

NATHÁLIA COELHO VARGAS

**DESENVOLVIMENTO NINFAL E MORFOLOGIA DO TRATO
DIGESTIVO E REPRODUTOR DE FÊMEAS DE *Phibalosoma phyllinum*
(PHASMIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-graduação em Biologia
Animal, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

NATHÁLIA COELHO VARGAS

DESENVOLVIMENTO NINFAL E MORFOLOGIA DO TRATO DIGESTIVO E REPRODUTIVO DE FÊMEAS DE *Phibalosoma phyllinum* (PHASMIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de julho de 2009.

Prof. José Cola Zanuncio
(Co-orientador)

Prof. José Eduardo Serrão
(Co-orientador)

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos

Prof. Luiz Carlos dos Santos

Prof. Evaldo Ferreira Vilela
(Orientador)

Aos meus queridos pais José Ronaldo e M^a Adelina.
Que nunca duvidaram da minha capacidade.

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil a tua direita, mas não chegará a ti”.
Salmo 91, versículo: 7

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui, por ter me concedido sabedoria, forças e perseverança para conquistar esta vitória.

A minha mãe M^a Adelina que sempre esteve ao meu lado nos meus momentos de alegria e angústia, nunca me abandonando.

Ao meu pai José Ronaldo que teve a paciência de me acompanhar e me apoiar pelas estradas de Muriaé/Viçosa.

Aos meus irmãos, Alexandre e Júnior, e minha cunhada Gisele, pelo incentivo e amizade.

Ao meu companheiro, Luciano, por tudo e principalmente por em um momento decisivo, não ter me deixado desistir.

A minha amiga Ana Paula Matta e seu esposo Paulo Roberto, por me acolherem, incentivar e ajudar sempre. Obrigada!

Ao Professor e Orientador Evaldo Vilela, por ter me dado a oportunidade de fazer parte deste maravilhoso mundo da pesquisa.

Ao meu co-orientador Zanuncio pelas correções e textos que muito contribuíram para meu aprendizado.

Ao meu co-orientador Serrão, por ter depositado em mim confiança antes mesmo de me conhecer. Pela maneira atenciosa e paciente com que se dedicou a mim nos momentos de orientação. Guardarei sempre a amizade, o respeito e o carinho por você. Obrigada!

Aos Professores Renato Feio e Fiuza, por sempre me ampararem com uma palavra de carinho.

Ao Professor Sérgio da Matta, por diversas vezes ter me ajudado e cedido o seu laboratório.

Ao Coordenador do Curso Professor Jorge Dergan por acreditar em mim.

Aos amigos e companheiros de trabalho: Ana Paula, Diego, Eliana, Fabíola, Finim, Juliana, Leandro Goulart, Kívia, Michel, Uedson Jacobina, Vinícius (São Pedro), por serem sempre tão legais, por toda contribuição durante o curso. Espero

conviver outros momentos com vocês, para desfrutarmos um pouco mais desta amizade que construímos.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, em especial ao Adnilson pela paciência e atenção.

As minhas “amigas- irmãs” Núbia e Marina, pela companhia e amizade mesmo distantes.

A minha família, tios (as), primos (as), padrinhos e amigos (as) que, sempre, estiveram ao meu lado.

Aos Professores e funcionários da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Santa Marcelina que, desde o início, me incentivaram.

Agradeço a Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, M.G. pela doação dos insetos e ovos utilizados neste trabalho, e também as informações necessárias sobre os insetos.

Obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Nathália Coelho Vargas, filha de José Ronaldo Vargas e Maria Adelina Coelho Vargas, nasceu em Muriaé, Minas Gerais, em 20 de julho de 1983. Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Santa Marcelina (Fafism), em Julho de 2006. Em outubro de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Biologia Animal, no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em 03 de Julho de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	4
3.1. Análise morfométrica e biologia de ninfas de <i>Phibalosoma phyllinum</i>	4
3.2. Histologia.....	5
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura	5
4. RESULTADOS	6
4.1. Morfometria e Biologia.....	6
4.2. Morfologia.....	12
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

VARGAS, Nathália Coelho Vargas, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. **Desenvolvimento ninfal e morfologia do trato digestivo e reprodutor de fêmeas de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmidae)**. Orientador: Evaldo Ferreira Vilela. Co-orientadores: José Cola Zanuncio e José Eduardo Serrão.

Phibalosoma phyllinum é o Phasmatodea mais comum no Brasil. O desenvolvimento ninfal e a morfologia dos principais órgãos do aparelho digestivo e reprodutor de fêmeas adultas desse inseto foram analisados. Ninfas foram alimentadas com folhas de goiabeira (*Psidium guajava*), mangueira (*Mangifera indica*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*). Suas ninfas foram medidas a cada cinco dias, para verificar o tamanho corpóreo, e observações sobre comportamentos e reprodução foram realizados. Dez instares ninfais foram observados para ninfas alimentadas com folhas de goiabeira e pitangueira e nove instares naquelas com folhas de mangueira, com os insetos alimentados com folhas de mangueira e pitangueira apresentando maior tamanho corporal. O trato digestivo de *P. phyllinum* apresenta-se como um tubo alongado pouco diferenciado anatomicamente desde a boca até o ânus. A porção anterior do intestino médio apresenta a parede pregueada, enquanto a porção posterior não apresenta pregas. A passagem do intestino médio para o posterior caracteriza-se por inúmeros túbulos de Malpighi. O intestino fino apresenta uma parede com dobras do epitélio formado por uma camada única de células, sendo essas cúbicas e com núcleo esférico. O reto de *P. phyllinum* é composto por epitélio simples, com células achatadas e núcleo alongado, apresentando uma luz envolvida por uma cutícula evidente e uma musculatura mais desenvolvida com fibras longitudinais e circulares. As fêmeas dessa espécie possuem um par de ovários pectinados que percorrem todo o abdômen. Uma glândula acessória foi encontrada associada ao sistema reprodutor abrindo no oviduto comum. Os testes histoquímicos mostraram que a glândula é rica em carboidratos, proteínas e algum conteúdo lipídico.

ABSTRACT

VARGAS, Nathália Coelho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2009. **Nymphal development and morphology of digestory and reproductive tracts of female *Phibalosoma phyllinum* (Phasmidae)**. Advisor: Evaldo Ferreira Vilela. Co-advisors: José Cola Zanuncio and José Eduardo Serrão.

Phibalosoma phyllinum is the Brazilian most common Phasmatodea. The nymphal development and the morphology of the main organs of both digestive and reproductive apparatus of the female were studied. Nymphs were fed on guava (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*) and Surinam cherry (*Eugenia uniflora*) leaves and their body size were measured, and their behavior and reproduction were observed. Nymphal instars fed on Surinam cherry leaves and on mango developed bigger body sizes. The digestory tract of *P. phillyinum* was described as a long, slightly differing anatomically tube since the mouth up to the anus. The front portion of middle intestine has folded walls, whereas back portion has no folds. The passage from middle to posterior intestine is characterized by having numerous Malpighi tubules. The thin intestine is known for its wall with epitelio folds formed by an only layer of cells, which are cubic and spherical nucleus. The rectum of *P. phyllinum* comprises simple epitelio, with flat cells and long nucleus, presenting a light covered by an evident cuticle and the musculature more developed with longitudinal and circular fibers. The females of this species have a pair of pectinada ovaries which pass through the whole abdomen. An accessory gland was found associated to reproductive apparatus opened by the common oviduct. Histochemical tests showed that the gland is rich in carbohydrates, proteins and some lipid content.

1. INTRODUÇÃO

Phasmatodea agrupa insetos com forma camuflada imitando gravetos, galhos, folhas e até líquens, passando muitas vezes despercebidos (Costa-Lima, 1938). A primeira espécie desta ordem foi descrito no século XVII (Teixeira, 1997), sendo o inseto mencionado boamesa: “Trata-se de uma estranha criatura parecida com um rebento, ou um pedaço de graveto quebrado, sendo a princípio verde como capim, e, depois amarelo-escuro. Quando se quer agarrá-lo, salta para longe”.

Aproximadamente 3.000 espécies de Phasmatodea foram descritas, sendo 800 na região neotropical (Faria *et al.*, 2004, Whiting *et al.* 2003). São insetos encontrados do Leste ao Norte da América do Sul. De modo geral, apresentam corpo alongado, subcilíndrico, pernas longas e finas com expansões ou espinhos; cabeça pequena livre, com olhos desenvolvidos, antenas filiformes, asas apenas nos machos; protórax pequeno, metatórax e mesotórax grandes e abdome formado por 19 urômeros (Costa-Lima, 1938).

A ordem Phasmatodea contém os insetos mais longos conhecidos, sendo: *Bactridium grande*, Rehn 1920, cujo tipo (fêmea) tem 265 mm; *Otocrania aurita*, Bruto 1839, fêmeas podendo apresentar até 245 mm. *Phibalosoma phyllinum*, Gray, 1835, com fêmeas atingindo 220 mm de comprimento e é uma das maiores espécies de insetos do Brasil (Costa-Lima, 1938).

A reprodução de Phasmatodea é sexuada e são ovíparos. No entanto a reprodução partenogenética, pode ocorrer (Costa-Lima, 1938). A cópula pode durar até 10 dias e após esse período a fêmea pode permanecer com o cerco aberto por, até, 24 horas. A cópula de *Bactridium granullicolis* pode durar de oito a 18 horas (Zapata & Torres, 1970).

A forma, cor e tamanho, dos ovos de Phasmatodea e servem de parâmetro para a identificação das espécies (Clark, 1976).

Estudos morfológicos do aparelho reprodutor feminino dos insetos são importantes para relações filogenéticas entre espécies dessa ordem (Lalitha *et al.*, 1997; Bilinsk *et al.*, 1998; Jaglarz, 1998; Kubrakiewicz *et al.*, 1998; Simiczyjew *et al.*, 1998; Szklarzewicz, 1998; Martins & Serrão, 2002; 2004).

O sistema reprodutor de Phasmatodea é pouco estudado e, por isto, o sistema reprodutor do grupo de insetos mais próximo, Orthoptera, tem sido utilizado para

comparação. O aparelho reprodutor de Orthoptera tem um par de ovários com número variável de ovariolos do tipo panoístico, ou seja, desprovidos de células nutridoras dos ovócitos. Os ovariolos ligam-se aos ovidutos laterais, que se unem formando o oviduto comum conectando-se a câmara genital, onde se abre o ducto da espermateca (Uvarov, 1966; Silva & Caetano, 1991).

O aparelho reprodutor feminino de Orthoptera, especialmente de Acrididae, apresenta variações morfológicas (Silva & Caetano, 1991) com o número de ovariolos por ovário variando com a espécie (Jaglarz, 1998). E esse número pode decrescer em de Orthoptera, em até cinco ovariolos por ovário em Acrididae (Matsuda, 1976).

O sistema digestivo de insetos pode indicar o modo de vida, e as relações filogenéticas entre estes animais (Serrão, 2001, 2005, 2007).

O trato digestivo dos insetos em geral é dividido em: intestino anterior ou estomodeu, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior ou proctodeu de acordo com em suas origens embriológicas. Os intestinos anterior e o posterior originam-se de invaginações do ectoderma, enquanto o médio tem origem endodérmica (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 1985).

O sistema digestivo de insetos em geral varia entre suas espécies, mas, geralmente, o intestino anterior está relacionado com o armazenamento e fragmentação dos alimentos antes que alcancem o intestino médio. Essa parte encontra-se, primariamente, envolvida com a digestão e absorção de nutrientes, e produção de enzimas. O intestino posterior está relacionado com a excreção e equilíbrio hidroeletrólítico do organismo (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 1985; Terra, 1988).

O ciclo de vida dos insetos pode ser contínuo ou apresentar uma desaceleração ou interrupção, através do atraso de eclosão das ninfas, ou alterações no desenvolvimento, em qualquer fase (ovo, ninfa ou adulto), garantindo a sobrevivência em condições desfavoráveis (Mansingh, 1971; Saunders, 1976; Danks, 1987). As condições externas, como: clima, temperatura, alimentação afetam a longevidade e a reprodução de ortópteros (Uvarov, 1966).

Insetos podem apresentar preferência por determinadas plantas (Anjos *et al.*, 1970; Oliveira *et al.*, 1984; Osse & Brinquelot, 1970), o que interfere na escolha e biologia dos mesmos (Silva *et al.* 2009; Saavedra *et al.* 1995; Lemos *et al.* 2003, Zanuncio *et al.* 2001).

2. OBJETIVO

O objetivo foi descrever a morfologia histológica dos principais órgãos do aparelho digestivo e reprodutor feminino de fêmeas adultas de *P. phyllinum* e avaliar se diferentes dietas afetaram suas ninfas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Adultos e os ovos de *Phibalosoma phyllinum*, foram doados pela Fundação Zoobotânica, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, mas esses exemplares tiveram origem na região de Curitiba, PR. Na FZB-BH (Fundação Zoobotânica, Belo Horizonte), estes animais eram alimentados com folhas de goiabeira e pitangueira uma criação para fins didáticos. Os animais eram mantidos em viveiros, no auditório da Casa de Educação Ambiental ou na Zooboteca - um dos espaços educativos da FZB-BH.

Ninfas foram acondicionadas em três gaiolas de madeira (100 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura), teladas nas laterais e na tampa, com fundo de madeira e a parte da frente de vidro. Essas gaiolas foram mantidas em temperatura ambiente de 22 a 33 graus. Ninfas de *P. phyllinum* foram separadas em três caixas logo após a eclosão, com 15 ninfas cada uma. Estas ninfas receberam seguintes dietas: o tratamento T1- folhas de goiabeira (*Psidium guajava*), T2- folhas de mangueira (*Mangifera indica*) ou T3- folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*). A escolha das espécies vegetais foi em função de trabalhos preliminares que mostraram serem estas três espécies os melhores substratos para *P. phyllinum*. Os ramos eram colhidos e colocados em potes com água e esponjas vegetais para melhor conservação (Vargas *et.al.*, 2008). Os ramos foram trocados a cada cinco dias. A inclusão de folhas de goiabeira foi necessária em outras gaiolas nos últimos meses de tratamento, devido à morte de insetos, nas duas gaiolas sem folhas de goiabeira (Ferreira, 2007).

3.1 Análise morfométrica e biologia de ninfas de *Phibalosoma phyllinum*

Ninfas de *P. phyllinum* de cada caixa foram medidas com régua e paquímetro a cada cinco dias, durante seis meses, para avaliar se as diferentes dietas alteravam o crescimento corporal das mesmas, sendo feitas às medidas da cabeça até o fim do corpo, excluindo as antenas e as pernas. A primeira medida foi realizada quando as ninfas eclodiram dos ovos e apresentavam aproximadamente 2,3 cm e foram colocadas nas respectivas gaiolas, os ovos recebidos também foram medidos. Os hábitos alimentares e a sobrevivência dos indivíduos foram registrados pela manhã, à tarde e à noite, sendo as ninfas medidas no período da tarde. Diariamente, água era borrifada nas folhas, para fornecimento de água aos insetos.

Cinco fêmeas jovens foram separadas dentre os insetos recebidos da criação da Fundação Zoobotânica, Belo Horizonte, Minas Gerais, em uma gaiola isolada dos machos para caracterizar a possível ocorrência de partenogênese.

Os dados morfométricos de tamanho das ninfas foram submetidos a análise de variância, a 5% de probabilidade.

3.2 Histologia

Fêmeas adultas de *P. phyllinum* foram anestesiadas com éter etílico e dissecadas em solução de NaCl 125 mM para a retirada do trato digestivo e do sistema reprodutor, os quais foram transferidos para solução de Zamboni (Stefanini, 1967). Fragmentos de cada órgão de *P. phyllinum* foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 95° e 100°), com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os órgãos foram embebidos em hidroxietil metacrilato (Historesin[®] Leica). Seções com 3µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina. Algumas seções foram submetidas a testes histoquímicos de PAS para evidenciação de polissacarídeos neutros e de mercúrio bromofenol para evidenciação de proteínas totais e à reação de Feulgen para evidenciação de DNA (Pearse, 1953).

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Fragmentos do intestino médio e dos ovários foram desidratados em série de etanol, passados por hexametildisilazane, secos ao ar, metalizados com ouro e analisados em microscópio eletrônico de varredura LEO VP1430, após a dissecação e fixação.

4. RESULTADOS

4.1 Morfometria e Biologia

Phibalosoma phyllinum apresentou 10 instares ninfais nas larvas alimentadas com folhas de goiabeira e pitangueira e nove instares nas ninfas alimentadas com folhas de mangueira.

O tamanho do corpo das ninfas de *P. phyllinum* variou com a dieta recebida. O tamanho inicial das ninfas foi de $2,3 \pm 0,2$ cm. A segunda medida evidenciou que ninfas alimentadas com folhas de goiabeira foram maiores que aquelas alimentadas com folhas de mangueira e pitangueira, respectivamente, sendo que as ninfas de *P. phyllinum* dobram em tamanho entre a segunda e a quarta muda (Tabela 1).

A preferência por folhas de goiabeira ocorreu quando colocada como opção junto às outras espécies de plantas e na presença desta espécie, os insetos não se alimentavam das demais. Alguns instares foram melhores em goiabeira e outros em mangueira, mas ambos foram melhores que pitangueira (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1 – Variação das médias de tamanho de acordo com alimentação oferecida.

Instar	Substrato alimentar						Estatística
	<i>Psidium guajava</i>		<i>Mangifera indica</i>		<i>Eugenia uniflora</i>		
I	2,60	± 0,03 a	2,48	± 0,02 b	2,43	± 0,01 b	F ^P _{2;42} =16,793 ^{0,0001}
II	3,91	± 0,04 a	3,77	± 0,03 b	3,37	± 0,88 c	F ^P _{2;42} =87,149 ^{0,0001}
III	5,37	± 0,04 a	5,48	± 3,87 a	4,71	± 0,02 b	F ^P _{2;42} =39,369 ^{0,0001}
IV	6,98	± 0,04 b	7,6	± 0,02 a	6,57	± 0,03c	F ^P _{2;42} =280,336 ^{0,0001}
V	9,82	± 0,03 a	10,28	± 0,11 a	8,77	± 0,12 c	F ^P _{2;42} =585,734 ^{0,0001}
VI	11,45	± 0,03 b	11,70	± 0,05 a	10,74	± 0,05 c	F ^P _{2;42} =119,999 ^{0,0001}
VII	14,11	± 0,06 a	13,86	± 0,03 b	12,14	± 0,04 c	F ^P _{2;37} =529,947 ^{0,0001}
VIII	15,48	± 0,02 a	13,86	± 0,03 b	12,14	± 0,05 c	F ^P _{2;34} =1601,278 ^{0,0001}
IX	16,13	± 0,03 b	17,14	± 0,03 a	14,67	± 0,05 c	F ^P _{2;32} =894,980 ^{0,0001}
X*	17,89	± 0,08 a	-----		16,82	± 0,03 b	F ^P _{1;20} =86,101 ^{0,0001}

Médias seguidas pela mesma letra na linha não difere significativamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias comparadas pelo teste F da análise de variância (duas médias).

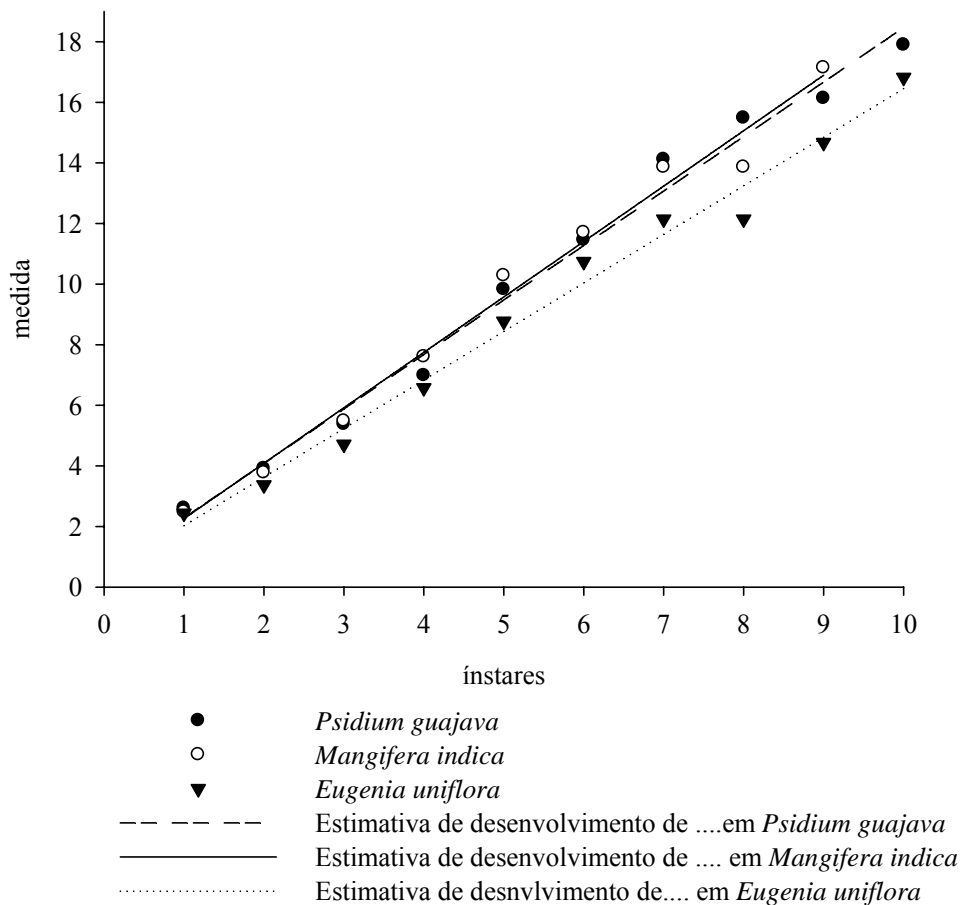


Figura 1 – Análise do tamanho das ninfas de *Phibalosoma phyllinum* alimentados com diferentes substratos.

Quinze ninfas de *Phibalosoma phyllinum* foram utilizadas por cada gaiola ocorrendo T1 a morte de um espécime durante o nono instar. No T2 morreram cinco ninfas sendo duas no sexto instar, uma no sétimo e no oitavo mais duas ninfas. No terceiro tratamento morreram três ninfas no sexto instar, duas no sétimo, e três no nono (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência (%) por cada ínstar das ninfas de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmatodea) com diferentes dietas. T1- folhas de goiabeira, T2- folhas de mangueira e T3- folhas de pitangueira.

Dieta	1° ínstar	2° ínstar	3° ínstar	4° ínstar	5° ínstar	6° ínstar	7° ínstar	8° ínstar	9° ínstar	10° ínstar
T1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93,3
T2	100	100	100	100	100	100	86,6	80	66,6	0
T3	100	100	100	100	100	100	80	66,6	66,6	46,6

O mimetismo (Figura 2A) é a principal estratégia de defesa de *P. phyllinum* quando o animal se confunde com os galhos onde se encontram. Quando ameaçado, balança o corpo, com movimento semelhante dos galhos. Eles se camuflam por coloração críptica, e que sua coloração pode alterar de acordo com o ambiente onde se encontra, como outra forma de defesa. Esse mimetismo foi observado, principalmente, em fêmeas que mudavam sua cor, no período máximo de 24 horas.

Fêmeas de *P. phyllinum*, ficavam em média, até duas horas completamente imóveis, com as pernas dianteiras projetadas para frente do corpo, cobrindo a cabeça e antenas, e as outras distendidas para trás. Ao elevarem o corpo sobre as pernas, podem fazer movimentos, ou assumir posição, que podem torná-las miméticas ao meio em que se acham. A autotomia foi outro comportamento realizado com frequência, que consiste na amputação de membros como pernas e antenas, para escapar de uma situação de alto risco. *Phibalosoma phyllinum* apresenta tanatose quando em perigo.

O dimorfismo sexual de *P. phyllinum* é expresso pela ausência de asas nas fêmeas (apteria) e, na maioria das vezes maiores que os machos, medindo $19,0 \pm 0,2$ cm de comprimento e 0,11 cm de largura e os machos com $12,1 \pm 0,3$ cm de comprimento e 0,5 cm de largura, porém machos são mais ágeis que as fêmeas (Figura 2B, C).



Figura 2 – Mimetismo - A - estratégia de defesa, bicho-pau *Phibalosoma phyllinum* entre os galhos de goiaba (*Psidium guajava*). Dimorfismo sexual de *P. phyllinum* - (B) - detalhe do macho com asas. C - fêmea maior e áptera.

A cópula em *P. phyllinum* durou em média 12 horas, chegando até 48 horas. Neste período, o macho permaneceu no dorso da fêmea e ambos não se alimentaram (Figura 3A) fêmeas de *P. phyllinum* apresentam posturas sem fecundação e nenhuma alteração comportamental com a ausência dos machos. A ovoposição foi iniciada aos seis meses de vida. A partenogênese não foi comprovada, pois as ninfas não eclodiram. A capacidade de ovoposição desta espécie foi de, aproximadamente, dois a três ovos por dia, em cinco meses, totalizando aproximadamente 300 ovos, a eclosão das ninfas de *P. phyllinum* ocorreu após 100 a 150 dias, sendo que a ovoposição se inicia 20 dias após a cópula.

Ovos de *P. phyllinum* apresentam cor marrom e opérculo preto na parte superior, e aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura 3B).

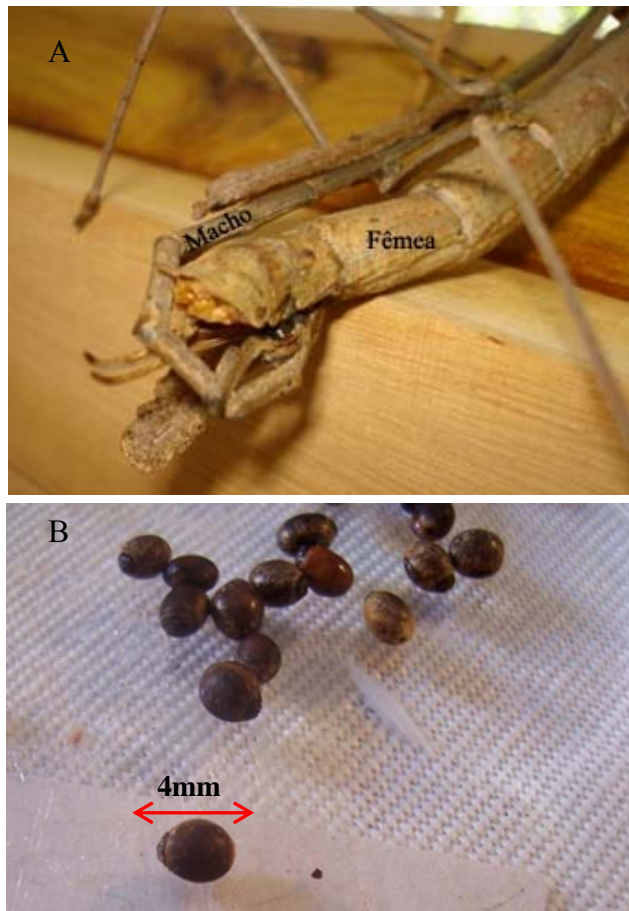


Figura 3 – Momento da cópula de *P. Phyllinum* (A), detalhe: o macho permanece no dorso da fêmea. (B) Ovos de *P. phyllinum*.

Na eclosão, a ninfa começa a se movimentar e a região mais escura, o opérculo, se rompe, quando o inseto jovem sai e momentos após o nascimento, seu tamanho é quase o dobro do ovo. As ninfas de *P. phyllinum* levaram aproximadamente 10 a 15 minutos para eclodirem, tempo que levaram para remover o opérculo e apresentam forma semelhante à do adulto no nascimento, denominado paurometabolia.

As ecdises se iniciam pelos membros posteriores, depois os anteriores e, por último a cabeça é liberada com as antenas. A ecdise dura de 15 a 30 minutos. Neste período, os animais ficam mais vulneráveis, podem perder membros e morrer. Algumas vezes, no final da muda, o inseto se alimenta da exúvia que libera (Figura 4).



Figura 4 – Exúvias de *P. phyllinum* liberadas logo após a ecdise em diferentes instares.

Ninfas de *P. phyllinum* alimentadas com folhas de goiabeira apresentaram duração média de 15 ± 2 dias por instar, exceto o décimo, com duração média de 35 ± 4 dias . Nos demais tratamentos os instares não apresentaram um padrão de duração não sendo possível verificar o porquê desta oscilação entre as mudas, porém o último instar foi sempre o mais longo .

Ninfas de *P. phyllinum* são mais escuras, no primeiro e segundo instares, tendo as inserções das pernas verde claro, e tornam-se mais claras da terceira em diante. Mudam de cor com o tempo e ambiente em que vivem. São ágeis e se alimentam o tempo todo, tornando-se mais lentas a partir das ecdises, são sensíveis como os adultos à temperatura muito alta.

4.2 Morfologia

O trato digestivo de *P. phillynum* apresenta-se como um tubo alongado pouco diferenciado anatomicamente da boca ao ânus (Figura 5A). O esôfago percorre todo o tórax até o início do abdômen, sendo este mais fino que as demais regiões do intestino. Após o esôfago, inicia-se o papo apresentando-se, bastante, alongado e, quando cheio, tem o mesmo diâmetro do restante do intestino. A transição do papo para o intestino médio é marcada por uma pequena constrição (Figura 5B).

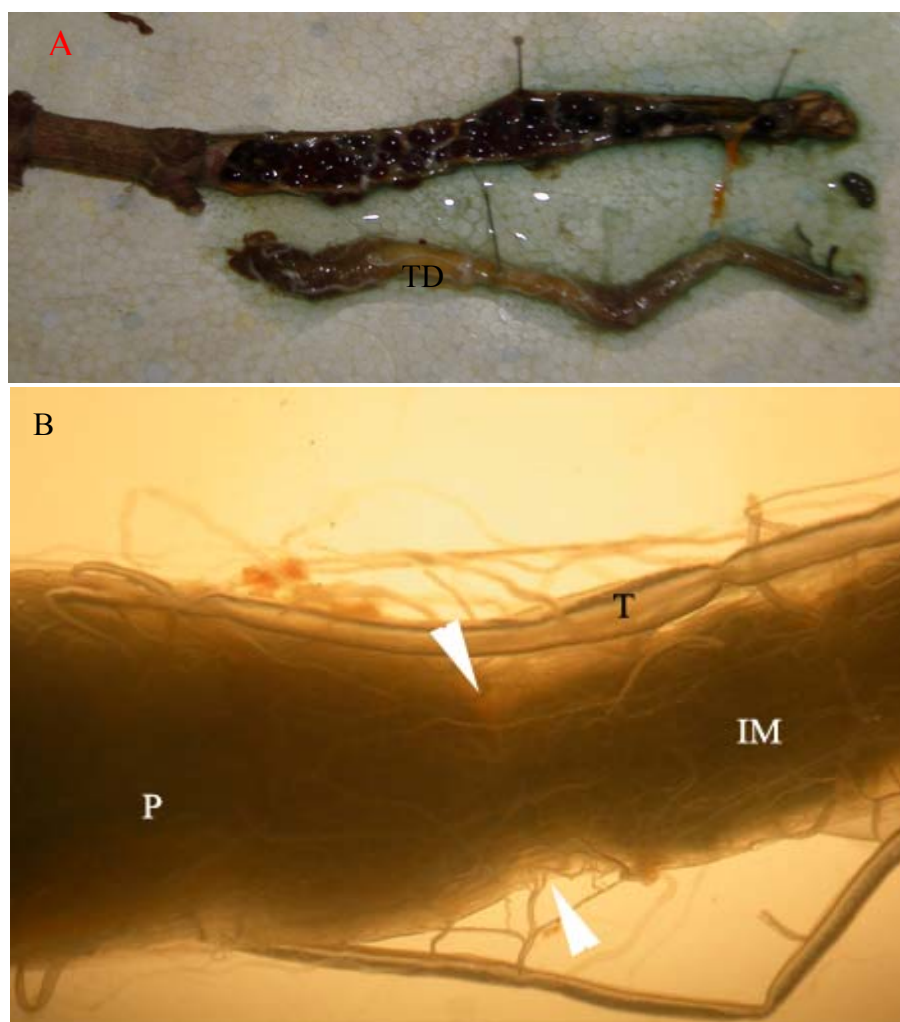


Figura 5 - O trato digestivo (TD) de *P. phillynum* apresenta-se como um tubo alongado pouco diferenciado anatomicamente desde a boca até o ânus (A). Foto (B) do trato digestivo de *P. phyllinum* mostrando a transição do papo (P) para o intestino médio (IM) marcada por uma pequena constrição (ponta de seta). T - traquéias.

A metade anterior do intestino médio apresenta a parede pregueada, enquanto a metade posterior não apresenta tais pregas. A passagem do intestino médio para o posterior caracteriza-se pela presença de grande número de túbulos de Malpighi (Figura 6). De forma semelhante, o intestino posterior (íleo) se mostra como um tubo alongado com diâmetro constante e pequena constrição marcando a transição do íleo para o reto, sendo este último alongado.



Figura 6 - Trato digestivo de *P. phyllinum* mostrando a transição do intestino médio (IM) para o intestino fino (IF) caracterizada por inúmeros túbulos de Malpighi (TM).

Externamente, o trato digestivo apresenta uma rede de traquéias, bem como uma musculatura longitudinal bem desenvolvida (Figura 7).

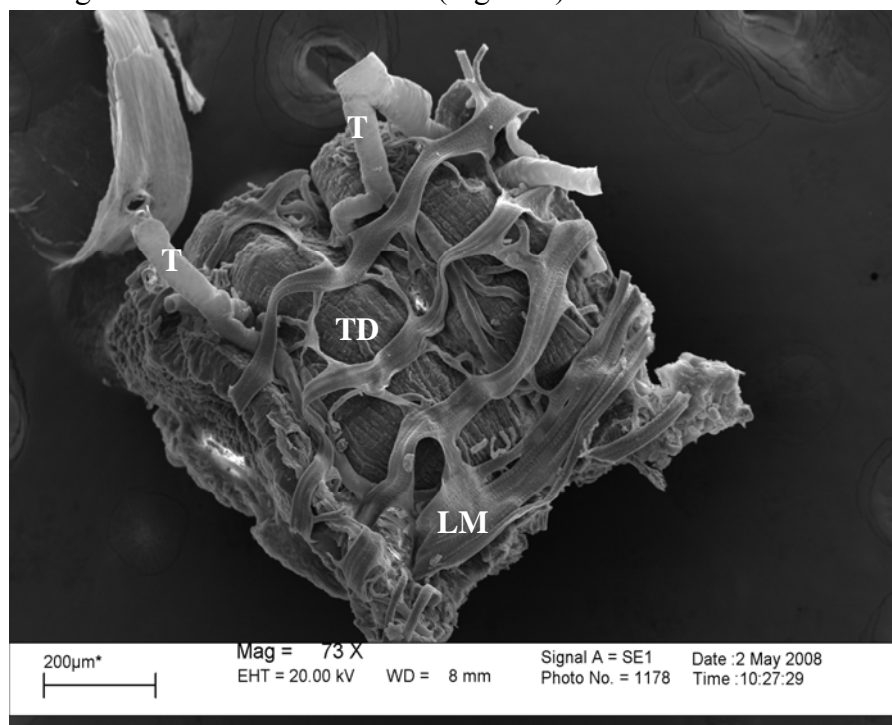


Figura 7 – Micrografia eletrônica de varredura de *P. phyllinum* mostrando a musculatura longitudinal (LM) bem desenvolvida envolvendo o tubo digestivo (TD). T – traquéias.

Há três tipos celulares no intestino médio de *P. phyllinum*: células com aparente função endócrina, localizadas na base do epitélio, células indiferenciadas agrupadas em ninhos, também na base do epitélio, e células colunares. Estas últimas apresentam o núcleo mais ou menos central, bem desenvolvido, esférico e com grumos de cromatina condensada e nucléolo evidente. O ápice das células colunares se mostra dilatado preenchido com um conteúdo pouco acidófilo e estas dilatações formam borbulhas que parecem se desprender das células sendo liberadas para o lúmen. Tais borbulhas têm uma superfície enrugada e quando não estão presentes as microvilosidades de aproximadamente 4 µm de comprimento, são visíveis (Figuras 8, 9). É comum observar células em processo de degeneração caracterizadas por núcleos fragmentados e picnóticos.

Na base do epitélio há ninhos com células regenerativas espalhadas ao longo de todo intestino médio. O intestino médio apresenta ainda uma membrana peritrófica bem desenvolvida e basalmente existe uma camada de células musculares circulares internas e longitudinais externas. A parede do intestino médio apresenta profundos vilos (Figura 10).

O intestino fino apresenta uma parede com dobras do epitélio formado por uma camada única de células, sendo essas cúbicas e com núcleo esférico (Figura 10). O ápice celular do intestino fino apresenta uma cutícula bem evidente, existindo ainda neste órgão uma camada de músculos internos circulares e externos longitudinais.

O reto de *P. phyllinum* é composto por epitélio simples, com células achatadas e núcleo alongado, apresentando uma luz que é envolvida por uma cutícula evidente e uma musculatura mais desenvolvida com fibras longitudinais e circulares. As papilas retais se mostram alongadas e caracterizadas por apresentarem uma camada de células colunares, com núcleos esféricos, com a porção apical das células pouco acidófilas, assentadas sobre camadas de células achatadas não havendo um lúmen entre essas camadas. Tanto as células do reto como as das papilas retais são superficialmente revestidas por uma cutícula (Figura 12).

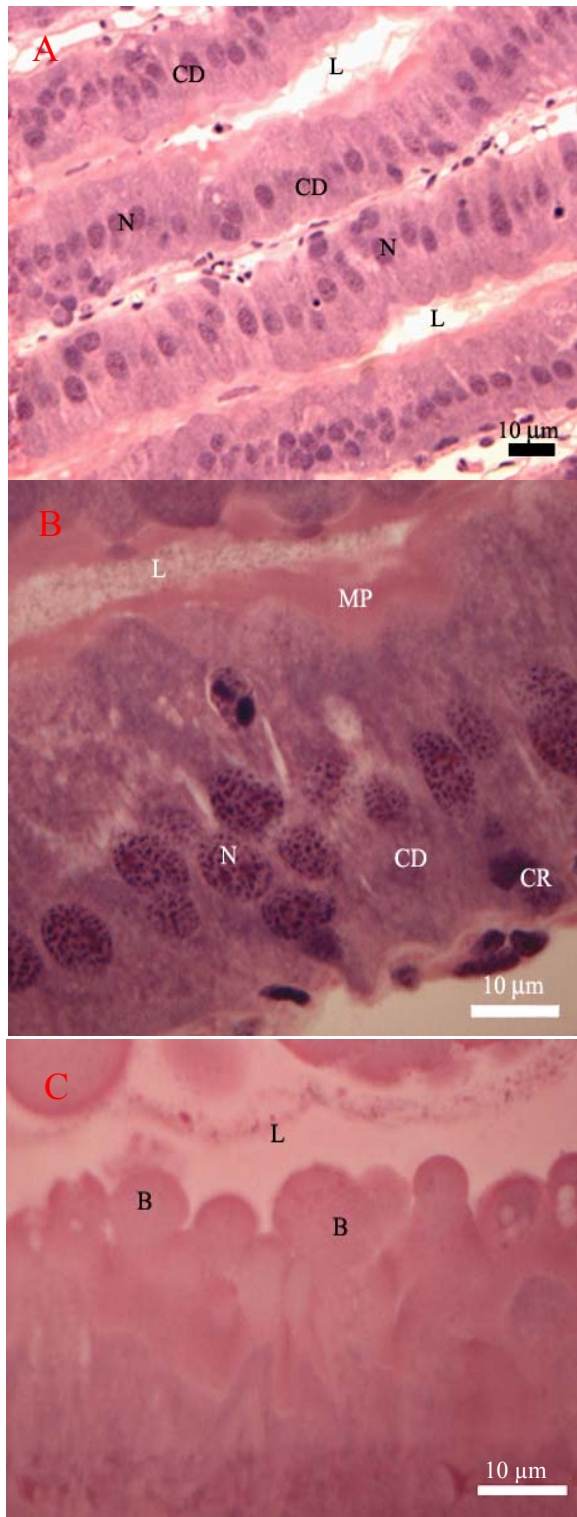


Figura 8 – Secção longitudinal do intestino médio de *P. phyllinum*. A- mostrando células digestivas (CD) com núcleo central (N). B - Ninhos com células regenerativas (CR) espalhadas ao longo de todo o intestino médio. L – lúmen, MP - membrana peritrófica. C- Ápice das células digestivas dilatado formando borbulhas (B) em fase de liberação aparente no lúmen do intestino.

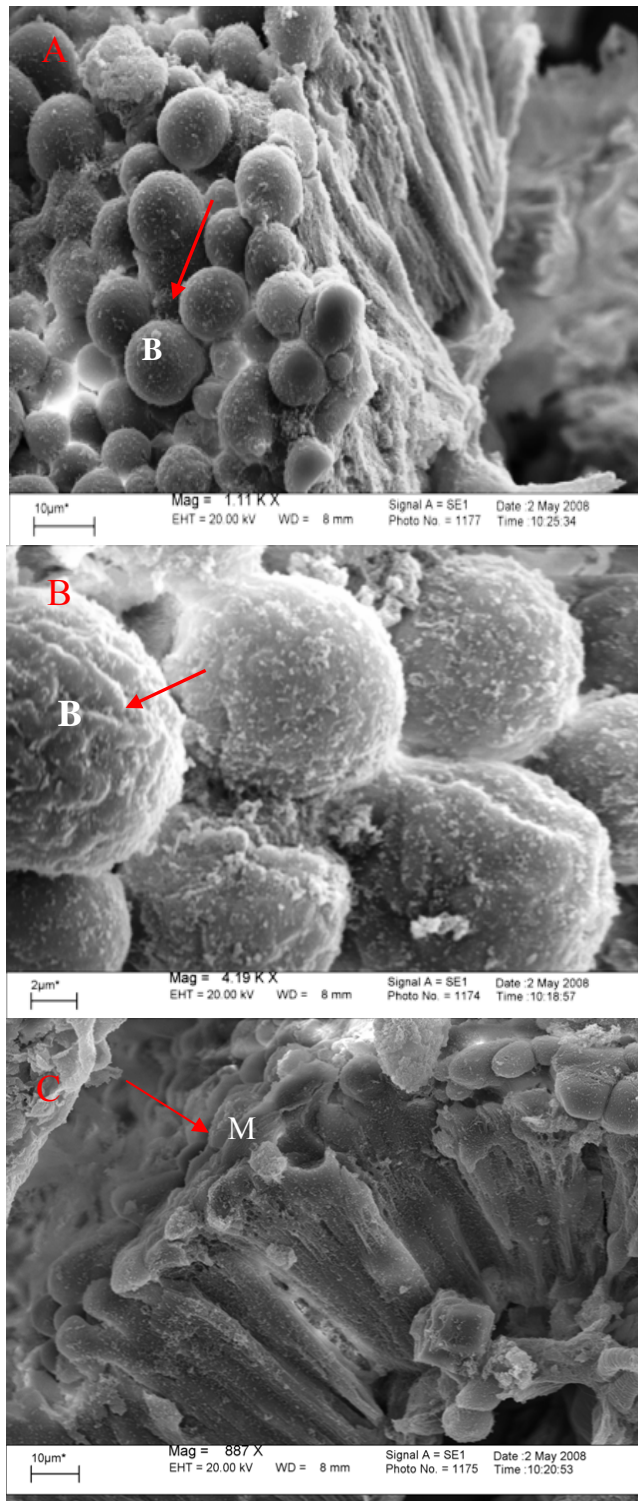


Figura 9 – Micrografia eletrônica de varredura do intestino médio de *P. phyllinum*. A- mostrando células digestivas com borbulhas na superfície apical. B – Detalhe de superfície enrugada (seta) das borbulhas. C – Ápice celular com microvilosidades (M).

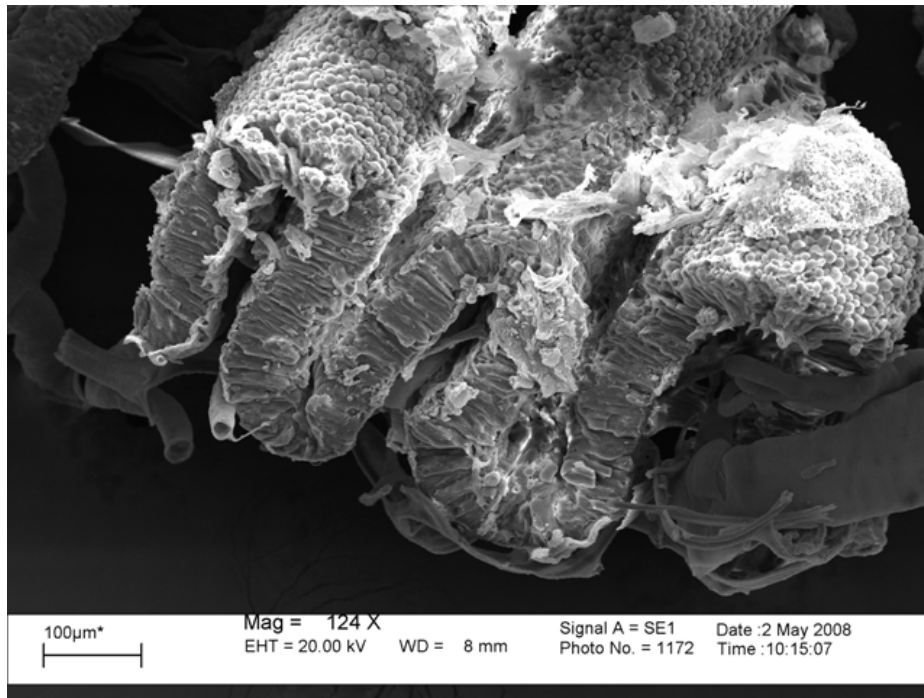


Figura 10- Micrografia eletrônica de varredura de *P. phyllinum* mostrando a parede com profundos vilos no intestino médio.

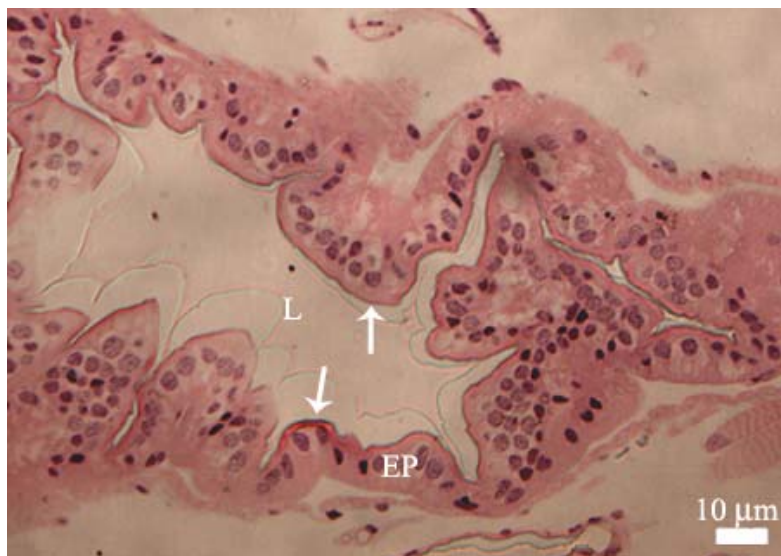


Figura 11- Secção longitudinal do intestino fino de *P. phyllinum* mostrando a parede com dobras do epitêlio (EP), formado por uma camada única de células, apresentando uma cutícula (seta).

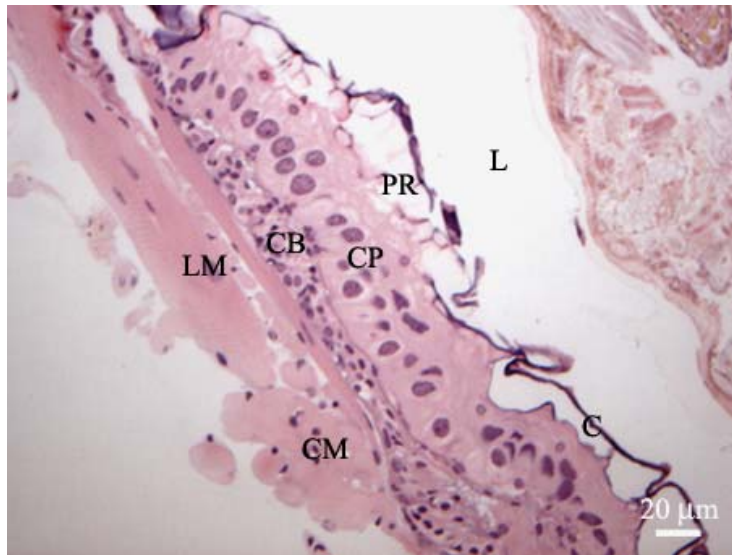


Figura 12 – Secção longitudinal do reto de *P. phyllinum* mostrando uma papila retal (PR) formada por duas camadas de células basais (CB) e por células principais colunares. C – cutícula, CM – músculo circular, LM – músculo longitudinal.

As fêmeas desta espécie possuem um par de ovários que percorrem todo o abdômen e estes são pectinados, sendo que os ovários estão colocados lateralmente percorrendo todo o oviduto lateral e são caracterizados por folículos contendo ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo que os mais maduros encontram-se mais próximos à inserção do oviduto (Figuras 13, 14A, B). Este apresenta uma parede bastante pregueada (Figura 14C), o epitélio é colunar e as células apresentam o ápice dilatado com muitos vacúolos. Externamente, o oviduto apresenta musculatura desenvolvida e, internamente, uma cutícula esclerosada e espessa.

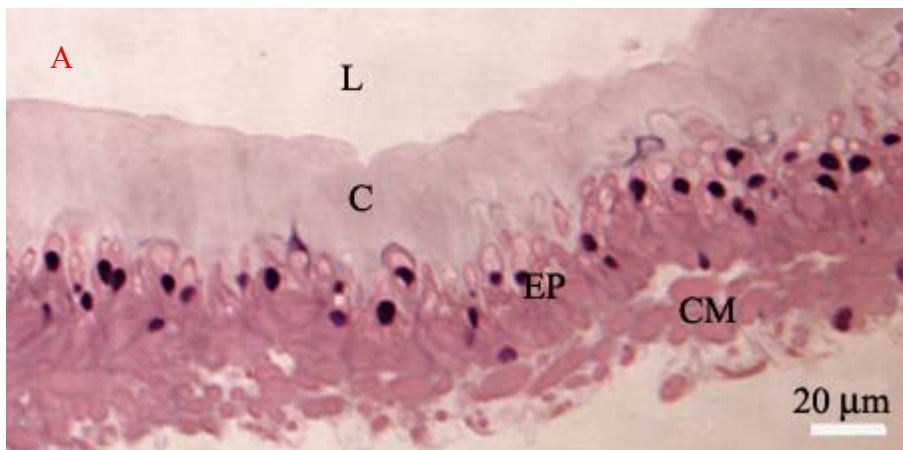


Figura 13 – Aparelho reprodutor feminino de *P. phyllinum*. Secção transversal do oviduto lateral mostrando o lúmen (L) revestido por cutícula espessa (C). CM - músculo circular, EP – epitélio.

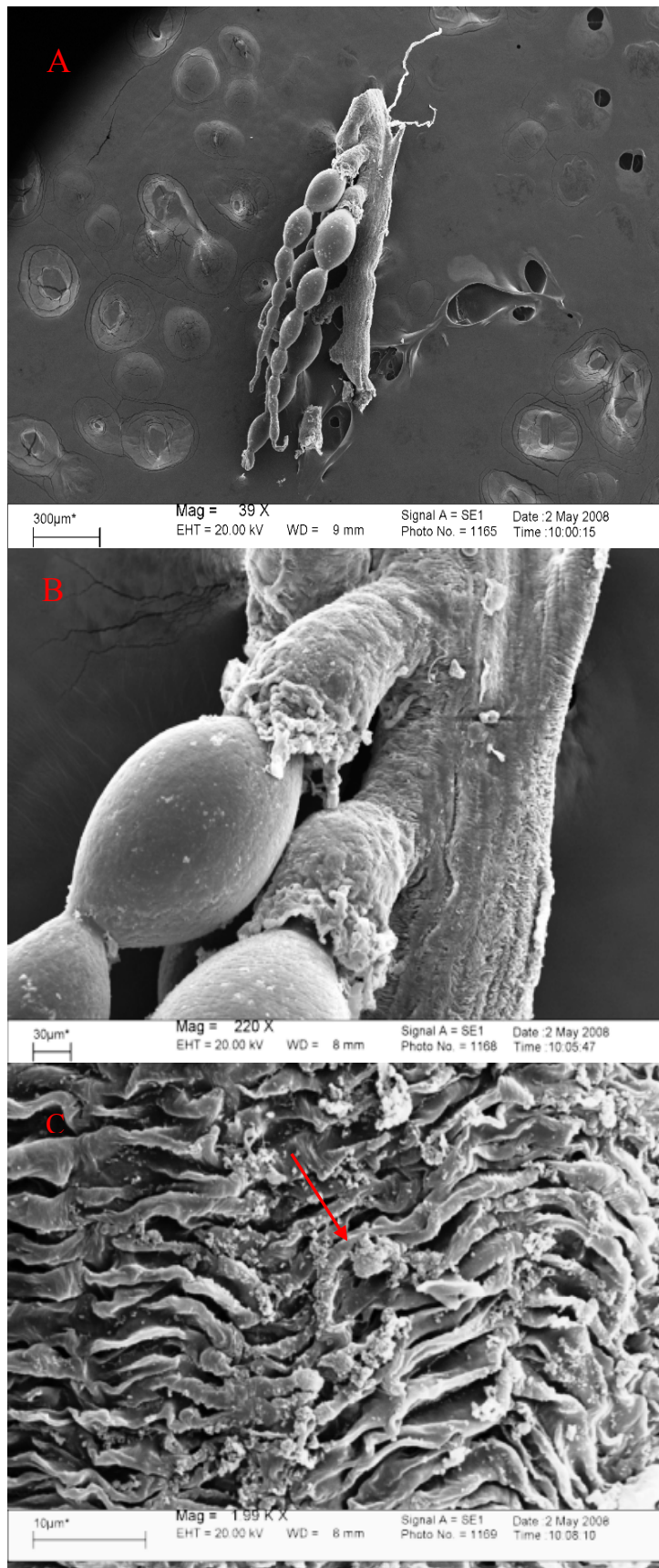


Figura 14 – Micrografia eletrônica de varredura do aparelho reprodutor feminino de *P. phyllinum*. A, B – Ovário mostrando ovaríolos pectinados contendo folículos em diferentes fases do desenvolvimento. C - Oviduto lateral mostrando a parede pregueada.

Os ovários de *P. phyllinum* são do tipo panoístico, ou seja, sem células nutridoras, sendo cada ovariolo revestido por uma bainha peritonial bastante espessa. Cada folículo ovariano de *P. phyllinum* é formado por uma camada de células foliculares delimitando os ovócitos em desenvolvimento. As células foliculares são colunares e nos folículos mais jovens os núcleos são desenvolvidos ocupando quase toda a totalidade da célula. Alguns desses núcleos são irregulares e à medida que as células foliculares se desenvolvem, elas se tornam cúbicas e nos ovócitos maduros apresentam-se achatadas.

Uma glândula acessória foi encontrada associada ao sistema reprodutor abrindo no oviduto comum. Essa glândula é bastante longa e formada por epitélio simples de células cúbicas, apresentando um lúmen estreito, núcleos esféricos com cromatina condensada e citoplasma vacuolizado (Figura 15). Os testes histoquímicos mostraram que a glândula é rica em material PAS positivo, provavelmente carboidratos, proteínas e algum conteúdo lipídico.

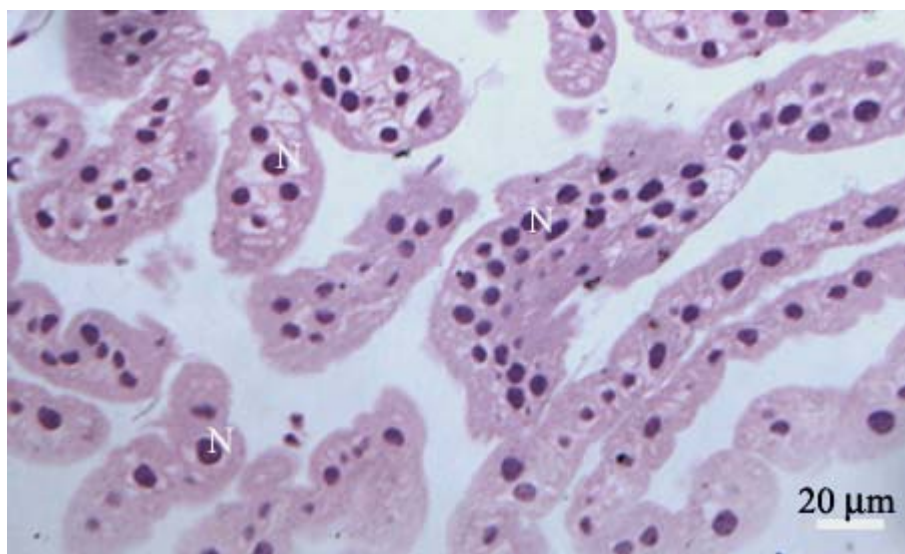


Figura 15 - Secção histológica da glândula acessória do sistema reprodutor feminino de *P. phyllinum* formada por epitélio simples de células cúbicas com citoplasma vacuolizado e núcleo com predomínio de cromatina condensada (N).

5. DISCUSSÃO

As durações médias do período ninfal de *P. phyllinum*, variaram entre nove e dez instares, dependendo do tipo de alimento ofertado, o que aproxima de *Bacteria tuberculata*, onde o período ninfal de fêmeas variou entre oito e nove instares (Dorval, 2003). A ocorrência de variações nas quantidades de instares por sexo, entre espécies de fasmídeos parece ser bastante comum, pois, em *B. granullicolis* ocorrem de quatro a seis instares (Zapata e Torres, 1970) e em *P. wilkinsoni*, sete e oito, para machos e fêmeas, respectivamente (Campbell, 1966).

Folhas de goiabeiras foram preferidas e as mais indicadas para a alimentação de *P. phyllinum*, já que apresentaram maior desenvolvimento corpóreo quando alimentadas com está espécie de planta, mas na ausência desta os insetos se alimentam também de folhas de mangueira e pitangueira, folhas de goiabeira também foram às preferidas por *P. phyllinum* no trabalho realizado por Ferreira (2007), que encontrou mortalidade de 100% dos machos de *Phibalosoma phyllinum*, ao se alimentarem somente com folhas de eucalipto, sendo necessária a inserção de folhas de goiabeiras, assim como ocorreu também no presente estudo.

As estratégias de defesa de *P. phyllinum* foram semelhantes àquelas relatadas para *Bacteria tuberculata* (Phasmatodea) (Costa-Lima 1938; Dorval 2003). Registros de tanatose foram observados em algumas espécies de Phasmatodea por Piéron (1913) e Schmidt (1913) e diagnosticado também em *Phibalosoma phyllinum*.

O dimorfismo sexual de *P. phyllinum* se deu através da presença de asas nos machos e ausência nas fêmeas e também pela diferença de tamanho entre esses insetos onde a fêmea se apresenta maior que o macho. Comparado com o estudo de Dorval, 2003, onde nos adultos de *B. tuberculata*, o dimorfismo sexual é bastante acentuado: as fêmeas são ápteras com o comprimento e diâmetro do corpo bem desenvolvidos, e nos machos, com dois pares de asas, apropriados para vôos curtos. Pode-se afirmar que o dimorfismo nestas duas espécies se apresenta de forma semelhante. O dimorfismo sexual é bastante variado nas espécies deste grupo de inseto, sendo encontrados desde indivíduos ápteros até alados (Clark, 1974; Bedford, 1978).

Embora possa ocorrer reprodução partenogenética em Phasmatodea (Costa Lima, 1938), fêmeas virgens de *P. phyllinum* realizaram a postura de ovos, porém estes não foram

viáveis. Partenogênese tem sido registrada em muitas ordens de insetos como meio normal de reprodução, exceto em Odonata, Dermaptera, Neuroptera, Siphonaptera (Chapman, 1998, Silvia Pinent, 1998). Costa-Lima, (1938) relata: "A aptidão dos Phasmidae para a reprodução partenogenética," de fato, em várias espécies, cujos machos são excessivamente raros, a reprodução agâmica ocorre freqüentemente e dos ovos partenogenéticos (Costa-Lima, 1938) originando fêmeas, fenômeno conhecido com telitoquia. Kuyten (1962) também observou o ciclo biológico e a ocorrência de partenogênese em *Orxines macklotti*, Phasmatodea, (Zapata & Torres, 1970).

A cópula de *P. phyllinum* foi observada com duração de 12 a 48 horas, comparada com a de *B. granullicolis* que pode durar de oito a 18 horas (Zapata & Torres, 1970), podendo afirmar que a cópula nos Phasmidae pode durar mais do que na espécie estudada por Zapata & Torres, 1970.

Carausius morosus em 225 dias, pôs em média, 480 ovos, tendo também, observado um máximo de 712 ovos (Roth, 1916), em *P. phyllinum* foi observado a postura de 300 ovos, em 150 dias.

Em *P. phyllinum*, a postura dos ovos se inicia com, aproximadamente, 20 dias da cópula com os ovos sendo liberados pela fêmea sem qualquer cuidado de segurança. As fêmeas, em geral, não escolhem um lugar especial para a postura e como se acham quase sempre pousadas sobre as plantas deixam cair os ovos no solo e não apresentam nenhum cuidado parental. A eclosão dos ovos de *P. phyllinum* demora de 100 a 150 dias. O período embrionário de *Bacteria tuberculata* foi de $107,38 \pm 1,43$ dias para ovos de fêmeas copuladas (Dorval, 2003), diferindo dos valores para *B. granullicolis*, cujo período foi de aproximadamente 90 dias (Zapata & Torres, 1970). Algumas espécies apresentam ovos fertilizados com período de incubação de 60 a 80 dias e os não fertilizados, de 85 a 110 dias, podendo chegar a 280 dias, porém, na maioria dos ovos, o período de incubação foi de 85 a 110 dias (Bedford, 1978).

Os ovos dos Phasmidae podem apresentar variações nas formas, cores e tamanhos e isso serve de parâmetro para a identificação das espécies (Clark, 1976). Os ovos de *P. phyllinum* apresentam cor marrom e opérculo preto na parte superior, diferentemente dos ovos de *B. tuberculata* que apresentam que forma de barril, semelhantes às sementes, com coloração variando do marrom ao preto e tendo a parte superior fechada por um opérculo ovóide (Dorval, 2003).

Ovos de *P. phyllinum* têm tamanho semelhante aqueles de, *B. tuberculata* ($4,56 \pm 0,18$ mm) (Dorval, 2003), porém são maiores que os ovos de *B. granullicolis* (2,5 mm) (Zapata e Torres 1970).

Ao saírem dos ovos, as ninfas de *P. phyllinum*, rapidamente se distendem e apresentam um tamanho surpreendente em relação ao do ovo onde apresentam 2,4 cm de comprimento, semelhante ao observado para *Autolyca* sp. cujos jovens, logo após o nascimento, apresentam 11 mm de comprimento, isto é, cerca de quatro vezes o diâmetro do ovo (Goudot (1843) *apud* Costa-Lima, 1938).

As ninfas de *P. phyllinum* levaram aproximadamente de 10 a 15 minutos para eclodirem, tempo que levaram para remover o opérculo, diferindo muito no tempo gasto pelas ninfas de *B. tuberculata* levaram de dois a quatro minutos para eclodirem (Dorval, 2003). O tempo gasto nessa fase é bastante variado entre os fasmídeos, segundo Korboot (1961), pode atingir quatro minutos e meio em *Exatosoma tiaratum* (Phasmatodea).

Nos primeiros estádios, as ninfas são ágeis e se movimentam todo o tempo, apresentam coloração escura e as inserções das pernas verde claro a partir do terceiro estádio as ninfas vão alterando a cor para um marrom claro, ou mudam de cor de acordo com o ambiente em que se encontram, diferindo-se das ninfas de *B. granullicolis* que são lentas e apresentam coloração verde amarelada de aspecto cristalino, que vai mudando até a fase adulta (Zapata & Torres 1970).

O período crítico para a sobrevivência das ninfas de *P. phyllinum*, é o momento da ecdise, quando muitas ficam presas na exúvia, pelas antenas ou pernas, impedindo-as de se deslocarem até o alimento, e por diversas vezes ao nascer as ninfas ficam com as pernas presas dentro dos ovos impedindo assim o seu desenvolvimento e muitas vezes, levando-as a morte. O mesmo foi observado para ninfas de *B. granullicolis* por Zapata & Torres (1970).

A análise da anatomia interna das fêmeas de *P. phyllinum* constatou que o canal alimentar é diferenciado em três regiões principais com diferente origem embriológica: o intestino anterior ou estomodeu, o intestino médio ou mesentério e o intestino posterior ou proctodeu observado por Uvarov (1966) e Borrer & Delong (1969).

O sistema digestivo de *P. phyllinum* é relativamente regular, com dilatações pelo corpo, abdômen e reto. Estes insetos apresentaram o intestino com formato tubular, que percorre desde a boca até o final do abdômen como na maioria dos insetos em geral

(Chapman, 1998). O papo inicia-se após o esôfago apresentando-se bastante alongado e, quando cheio, tem o mesmo diâmetro do restante do intestino. A transição do papo para o intestino médio apresenta pequena constrição, o inglúvio (Borror & DeLong, 1969; Gallo *et al.*, 1988; Gallo *et al.*, 2002).

De uma maneira geral, nos insetos o epitélio do intestino médio é formado por três tipos celulares: as células digestivas ou principais, as células regenerativas e as células endócrinas (Cruz-Landim *et al.*, 1996; Neves *et al.*, 2003). O intestino médio de Phasmidae também é formado por três tipos celulares diferentes formando um epitélio simples. Na base das células há pequenos ninhos com células reduzidas regenerativas espalhadas ao longo de todo intestino. Observou-se que entre as células digestivas, na maioria dos insetos mostram-se pequenas células regenerativas que podem se apresentar isoladas, em pares ou formando pequenos agrupamentos denominados ninhos celulares, fundamentais para a renovação do epitélio digestivo (Billingsley *et al.*, 1996).

A passagem do intestino médio para o posterior caracteriza-se por inúmeros túbulos de Malpighi, os quais são principais órgãos excretores dos insetos, cuja função é homeostática, através da eliminação do excesso de sais e produtos nitrogenados, segregação de substâncias presentes na hemolinfa e reabsorção de constituintes úteis. De forma semelhante o intestino posterior (íleo) se mostra como um tubo alongado com diâmetro constante e pequena constrição marcando a transição do íleo para o reto, sendo este alongado. O intestino posterior - subdividido em piloro, íleo, reto e ânus - é separado do intestino médio pela válvula pilórica, e, também, é recoberto internamente pela íntima (Chapman, 1998). Entretanto, sua cutícula é menos espessa e mais permeável que a do intestino anterior. Algum tipo de absorção de nutrientes e de água pode ocorrer nesta região, o que não é verificado no intestino anterior (Chapman, 1998). O piloro é a região de transição entre o intestino médio e posterior e, na maioria das vezes, é o local onde desembocam os túbulos de Malpighi.

O reto é composto por epitélio simples, com células mais achatadas, núcleo alongado, apresentando uma luz que é envolvida por uma cutícula evidente e uma musculatura mais desenvolvida com fibras longitudinais e circulares. O reto é, geralmente, dilatado com uma parede fina e papilas retais envolvidas na reabsorção de água, íons e, algumas vezes, aminoácidos (Chapman, 1998).

Fêmeas de *P. phyllinum* possuem um par de ovários que percorrem todo o abdômen e com ovariolos são do tipo panoístico com núcleos pequenos com cromatina condensada. O aparelho reprodutor de Orthoptera também apresenta um par de ovários, constituídos por um número variável de ovariolos do tipo panoístico, ou seja, desprovidos de células nutridoras dos ovócitos. Ovários panoísticos também são encontrados nas ordens de Apterygota, Orthoptera, Odonata e Siphonaptera (Bunning, 2004).

6. Conclusão

A preferência das ninfas de *Phibalosoma phyllinum* foi pela folha de goiaba (*Psidium guajava*), alimentando-se somente desta, mesmo tendo ofertas de outras espécies. E todas as ninfas alimentadas com esta folha, apresentaram maior desenvolvimento corpóreo e maior índice de sobrevivência.

Não foi comprovada a reprodução partenogenética em *P. phyllinum*, uma vez que os ovos vindos desta forma de reprodução não eclodiram.

Nesta espécie o número de instares variou entre nove e oito, dependendo da alimentação oferecida.

A morfologia interna de *P. phyllinum* é semelhante à de outros Orthopteroidea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anjos, N., Santos, G.P., Zanuncio, J.C. 1987. A largata-parda, *Thyrintina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. Belo Horizonte: EPAMIG, Bol. Téc., pp. 25:56.
- Bedford, G.O. 1978. Biology and ecology of the Phasmatodea. *Ann. Rev. Ent.* 23:125-149.
- Bilinski, S.M., Büning, J. & Simiczyjew, B. 1998. Neuropteroidea: different ovary structure in related groups. *Folia Histochem. Cytobiol.* 36: 189-195.
- Billingsley, P.F. & Lehane, M.J. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In Lehane, M.J. and Billingsley, P.F. (ed) *Biology of the insect midgut*, 31-54. Chapman and Hall, London.
- Borror, J.D.; DeLong, D.M. 1969. Introdução ao estudo dos insetos. USAID. Prog. Publ. Did.
- Brock, P.D. 2001. Studies on the Australasian stick-insect genus *Extatosoma* Gray (Phasmida: Phasmatidae: Tropoderinae: Extatosomatini). *J. Orthop. Res.*,10(2): 303-313.
- Buning, J. 2004. *The insect ovary*. Chapman Hall. London.
- Campbell, K.G. 1966. A new technique of aerial spraying for control of phasmatids. *J. Ent. Soc. Austr.*3:36-38.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects: Structure and function*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Clark, J.T. 1976. The eggs of the stick insects: review with descriptions of the eggs of eleven species. *Syst. Ent.*,1:95-105.
- Clark, J.T. 1974. A note on *Acrophylla wülfingi* Redtenbacher with a description of the male. *Zool. J. Linn. Soc.*, 54:253-256.
- Costa Lima, A. D. 1938. *Insetos do Brasil*. Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, 1: 351-378
- Costa, M.K.C.M. Santos F.D. , Ferreira, A.V.S., Teixeira, V.W, Teixeira A.A.C. 2003. Descrição histológica do estomodeu de *Tropidacris Collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). *Arq. Inst. Biol.*70 : 259-263.
- Cruz-Landim, C.; Silva-De-Moraes, R.L.M.; Serrão, J.E. 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae). *J. Comp. Biol.* 1: 209-40.

- Cruz-Landim, C. 1985. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp* 44: 28-41.
- Danks, H.V. 1987. *Insect dormancy: an ecological perspective*. Ottawa: Biological Survey of Canada, 439.
- Dorval, A., Peres Filho, O., Moraes, C. S. P., Berti Filho, E. 2003. Biologia e estudo comportamental de *Bacteria tuberculata* Piza Jr., 1939 (Phasmatodea; Phasmatidae) em folhas de angico (*Piptadenia* spp.) *Scien. Florest.* 63:150-157,
- Faria, F.S.; Kumagaii. A.F.; Fonseca, N.G. 2004. Estudo da biologia do bicho-pau (*Phibalosoma* sp., Phasmatidae) em laboratório. *In: Cong. Bras. Zool. Brasília: SBZ*, 25:181.
- Ferreira, R.B., Auad, A. M., Sálvio, G. M.M., Amaral, R.L., Souza, L.S., Braga, A.L.F. , Oliveira, S.A. 2007. Aspectos biológicos de *Phibalosoma phyllinum* (Gray, 1835) (Phasmatodea: Phasmatidae) alimentados com folhas de goiabeira e eucalipto. *Anais do VIII Cong. Eco. Brasil, 23 a 28 de Set., Caxambu – MG*.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R. A.; Alves, S.B; Vendramin, J.D. 1988. *Manual de Entomologia Agrícola*, São Paulo: Agronômica Ceres,
- Gallo, D., O. Nakano, S.S. Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Batista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes e C. Omoto. 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920.
- Jaglarz, M.K. 1998. The number that counts. Phylogenetic implications of the number of nurse cells in ovarian follicles. *Folia Histochem. Cytobiol.* 36: 167-178.
- Korboot, K. 1961. Observations on life histories of *Acrophylla tessellata* Gray and *Extatosoma tiaratum* Macleay. Paper University of Queensland, Department of Entomology, 1:161-169.
- Kubrakiewicz, J., Jedrzejowska, I. & Bilinsk, S.M.. 1998. Neuropteroidea: different ovary structure in related groups. *Folia Histochem. Cytobiol.* 36:179-187.
- Kuyten, P. Duration of life, egg number and parthenogenesis in the Stick-nsect *Orxines macklotti* de Haan. *Nature*, v.195, p.1124-1125, 1962.
- Lalitha, T.G., Shyamasundari, K. & Rao, K.H. 1997. Morphology and histology of the female reproductive system of *Abedus ovatus* Stall (Belostomatidae: Hemiptera: Insecta). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92:129-135.

- Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2003. Effects of diet on development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera, Pentatomidae) a predator of the cotton leafworm. J. Appl. Ent. 127:389-395.
- Martins, G.F., Serrão, J.E. 2002. A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera; Apoidea). Sociobiology 40:711-720.
- Martins, G.F., Serrão, J.E. 2004. A comparative study of the ovaries in some brazilian bees (Hymenoptera, Apoidea). Pap. Avul. Zool. 44:45-53.
- Mansingh, A. 1971. Physiological classification of dormancies in insects. Can. Ent., 103:983-1009.
- Matsuda, R. 1976. Morphology and evolution of the insect abdômen. New York: Pergamon Press, 534.
- Neves, C.A., Serrão, J.E & Gitirana, L.B. 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. Sociobiology 41:443-459.
- Oliveira, A.C., Fonseca, E.P.; Anjos, N. Santos, G.P.; Zanuncio, J.C. 1984. Resistência interespecífica de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) à lagarta desfolhadora *Thyriniteina arnobia* Stoll, 1972 (Lepidoptera, Geometridae). Rev. Árv. 8: 91-113.
- Osse, L., Briquelot, A. 1970. Ocorrência de insetos em eucaliptais da Cia. Siderúrgica Belgo-Mineira e combate experimental por diversos meios. Rio de Janeiro. Bras. Flor.1:21-24.
- Pearse, A. 1953. Histochemistry. Theoretical and Applied. Churchil Ltd. London.
- Pieron, H. 1913 . A propos de la catelepsie des Phasmides. Soc. Biol. 65: 1079-1081.
- Roth, H.L. 1916. Observations on the growth and habits of the stick insect, *Carausius morosus* Br., intended as a contribution towards a knowledge of variation in organism which reproduces itself by parthenogenetic imethod. Trans. Ent. Soc. Lond. 345-386.
- Saavedra, J.L.D.Z.,J.C.; Vilela, E.F.; Sediyaama C.S.; De Clercq, P. 1995. Development of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera, Pentatomidae) on meat-based artificial diets. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 60:683-688.
- Santos, F.D., Veiga, A.F.S.L., Alves, L.C., Wanderley, V., Teixeira, A.A.C. 2006. Aspectos histológicos do aparelho reprodutor feminino e morfometria dos ovários de *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae) submetido a três fotoperíodos. Arq. Inst. Biol.73: 343-348.

- Santos, F.D., Veiga, A.F.S.L., Alves, L.C., Wanderley, V., Teixeira, A.A.C. 2006. Avaliação histomorfométrica do aparelho reprodutor feminino de *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae) submetido a três fotoperíodos. Recife. Univ. Fed. Rur. Pernambuco. Dis. Mest, P. 54.
- Saunders, D.S. 1976. Seasonal cycles of development. In: Insect Clocks. New York: Pergamon Press, 73-83.
- Schmidt, P.J. 1913 - La Catalepsie des Phasmides. C. R. Soe. Biol. 65:705-707.
- Serrão, J.E. 2007. Proventricular structure in the bee tribe Augochlorini (Hymenoptera: Halictidae). Org. Div. Evol. 7:175-180.
- Serrão, J.E. 2005. Proventricular structure in solitary bees (Hymenoptera, Apoidea). Org. Div. Evol. 5:125-133.
- Serrão, J.E. 2001. A comparative study of the proventricular structure in corbiculate apinae (Hymenoptera, Apidae). Micron 32:379-385.
- Silva, C.A.D., Zanuncio, T.V., Cunha, B.G., Castro, A.A., Canevari, G.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2009. Development and survival of nymphs of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with caterpillars of *Chlosyne lucinia saundersii* (Lepidoptera: Nymphalidae). Braz. Arch. Biol. Tech. 52: 105-109.
- Silva, E.C.A. & Caetano, F.H. 1991. Anatomia e histologia do aparelho reprodutor feminino de *Abracris flavolineata* (Acrididae-Ommatolampinae-Abracrini). B. Industr. Anim. 48:23-29.
- Silvia Pinent, M.J., Gervásio, S.C. 1998. Biologia de *Frankliniella schultzei* (Trybom) (Thysanoptera: Thripidae) em tomateiro. An. Soc. Entomol. Brasil 27:519-524.
- Simiczjew, B.A., Ogorzalek, & Stys, P. 1998. Heteropteram ovaries: variations on the theme. Folia Histoch. Cytobiol. 36:147-156.
- Stefanini, M., Demartino, C., Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. Nature. 216:173-174.
- Szklarzewicz, T. 1998. The ovaries of scale insects (Hemiptera, Coccinea). Morphology and phylogenetic conclusions. Folia Histoch Cytobiol. 36:157-165.
- Terra, W.R. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion. An evolutionary perspective. Braz. J. Med. Biol. Res. 21:675-734.
- Teixeira, D.M. 1997. (Org). Brasil holandês: o “Thierbuch” e a “Autobiografie” de Zacharias Wagener. Rio de Janeiro e Lisboa: Ed. Index, 2:240.

- Uvarov, S.B. 1966. *Grasshoppers and locusts*. London: Cambridge University Press.
- Vargas, N.C., Silva, A.T.C., Matta, A.P.L. F., Francisco, R.P. Biologia de *Phibalosoma phyllinum* (Phasmatodea) em cativeiro. Revista Científica da Faminas, 2008. Vol.04-nº3. ISSN 1807-6912.
- Whiting. MF, Bradler. S, Maxwell. T. 2003. Loss and recovery of wings in stick insects. Nature 421:264-267.
- Zanuncio, J.C., Molin-Rugama, A.J., Serrão J.E., Pratisoli, D. 2001. Nymphal development and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera, Pentatomidae) fed with combinations of *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) pupae and *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) larvae. Biol. Sci. Tec. 11:331-337.
- Zapata, S., Torres, E. 1970. Biología y morfología de *Bacteria granullicolis* (Blanchard) (Phasmida). Publ. Cent. de Est.Ent. Chile, 10:23-42.