se observan modificaciones significativas en el intestino anterior y posterior.



Figuras 7-12. Prepupa y pupa de *Phyllocnistis citrella*. 7. Prepupa: corte sagital región media. Cutícula (C), Hipodermis (H), Glándula de Verson (GV), Tráquea (Tr), Musculo (M), Intestino Medio (IM). 8. Pupa: corte frontal de la región media. Musculo (M), Desmosoma (D), Intestino Medio (IM), núcleo picnótico (np), Intestino Posterior (IP), Glándula Sericígena Región Distal (GSD), Testículo (T), Conducto Eferente (CE), Conducto Deferente (CD). 9. Prepupa: corte frontal región media. Enocitos (en), Glándula Sericígena Región Media (GSM), Glándula Sericígena Región Distal (GSD), Discos Imaginales de las Patas (DIP). 10. Pupa: corte frontal región media. Enocitos (en), Testículo: Germario (G), Zona de Crecimiento (ZC), Zona de Maduración (ZM), Zona de Transformación (ZT), Músculo (M). 11. Pupa: corte frontal regiones cefálica y torácica. Cerebro (C), Ganglios Torácicos (GT). 12. Pupa: corte frontal región media. Cadena Ganglionar Ventral (CGV). / 7. Prepupae: sagittal section of the middle región. Cuticle (C), Hypodermis (H), Verson's Gland (GV), Trachea (Tr), Muscle (M), Midgut (IM). 8. Pupae: frontal section of the middle región. Muscle (M), Desmosome (D), Midgut (IM), pyknotic nucleus (np), Hindgut (IP), Posterior Silk Gland (GSD), Testis (T), Vas Efferens (CE), Vas Deferens (CD). 9. Prepupae: frontal section of the middle región. Oenocytes (en), Middle Silk Gland (GSM), Posterior Silk Gland (GSD), Legs Imaginal Discs (DIP). 10. Pupae frontal section of the middle región. Oenocytes (en), Testis: Germarium (G), Zone of Growth (ZC), Zone of Maduration (ZM), Zone of Transformation (ZT), Muscle (M). 11. Pupae: frontal section cephalic and thoracic regions. Brain (C), Thoracic Ganglia (GT). 12. Pupae: frontal section of the middle región. Ventral Nerve Cord (CGV).

Los túbulos de Malpighi en la prepupa son de gran longitud y luz estrecha, están formados por grandes células redondeadas, con citoplasma granular basófilo, núcleo esférico central fuertemente basófilo y membrana apical con ribete en cepillo intensamente acidófilo (Fig. 15). En el estadio de pupa se identifican claramente seis largos túbulos de Malpighi que nacen entre la unión del intestino medio y posterior y se ubican paralelos al tubo digestivo. Las características citológicas del epitelio son similares a las observadas en el estadio de prepupa, destacándose en la pupa el aspecto vacuolar del citoplasma de las células de la región proximal del túbulo (Fig. 16). Durante la metamorfosis no se observa comunicación entre el extremo distal de los túbulos de Malpighi y el recto.



Figuras 13-16. Prepupa y pupa de *Phyllocnistis citrella*. 13. Prepupa: corte sagital región media. Intestino Medio (IM), célula columnar (cc), célula en copa (cp), célula regenerativa (cr). 14. Prepupa: corte frontal región posterior. Píloro (P), Glándula Rectal (GR), Recto (R). 15. Prepupa: corte sagital región media. Túbulos de Malpighi (TM), Glándula Sericígena Región Distal (GSD), Glándula de Verson (GV). 16. Pupa: corte frontal región media y posterior. Intestino Medio (IM), Intestino Posterior (IP), Túbulos de Malpighi (TM), Glándula Sericígena Región Distal (GSD), Enocitos (en). / 13. Prepupae: sagittal section of the middle region. Midgut (IM), columnar cell (cc), goblet cell (cp), regenerative cell (cr). 14. Prepupae: frontal section of the posterior region. Pylorus (P), Rectal Gland (GR), Rectum (R). 15. Prepupae: sagittal section of the middle region. Tubule Malpighian (TM), Posterior Silk Gland (GSD), Verson's Gland (GV), 16. Pupae: frontal section middle and posterior region. Midgut (IM), Hindgut (IP), Tubule Malpighian (TM), Posterior Silk Gland (GSD), Oenocytes (en).

La glándula sericígena en la prepupa está constituida por un par de tubos glandulares largos y sinuosos, cuyos extremos proximales se unen formando un conducto común, que abre al exterior a través espinerete. La glándula presenta un marcado desarrollo de

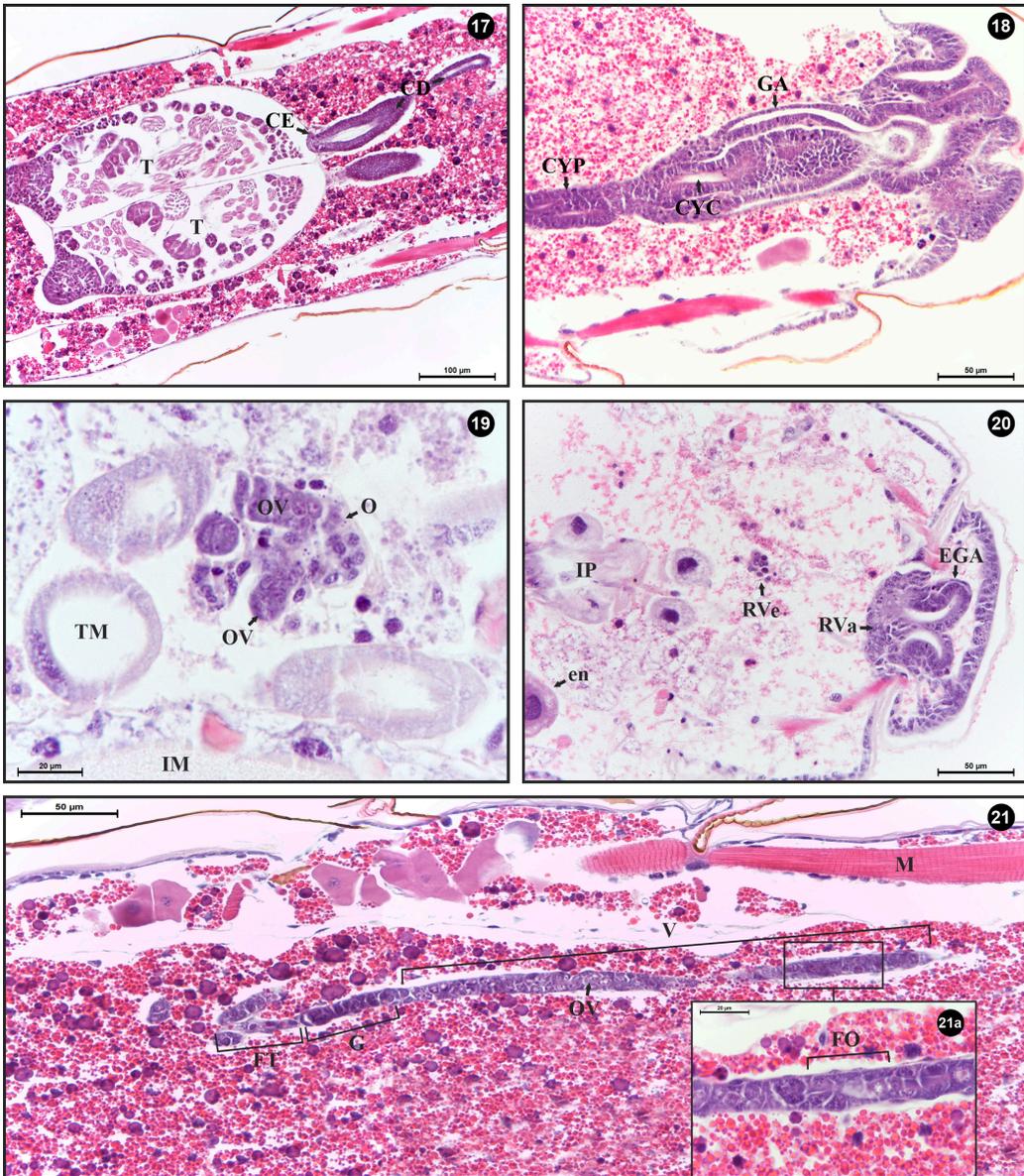
la región distal, con un epitelio de células intensamente basófilas, núcleo ramificado y cromatina condensada. La región media de la glándula presenta un epitelio con células con citoplasma vacuolar levemente basófilo, mientras que la región proximal presenta un delgado epitelio de células basófilas. En el conducto común se observan células con citoplasma levemente basófilo y un núcleo grande basófilo. La luz de las diferentes regiones de la glándula contiene secreción acidófila, siendo más abundante en la región distal de la misma (Fig. 9). En el estadio de pupa el epitelio de la región distal pierde sus límites celulares, observándose gran cantidad de vacuolas basófilas de diversos tamaños que pueden estar aisladas o agrupadas en forma radial (Fig. 16).

En relación con el aparato reproductor, al comienzo del estadio de prepupa el macho presenta un par de testículos, con un solo folículo en el cual se identifica el Germario y la Zona de Crecimiento. Al final de esta etapa se diferencia la Zona de Maduración y Reducción con espermatoцитos primarios y secundarios. Al comienzo del estadio de pupa los testículos permanecen separados laterales al tubo digestivo y el extremo proximal de cada folículo se continúa con un corto conducto eferente y éste con el extremo distal del conducto deferente (Fig. 8). En una etapa más avanzada los testículos se desplazan a una posición media-dorsal y se fusionan formando una estructura de aspecto globoso, recubierta por un epitelio plano que forma la cápsula de la gónada y el tabique interfolicular. En la región proximal de cada folículo se diferencia la Zona de Transformación, en donde se identifican espermátidas en diferentes estadios de la espermiogénesis y bucles de espermatozoides fuertemente basófilos (Figs. 10, 17). A nivel del noveno segmento abdominal se observa la cavidad genital, los esbozos del conducto eyaculador común y de los conductos eyaculadores pares, con activa proliferación de los cordones epiteliales que formarán la pared de dichos conductos. Al final de este estadio se identifica a ambos lados de los conductos eyaculadores pares los rudimentos de las glándulas accesorias (Fig. 18).

La hembra en la prepupa presenta ovarios pares en posición dorsal al intestino medio, formados por cuatro pequeñas ovariolas con células en disposición irregular, entre las cuales no se pueden diferenciar las células nutricias de las células de la línea germinal. Cada ovario está rodeado externamente por un epitelio plano que se extiende en el extremo proximal del mismo formando la porción mesodérmica de los oviductos laterales (Fig. 19). Ventralmente, en el octavo y noveno segmento abdominal, se observan dos pares de discos imaginales que darían origen a las distintas estructuras de la cavidad genital. En este estadio en el octavo segmento se observan los discos imaginales que darán origen a los rudimentos del vestibulo; mientras que, en el noveno segmento se identifican los rudimentos de la vagina, diferenciándose posteriormente los esbozos de las glándulas accesorias (Fig. 20). Durante el estadio de pupa se observa un aumento de longitud de las ovariolas, cuyo extremo distal alcanza los primeros segmentos abdominales. Cada ovariola está constituida por el filamento terminal, formado por la prolongación de la vaina externa de la ovariola, el germario en la región distal con ovogonias distribuidas de forma irregular, y el vitelario constituido en la región media por tejido prefolicular y ovogonias en diferenciación y en la región proximal por folículos que contienen numerosas células nutricias y un ovocito en estadio de previtelogénesis (Figs. 21, 21a). En este estadio se observa aumento de longitud de los rudimentos del vestibulo y rudimentos de la vagina por activa proliferación de los cordones epiteliales.

Discusión

El análisis realizado sobre los cambios histomorfológicos de órganos y sistemas durante los estadios de prepupa y pupa, permitió estudiar y documentar los procesos dinámicos que ocurren durante la metamorfosis de *P. citrella*.



Figuras 17-21. Prepupa y pupa de *Phyllocnistis citrella*. 17. Pupa: corte frontal región media. Testículo (T), Conducto Eferente (CE), Conducto Deferente (CD). 18. Pupa: corte frontal región posterior. Conducto Eyaculador Común (CYC), Conducto Eyaculadores Pares (CYP), Glándulas Accesorias (GA). 19. Prepupa: corte sagital de la región media. Ovario (O), Ovariola (OV), Túbulos de Malpighi (TM), Intestino Medio (IM). 20. Prepupa: corte frontal de la región posterior. Rudimento del Vestíbulo (RVe), Rudimento de la Vagina (RVa), Esbozo de la Glándula Accesorio (EGA), Intestino Posterior (IP), Enocitos (en). 21. Pupa: corte sagital región media. Ovariola (OV), Filamento Terminal (FT), Germario (G), Vitelarario (V). 21a. Folículo Ovárico (FO). / 17. Pupae: frontal section of the middle region. Testis (T), Vas Efferens (CE), Vas Deferens (CD). 18. Pupae: frontal section of the posterior region. Single Ejaculatory Duct (CYC), Pair Ejaculatory Duct (CYP), Accessory Glands (GA). 19. Prepupae: sagittal section of the middle region. Ovary (O), Ovariole (OV), Tubule Malpighian (TM), Midgut (IM). 20. Prepupae: frontal section of the posterior region. Vestibular Rudiments (RVe), Vaginal Rudiments (RVa), Accessory Glands Rudiments (GA), Hindgut (IP), Oenocytes (en). 21. Pupae: sagittal section of the middle region. Ovariole (OV), Terminal Filaments (FT), Germarium (G), Vitellarium (V). 21a. Ovarian Follicle (FO).

Vargas *et al.* (1998) mencionan para el “minador de los cítricos” un tipo de pupa exarada, mientras que Asplanato (2009) sugiere una pupa de tipo obtecta. En este trabajo, las características observadas en la morfología externa e interna de la pupa del minador, que muestra podotecas y pteroteca adheridas al cuerpo y cubiertas por un tegumento externo esclerotizado, confirmarían que esta especie tiene una pupa de tipo obtecta.

Hopkins *et al.* (2000) en su análisis sobre las proteínas de la cutícula pupal de *Manduca sexta* (Linnaeus, 1758) sostienen que la esclerotización del tegumento estaría relacionada con el incremento de proteínas cuticulares que darían origen al exoesqueleto del adulto. En el análisis del tegumento de *P. citrella* se observan importantes cambios en el espesor de la hipodermis y en la coloración de la cutícula, los cuales indicaría un activo proceso de esclerotización. Por otra parte, el contenido acidófilo observado entre la cutícula y la epidermis pupal del minador estarían relacionados con los procesos de digestión de la cutícula larval.

Los enocitos que en los insectos inmaduros están asociados con los ciclos de muda participarían en el desarrollo de la cutícula abdominal y serían los responsables de la síntesis de diversas ceras y otros lípidos involucrados en la impermeabilización de la cutícula (Chapman 1998; Martins y Ramalho-Ortigão 2012). Según Evans (1967) y Locke (1969) la acidofilia citoplasmática de los enocitos se debe a la presencia de abundante retículo endoplasmático liso, sugiriendo la participación de estas células en la síntesis de cera. Por otro lado, Cassier *et al.* (1995) sugieren que los enocitos sintetizan los hidratos de carbonos de la cera. Las variaciones citoplasmáticas observadas en los enocitos de *P. citrella* durante la metamorfosis sugieren que su función está relacionada con la síntesis de lípidos o lipoproteínas y de la cera de la epicutícula.

Lai-Fook (1973) y Lane *et al.* (1986) observan la glándula de Verson durante el desarrollo larval y la transición larva-pupa de *Calpodex Hübner*, 1819 y *M. sexta*. Vaca y Michel (2016) al analizar las variaciones histomorfológicas durante el desarrollo larval de *P. citrella* no mencionan la presencia de esta glándula en el tegumento. Horwath y Riddiford (1988) determinaron en *M. sexta* que la secreción se compone de polipéptidos de distintos pesos moleculares que contribuyen a la formación de la capa de cemento de la cutícula. En este trabajo la presencia de la glándula de Verson en el estadio de prepupa y la basofilia citoplasmática de la región secretora, que indica activa síntesis de secreción proteica, sugiere que su función estaría relacionada con los procesos de muda.

El desarrollo postembrionario y la morfología del ganglio cefálico en los holometábolos, incluyendo los lepidópteros, han sido foco de estudio de varias investigaciones en las cuales se trató de determinar el grado de desarrollo del cerebro en los estadios larvales y sus transformaciones durante la metamorfosis (Shirokov y Chaika 2014). En algunas especies de Lepidoptera el sistema nervioso no sufre cambios durante el desarrollo postembrionario, mientras que en otras especies se observan cambios significativos a nivel de los centros sensoriales. Asimismo, durante la metamorfosis la cadena nerviosa ventral puede sufrir cambios asociados a la reducción en la longitud de la conexión entre ganglios como consecuencia de la fusión e incorporación en diferente grado de los ganglios torácicos y abdominales. En la condición ancestral de *Monodistriya* y *Distriya* basales, los tres ganglios torácicos permanecen separados y el número de ganglios abdominales puede variar de dos a seis; mientras que, en la mayoría de los *Distriya* el segundo y tercer ganglio torácicos están fusionados y poseen cuatro ganglios abdominales (Niven *et al.* 2008; Song *et al.* 2009). En estudios previos realizados durante el desarrollo larval de *P. citrella*, el sistema nervioso consiste en un par de ganglios cerebrales, tres pares de ganglios torácicos y un par de masas ganglionares en cada segmento abdominal (Vaca y Michel 2016). Los resultados obtenidos durante la metamorfosis en el “minador de los cítricos” muestran cambios significativos a nivel del sistema nervio, destacándose en la prepupa la completa fusión de los ganglios cerebrales y el inicio de la diferenciación de las regiones del cerebro.

En la región del tórax los ganglios pares están fusionados entre sí, pero permanecen independientes en cada segmento. Mientras que, en la región abdominal se observa una clara diferenciación de la cadena ganglionar constituidas por masa nerviosas fusionadas en cada segmento y conectadas entre sí por tejido conectivo interganglionar. En el estadio de pupa se destaca la activa formación y diferenciación de los principales centros sensoriales como los lóbulos ópticos y antenales. La estructura observada en la cadena nerviosa ventral durante la metamorfosis sugiere la necesidad de realizar estudios posteriores de este sistema en el adulto, con el fin de corroborar que las características descriptas para *P. citrella* corresponden a una condición primitiva dentro de los lepidópteros.

En Lepidoptera, como en otros insectos con desarrollo indirecto, el canal alimenticio es remodelado durante la metamorfosis en especies con diferentes dietas en larva y adulto. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones sobre el tracto digestivo en los lepidópteros se restringen al desarrollo larval siendo escasos los estudios que incluyen pupa y adulto (Judy y Gilbert 1969; Waku y Sumimoto 1971; Neves *et al.* 2002). Kömüves *et al.* (1984) en su estudio sobre autofagocitosis de las células del intestino medio larval durante la metamorfosis de *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758), pudo observar en pupas recién emergidas como las células del mesenterón recién formadas y en degeneración se van separando unas de otras, y como estas últimas son liberadas y digeridas en lumen intestinal. Los cambios tisulares progresivos observados en el intestino medio durante el estadio pupa de *P. citrella*, evidencian procesos de destrucción celular o apoptosis a lo largo del epitelio, lo que indicaría que durante la metamorfosis de esta especie se produce la histólisis del epitelio larval y la histogénesis a partir de las células regenerativas. Asimismo, la disminución del volumen del intestino medio y la presencia de abundantes células en digestión indicarían activos procesos de autofagocitosis.

Los resultados obtenidos sobre los procesos de histólisis e histogénesis del tubo digestivo durante la metamorfosis de *P. citrella* y la presencia de discos imaginales en el extremo anterior y posterior del intestino medio, evidencian que algunas estructuras aún no se han diferenciado, sugiriendo la necesidad de realizar en el futuro estudios histomorfológicos del canal alimenticio en el adulto de esta especie.

La estructura celular de los túbulos de Malpighi ha sido ampliamente estudiada en insectos tanto en larvas como en adultos. En algunos Lepidoptera los túbulos crecen por elongación de las células y poliploidización durante el desarrollo larval, mientras que durante la metamorfosis estos permanecen intactos o sufren histólisis (Srivastava y Khare 1966; Ryerse 1979; Rigoni *et al.* 2004). Durante el desarrollo larval del “minador de los cítricos” los extremos distales de los túbulos de Malpighi desembocan en el recto, formando el sistema criptonefridial (Vaca y Michel 2016). Durante la metamorfosis de *P. citrella* no se observa unión entre los extremos distales de los túbulos de Malpighi con el recto, lo cual sugiere que en esta especie el sistema criptonefridial solo es funcional durante el desarrollo larval. Por otro lado, los túbulos de Malpighi en prepupa y pupa no presentan vacuolas de autofagia o células con función fagocítica, lo que indicaría que en esta especie los mismos no sufren procesos de histólisis durante la metamorfosis.

En Lepidoptera la glándula de la seda pasa por cuatro fases consecutivas: desarrollo, secreción, regresión y degenerativa, las cuales ocurren en diferentes momentos durante el desarrollo posembriionario según la especie (Barsagade y Tembhare 2000). Esta glándula es uno de los principales órganos que se degrada durante la metamorfosis, siendo interesante el estudio de los mecanismos celulares y subcelulares por los cuales la parte posterior sufre autodegradación (Matsuura *et al.* 1968). En *P. citrella* durante el desarrollo larval se producen cambios en la morfología, desarrollo y actividad secretora de la glándula de la seda (Vaca y Michel 2016). Durante el estadio de pupa la presencia de células fagocitarias en la región distal o posterior de la glándula indicaría lisis celular relacionada con las fases de regresión y degenerativa.

Según Lai-Fook (1982), Reinecke *et al.* (1983) y Jones *et al.* (1984) los testículos de Lepidoptera, constituidos por 4 folículos, durante la metamorfosis sufren un comportamiento de migración, fusión y torsión. En *Phyllocnistis citrella*, a diferencia de lo mencionado para otras especies de Lepidoptera, los testículos unifoliculares durante los estadios de prepupa y pupa solo muestran comportamientos de migración y fusión. Considerando los tipos de ovariolas descritas para insectos por Gillot (1995) y Büning (1994), la presencia de cuatro células nutricias y un ovocito en cada folículo ovárico confirmarían que las ovariolas de *P. citrella* son de tipo meroísticas politróficas.

En relación con las restantes estructuras del aparato reproductor del macho y de la hembra de *P. citrella* y el grado de desarrollo alcanzado durante el estadio de pupa, sugieren la necesidad de continuar con el estudio de estas estructuras en el adulto.

Conclusión

En este trabajo se aportan datos sobre aspectos del desarrollo para un mejor conocimiento de la biología de *P. citrella*. Se muestran los cambios que se producen durante la metamorfosis, evidenciándose los órganos y sistemas en los cuales ocurren procesos de histólisis e histogénesis que conducen a la formación de las estructuras definitivas del adulto. Los resultados obtenidos sobre el estado de desarrollo alcanzado al final de la metamorfosis en el sistema nervioso, el canal alimenticio y el sistema reproductivo en ambos sexos sugieren la necesidad de continuar con estudios histomorfológicos en el adulto.

Agradecimientos

Agradecemos al Sr. José Rodríguez por permitirnos realizar los muestreos en su quinta de limones en el Dpto. Taíí Viejo (Tucumán, Argentina) y al Téc. Franco Pucci Alcaide por la toma de microfotografía. Este trabajo se realizó en su totalidad con fondos de la Fundación Miguel Lillo.

Literatura Citada

- Achor, D.S., Browning, H. y Albrigo, L.G. (1997)** Anatomical and histochemical modifications in citrus leaves caused by larval feeding of citrus leaf miner. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(6): 829-836.
- 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.
- Barsagade, D.D. y Tembhare, D.B. (2000)** Development, structure and secretory activity of silk gland complex in the tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* (Drury) (Lepidoptera: Saturniidae). *Sericologia*, 40(2): 231-245.
- Büning, J. (1994)** The ovary of Ectognatha, the Insecta s. str. In *The Insect Ovary*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0741-9_3.
- Chagas, M.C.M., Parra, J.R.P., Namekata, T., Hartung, J.S. y 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. (1998)** *The Insects, Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, 770 pp.
- Cassier, P. y Lensky, Y. (1995)** Ultrastructure of the wax gland complex and secretion of beeswax in the worker honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 26: 17-26.

- Evans, J.J.T. (1967) Development and ultrastructure of the fat body cells and oenocytes of the Queensland fruit fly, *Dacus tryoni* (Frogg). *Zeitschrift für Zellforschung*, 81: 49-61.
- Garijo, C. y García, E.J. (1994) *Phyllocnistis citrella* (Stainton, 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.
- Garrido Vivas, A. (1995) El minador de los cítricos. Aspectos biológicos y enemigos naturales encontrados en España. *Vida Rural*, 14: 62-65.
- Garrido Vivas, A. y Gascón López, I. (1995) Distribución de fases inmaduras de *Phyllocnistis citrella* Stainton, según el tamaño de la hoja. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas*, 21: 559-571.
- Ge, S.Q., Hua, Y., Ren, J., Slipinski, A., Heming, B., Beutel, R.G., Yang, X.K. y Wipfler, B. (2015) Transformation of head structures during the metamorphosis of *Chrysomela populi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 73(1): 129-152.
- Gilbert, L.I. y Schneirderman, H.A. (1961) Some biochemical aspects of insect metamorphosis. *American Zoologist*, 1: 11-51.
- Gillot, C. (1995) Entomology. 2nd Edn. Plenum Press, New York, 798 pp.
- Gomez-Orte, E. y Belles, X. (2009) MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 21678-21682.
- Hammer, T.J., McMillan, W.O. y Fierer, N. (2014) Metamorphosis of butterfly-associated bacterial community. *PLoS ONE*, 9(1): e86995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086995>
- Heppner, J.B. (1993) Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* in Florida (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). *Tropical Lepidoptera*, 4(1): 49-64.
- Hopkins, T.L., Krchma, L.J., Ahmad, S.A. y Kramer, K.J. (2000) Pupal cuticle proteins of *Manduca sexta*: characterization and profiles during sclerotization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 19-27.
- Horwath, K.L. y Riddiford, L.M. (1988) Stage and segment specificity of the secretory cell of dermal glands of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology*, 130(1): 365-373.
- Jacas, J.A. y Garrido, A. (1996) Differences in the morphology of male and female of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). *Florida Entomologist*, 79: 603-606.
- Jones, J.A., Guthrie, W.D. y Brindley, T.A. (1984) Postembryonic development of the reproductive system of male European corn borers, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 77: 155-164.
- Judy, K.J. y Gilbert, L.I. (1969) Morphology of the alimentary canal during of metamorphosis of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 62(6): 1438-1446.
- Kim, D.S., Choi, C.C., Lee, S. y Byun, B.K. (2015) Taxonomic notes on *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) with genital structures and DNA barcode from Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 8: 295-297.
- Kömüves, L.G., Sass, M. y Kovács, J. (1984) Autophagocytosis in the larval midgut cells of *Pieris brassicae* during metamorphosis. Induction by 20-hydroxyecdysone and the effect of puromycin and cycloheximide. *Cell and Tissue Research*, 240: 215-221.
- Lai-Fook, J. (1973) The fine structure of Verson's glands in molting larvae of *Calpododes ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). *Canadian Journal of Zoology*, 51: 1201-1210.
- Lai-Fook, J. (1982) Structure, function, and possible evolutionary significance of the constrictions in the male reproductive system of *Calpododes ethlius* (Hesperiidae, Lepidoptera). *Canadian Journal of Zoology*, 60: 1828-1836.
- Lane, S., Riddiford, L.M., Truman, J.W. y Conitz, J. (1986) Development of the prepupal Verson's gland of tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal control. *The Journal of Experimental Zoology*, 240: 83-94.

- Locke, M. (1969)** The ultrastructure of the oenocytes in the molt/intermolt cycle of an insect. *Tissue and Cell*, 1: 103-154.
- Martins, G.F. y Ramalho-Ortigão, J.M. (2012)** Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9: 139-152.
- Matsuura, S., Morimoto, T., Nagata, S. y Tashiro, Y. (1968)** Studies of the posterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. II Cytolytic processes in posterior silk gland cell during metamorphosis from larva to pupa. *Journal of Cell Biology*, 38: 589-603.
- Monteresino, E.M. y Manfrini de Brewer, M. (2001)** Diccionario Entomológico. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. I.S.B.N: 950-665-174-4.
- Neves, C.A., Brito Gitirana, L. y Serrão, J.E. (2002)** Ultrastructure study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. *Sociobiology*, 41(1): 443-459.
- Niven, J.E., Graham, C.M. y Burrows, M. (2008)** Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annual Review of Entomology*, 58: 14.1-14.19.
- Quicke, D.L., Ingram, S.N. y Baillie-Gaitens, P.V. (1992)** Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta*, 21: 381-402.
- Reinecke, L.H., Reinecke, J.P. y Adams, T.S. (1983)** Morphology of the male reproductive tract of mature larval, pupa and adult tobacco hornworms (Lepidoptera: Sphingidae), *Manduca sexta*. *Annals of the Entomological Society of America*, 76: 365-375.
- Rigoni, G.M. y Conte, H. (2004)** Morphology of Malpighian tubules in larvae of *Diatraea saccharalis* (F) (Lepidoptera; Crambidae) at final larval development. *Cytologia*, 69(1): 1-6.
- Ryerse, J.S. (1979)** Development changes in Malpighian tubule cell structure. *Tissue and Cell*, 11(3): 533-551.
- Sanchez, J., Cermeli, M. y Morales, P. (2002)** Ciclo biológico del minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Staiton (Lepidoptera: Gracillariidae) en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Entomotropica*, 17(2): 167-172.
- Shirokov, V.N. y Chaika, S. Yu. (2014)** Structure of the cephalic ganglion in the larvae and pupae of the tortrix moth *Archips podana* Scopoli (Lepidoptera, Tortricidae). *Entomological Review*, 94(9): 1239-1250.
- Snodgrass, R.E. (1959)** The anatomical life of the mosquito. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 138(8): 1-87.
- Song, H.Y., Choi, C.O., Kim, M.Y., Kim, B.Y., Yoon, T.Y., Song, D.Y., Park, J.C., Kang, P.D., Lee, S.H., Bae, Y.J. y Lee, B.H. (2009)** Characterization of neuronal apoptosis in the ventral ganglia of postembryonic silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *European Journal of Entomology*, 106(4): 507-518.
- 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.
- Suárez Perera, E., Jiménez Carbonell, R., Acea Piloña, R. y Castellano González, L. (2005)** Enemigos naturales de *Phyllocnistis citrella* Station (minador de la hoja de los cítricos) en la empresa citricola de Arimao, Cienfuegos. *Fitosanidad*, 9(2): 45-46.
- Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q., Grimaldi, A. y Eguileor, M. (2011)** Autophagy in Lepidopteras: more than old wine in new bottle. *Invertebrate Survival Journal*, 8: 5-15.
- Truman, J.W. y Reiss, S.E. (1995)** Neuromuscular metamorphosis in the moth *Manduca sexta*: hormonal regulation of synapse loss and remodeling. *The Journal of Neuroscience*, 15(7): 4815-4826.
- Truman, J.W. y Riddiford, L.M. (1999)** The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 401: 447-452.
- Vaca, G.V. y Michel, A.A. (2016)** Morfología del desarrollo larval de *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) en cultivos de citrus de Tucumán. *Acta Zoológica Lilloana*, 60(2): 148-169.

- Vaca, G.V., Michel, A.A. y Pucci Alcaide, F.J. (2019)** Histology and histochemistry of fat body during the postembryonic development of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Revista Chilena de Entomología*, 45(4): 521-532.
- Vargas, H., Bobadilla, D., Jiménez, M. y Vargas, H. (1998)** Algunas características biológicas del minador de los cítricos, *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) observadas en el valle de Azapa, I region, Chile. *Idesia*, 15: 65-75.
- Waku, Y. y Sumimoto, K.I. (1971)** Metamorphosis of midgut epithelial cell in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. I. Light microscopy. *Tissue and Cell*, 3(1): 127-136.
- Wang, Y., Lin, D.S., Bolewicz, L. y Connor, W.E. (2006)** The predominance of polyunsaturated fatty acids in the butterfly *Morpho peleides* before and after metamorphosis. *Journal of Lipid Research*, 47: 530-536.