

Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres como ferramenta de predição da fixação da resistência a pesticidas

ISSN 0103-9865
Setembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 75

Dinâmica populacional da mosca- dos-chifres como ferramenta de predição da fixação da resistência a pesticidas

Luciana Gatto Brito
Fábio da Silva Barbieri
Rodrigo Barros Rocha
Márcia Cristina de Sena Oliveira
Félix David Guerrero
Lane Douglas Foil

Embrapa Rondônia
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127, CEP 76815-800, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.embrapa.br/rondonia

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações

Presidente: *Alexsandro Lara Teixeira*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Marília Locatelli

Rodrigo Barros Rocha

José Nilton Medeiros Costa

Ana Karina Dias Salman

Luiz Francisco Machado Pfeifer

Fábio da Silva Barbieri

Wilma Inês de França Araújo

Daniela Maciel Pinto

Normalização: *Daniela Maciel*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2015): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres como ferramenta de predição da fixação da resistência a pesticidas / Luciana Gatto Brito ... [et al]. -- Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2015.

p. 36 – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865 ; 75).

1. Parasitologia veterinária. 2. *Haematobia irritans*. 3. Mosca-dos-chifres. 4. Bovinos. I. Brito, Luciana Gatto. II. Barbieri, Fábio da Silva. III. Rocha, Rodrigo Barros. IV. Oliveira, Márcia Cristina de Sena. V. Guerrero, Felix D. VI. Foil, Lane D. VII. Título. VIII. Série.

CDD (21.ed.) 636.089

© Embrapa – 2015

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e métodos	10
Área experimental e dados meteorológicos	10
Animais experimentais	11
Estudo da fase parasitária da mosca-dos-chifres	11
Estudo da fase não parasitária	11
Determinação do número de gerações anuais da mosca-dos-chifres	12
Susceptibilidade das populações da mosca-dos-chifres a pesticidas	13
Susceptibilidade das populações da mosca-dos-chifres a pesticidas	15
Levantamento dos fatores de risco relacionados à emergência da resistência a pesticidas em rebanhos bovinos	18
Resultados	20
Influência dos fatores climáticos na sazonalidade da mosca-dos-chifres	20
Estabelecimento da fase não parasitária da mosca-dos-chifres em laboratório	21
Determinação do número de gerações anuais da mosca-dos-chifres	23
Resistência a pesticidas nas populações da mosca-dos-chifres	24
Fatores de risco relacionados à emergência da resistência a pesticidas em rebanhos bovinos	29
Discussão	31
Conclusões	32
Referências	33

Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres como ferramenta de predição da fixação da resistência a pesticidas

*Luciana Gatto Brito*¹
*Fábio da Silva Barbieri*²
*Rodrigo Barros Rocha*³
*Márcia Cristina de Sena Oliveira*⁴
*Felix David Guerrero*⁵
*Lane Douglas Foil*⁶

Resumo

Buscando-se estabelecer a dinâmica populacional da mosca-dos-chifres foi realizado o acompanhamento de dois rebanhos bovinos estabelecidos em regiões climáticas contrastantes, o que possibilitou identificar que além da temperatura e da precipitação, o número de dias de chuva apresenta influência direta na infestação sobre os animais e que sob as condições climáticas do trópico úmido, a mosca-dos-chifres tem a capacidade de produzir até cerca de 15 gerações anuais. Tais informações, associadas a realização de testes diagnósticos da resistência a pesticidas, tornam-se relevantes na elaboração de estratégias de controle para as populações da mosca-dos-chifres, uma vez que a capacidade anual da espécie em gerar descendentes no Brasil mostra-se favorável à rápida seleção de indivíduos resistentes as bases utilizadas em seu controle.

Palavras-chave: fatores climáticos; número de gerações; pesticidas; mosca-dos-chifres.

¹ Médica-veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

² Médico-veterinário, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

³ Biólogo, D.Sc. em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

⁴ Médica-veterinária, D.Sc. em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

⁵ Bioquímico, PhD em Bioquímica, Research Physiologist (Insects), Livestock insects Research Laboratory, Kerrville, TX, US

⁶ Zoólogo, PhD em Entomologia Médica, Entomology Department, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, US

Population dynamics of horn fly as a prediction tool for fixing pesticide resistance

Abstract

Seeking to establish the population dynamics of horn fly were monitored two cattle herds established in contrasting climatic regions, which enabled us to identify that besides the temperature and precipitation, the number of rainy days has direct influence on the infestation animals and that under the climatic conditions of the humid tropics, the horn fly has the ability to produce up to around 15 generations per year. This information associated with performing diagnostic tests of pesticide resistance, become relevant in the development of control strategies for the populations of horn fly, since the annual capacity of the species to generate descendants in Brazil shows up favorable to the rapid selection of the bases resistant individuals used in your control.

Keywords: *climatic factors; number of generations; pesticides; horn fly.*

Introdução

A infestação pela mosca-dos-chifres é um fator limitante para a rentabilidade da produção pecuária mundial. Os maiores prejuízos de um rebanho infestado pela mosca-dos-chifres, como perda de peso, ganho de peso zero e queda na produção de leite, são consequentes, principalmente, do estresse provocado pela ação irritante das moscas e não, apenas, da espoliação sanguínea.

A utilização de inseticidas ainda é a forma primária de controle das ectoparasitoses nos animais pecuários (FAO, 2004). No entanto o uso exaustivo de formulações pesticidas é responsável pela perda de eficácia das bases e determina o surgimento e a fixação de populações parasitárias resistentes. A disseminação da resistência as diferentes bases pesticidas demonstra as limitações existentes no controle químico dos ectoparasitas, sendo essencial que os pesticidas sejam administrados como preciosos recursos para o manejo sanitário dos rebanhos.

Apesar das desvantagens do uso de pesticidas nos sistemas de produção pecuários, como a poluição ambiental, a presença de resíduos parasiticidas na carne e no leite e a toxicidade para os trabalhadores que manipulam e aplicam as formulações, estes fármacos são ainda essenciais principalmente para o controle das populações da mosca-dos-chifres, assim como do carrapato dos bovinos. O fácil acesso aos produtos parasiticidas e a facilidade com que eles podem ser aplicados, combinado ao progresso no conhecimento da bioecologia parasitária, levou a um período de relativo sucesso no controle das infestações parasitárias, particularmente em sistemas de produção intensivos.

A falsa suposição de que o controle parasitário pode ser facilmente realizado utilizando-se fármacos parasiticidas levou a atual situação em relação ao controle químico das ectoparasitoses. O estabelecimento de populações resistentes as bases químicas mais utilizadas, a contaminação química dos alimentos por metabólitos secundários originários da degradação dos pesticidas, a contaminação ambiental e a desconfiança dos produtores em relação a eficiência dos programas de controle de parasitas em sistemas de produção pecuários são o resultado de anos de mau uso das bases químicas utilizadas para o controle das infestações pela mosca-dos-chifres e também dos carrapatos dos bovinos.

Problemas no controle da mosca-dos-chifres decorrentes da resistência a inseticidas têm sido cada vez mais frequentes nas principais regiões pecuárias mundiais (MCKENZIE; BYFORD, 1993; KUNZ et al., 1995; BYFORD et al., 1999; GUERRERO et al., 1999; KAUFMAN et al., 1999; HOELSCHER, 2000; BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2004; GARCIA et al., 2004; FOIL et al., 2005). O aparecimento e a fixação da resistência as bases inseticidas comprometem não apenas ao princípio ativo ao qual as populações foram expostas, mas a todo o grupo químico a que ele pertence. Em última análise, a aplicação de doses mais elevadas e de tratamentos mais frequentes em função da resistência as bases nas populações parasitárias, aumentam os custos de produção e o número de eventos que expõem os sistemas de produção pecuários a perigos químicos.

A intensificação dos tratamentos para o combate às infestações da mosca-dos-chifres está diretamente relacionada a sazonalidade da espécie, uma vez que fatores climáticos favoráveis e a presença de animais suscetíveis influenciam diretamente no aparecimento e na gravidade das infestações. Normalmente, as maiores infestações de *Haematobia irritans* ocorrem durante o período de maior pluviometria (CHAMBERLAIN, 1984; CRUZ-VÁZQUEZ et al., 2000; BARROS, 2001; BRITO et al., 2007; CASTRO et al., 2008) o qual é favorável ao desenvolvimento das formas imaturas que ocorre no bolo fecal (KUNZ et al., 1970; KUNZ, 1980, LYSYK, 1992). O período de desenvolvimento de ovo a adulto da mosca-dos-chifres é variável, podendo ocorrer entre 8 e 17 dias (MELVIN; BECK, 1931; PALMER et al., 1981; LYSKY, 1992; BARROS, 2002) dependendo das condições climáticas predominantes.

Temperaturas variáveis entre 22 °C e 29°C e umidade relativa do ar entre 65% e 90% são consideradas como condições ideais para o desenvolvimento biológico da mosca-dos-chifres (MORGAN, 1964; HOELSCHER; COMBS JUNIOR, 1971). Baixas temperaturas determinam a ocorrência da diapausa no ciclo biológico da mosca, o que acaba por influenciar na emergência

dos adultos e no número de gerações de *H. irritans* em regiões onde prevalece o clima temperado (LYSYK; MOON, 1994). De forma geral, o ciclo biológico (ovo-adulto) da mosca-dos-chifres é curto e no Brasil pouco se conhece em relação a fase não parasitária da mosca-dos-chifres (MACEDO et al., 2001; BARROS, 2002), o que dificulta o estabelecimento da dinâmica populacional de *H. irritans* sob as condições climáticas presentes no Brasil, importante polo mundial de produção de bovinos.

A sazonalidade da *H. irritans* relaciona-se diretamente com o aumento na densidade de infestação da espécie. Fatores climáticos favoráveis ao desenvolvimento dos instares imaturos determinam uma maior emergência de adultos que se traduz em uma maior intensidade de infestação sobre os hospedeiros. Tal condição, na maioria das vezes faz com que sejam realizados tratamentos direcionados a diminuir drasticamente e até mesmo eliminar a infestação. Dessa forma, a utilização contínua de bases pesticidas para o controle das populações da mosca-dos-chifres altera a frequência de indivíduos naturalmente resistentes a um determinado princípio ativo, os quais acabam por disseminar tal característica em sua população de origem (BYFORD et al., 1999; GUERRERO et al., 1998; FOIL et al., 2005).

O estudo da dinâmica populacional da mosca-dos-chifres, da situação epidemiológica da resistência aos pesticidas utilizados em seu controle e a identificação dos cenários probabilísticos que determinam a fixação da resistência à pesticidas nas populações da mosca-dos-chifres é uma informação pouco conhecida para as condições tropicais no Brasil e poderá ser útil para a indicação de uso das bases pesticidas, sendo esse o objetivo principal do estudo.

Material e métodos

Área experimental e dados meteorológicos

Os experimentos relacionados a avaliação da influência climática sobre a infestação de bovinos por *H. irritans* foram conduzidos em fazendas experimentais estabelecidas em regiões geográficas distintas e com condições climáticas contrastantes. Os estudos foram conduzidos em uma fazenda experimental localizada a 8° 48' 10" S / 63° 50' 56" W, altitude média de 90 m acima do nível do mar com médias anuais de precipitação de 2.246 mm e de temperatura de 25,5 °C. A segunda fazenda experimental está localizada a 21° 57' 42" S / 47° 50' 28" W, altitude média de 860 m acima do nível do mar, médias anuais de precipitação de 1.476 mm e de temperatura de 19,8 °C. As médias de precipitação e temperatura apresentadas referem-se aos últimos 10 anos de observação.

Segundo os critérios de classificação climática preconizados por Köppen-Geiger e atualizados por Peel et al. (2007), a fazenda experimental 1 apresenta clima megatérmico tropical chuvoso (Aw) enquanto que a fazenda experimental 2 está sob a influência do clima mesotérmico temperado úmido (Cw), os quais são definidos como tropical com estação seca de inverno e temperado úmido com inverno seco, respectivamente. Os dados climáticos utilizados no estudo, foram obtidos junto ao Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

Animais experimentais

Dois grupos experimentais de bovinos, cada qual constituído por dez animais foram acompanhados durante um período de 24 meses. O grupo 1 composto por 10 machos bovinos mestiços meio sangue *Bos taurus* x *B. indicus* com idade entre 16 e 18 meses ao início do experimento foi acompanhado na região de clima megatérmico tropical chuvoso (Figura 1). O grupo 2 composto por machos bovinos *Bos indicus* com idade variável entre 18 e 19 meses ao início do experimento foi acompanhado na região de clima mesotérmico temperado úmido (Figura 2). Os animais experimentais não receberam nenhum tipo de tratamento antiparasitário durante todo o período experimental.

Foto: Fábio da Silva Barbieri/Embrapa Rondônia



Figura 1. Grupo experimental *Bos taurus* x *B. indicus*_Embrapa Rondônia.

Estudo da fase parasitária da mosca-dos-chifres

Durante o período de agosto de 2010 a julho de 2012 as moscas-dos-chifres foram contadas a cada 28 dias, sempre no período da manhã (8h30 às 9h30) em ambas as áreas experimentais. A avaliação da infestação por *H. irritans* foi feita utilizando-se o método descrito por Fraga et al. (2005), adaptado por Chagas et al. (2010), o qual consiste em fotografar a região dorsal de cada animal usando câmera digital e contagem do número total de moscas por meio da análise da imagem utilizando-se o software Microsoft Paint Program.

Foto: Rodrigo Giglioti/Embrapa Pecuária Sudeste



Figura 2. Grupo experimental *Bos indicus*_Embrapa Pecuária Sudeste.

Estudo da fase não parasitária

Durante o período de outubro de 2012 a setembro de 2013, quinzenalmente, bolos fecais bovinos recém emitidos de tamanho mediano (cerca de 30 cm de diâmetro), aparência opaca e cor esverdeada foram aleatoriamente marcados com estacas em uma área de 20.000 m² localizada a 8° 48' 10" S / 63° 50' 56" W e onde foram mantidos 10 bovinos adultos durante todo o período experimental. Após um período variável de duas a três horas após a emissão do bolo fecal, realizou-se a coleta de cinco bolos fecais sendo o critério de escolha dos mesmo a integridade do bolo fecal, o qual deveria ter a presença de uma fina crosta externa e apresentar consistência firme.

Cada bolo fecal selecionado foi recolhido com auxílio de uma pá de borda retilínea, com a qual procurou-se colher todo o bolo fecal e alguma quantidade do solo de contato, sendo as fezes acondicionadas em caixa plástica (50 cm de comprimento, 40 cm de largura e 12 cm de altura). No laboratório, sob condições controladas de temperatura e umidade (25 °C e UR de 65%) cada bolo fecal foi alocado sob gaiolas de emergência Soil Emergence Trap (BioQuip Products, Inc., Cat. Number #2890), as quais possuem 60 cm de comprimento, 60 cm de largura e 60 cm de altura, são revestida com tela de náilon e de formato piramidal, apresentando um orifício na parte superior onde é conectado um frasco removível cujo interior continha um funil de polietileno que impedia o refluxo dos insetos que alcançassem o frasco. Ao redor das armadilhas foi colocado solo úmido e compactado entre a parte inferior da gaiola e o solo, para evitar o acesso de possíveis predadores ao interior das gaiolas (Figura 3).

Fotos: Fábio da Silva Barbieri/Embrapa Rondônia



Figura 3. Gaiola de emergência Soil Emergence Trap (BioQuip Products, Inc., Cat. Number #2890) utilizada para a recuperação das moscas *Haematobia irritans* recém-emergidas.

Determinação do número de gerações anuais da mosca-dos-chifres

O tempo requerido pela mosca-dos-chifres para completar uma geração foi calculado segundo metodologia proposta por Castro et al. (2008). Resumidamente, assume-se que fêmeas recém-emergidas presentes sobre o bovino hospedeiro necessitam de cinco dias independentemente da temperatura para realizar seu primeiro ciclo gonotrópico e realizar sua primeira postura. Para a estimativa do tempo de desenvolvimento de ovo a adulto utilizou-se o modelo de graus-dia, baseado na análise dos dados de desenvolvimento da fase não parasitária realizado em laboratório. Taxas de desenvolvimento de *H. irritans* (proporção do total por dia) observados em laboratório foram linearmente relacionadas com a temperatura experimental ambiente, onde o desenvolvimento total exigindo foi $K = 193 (\pm \text{S.E.} = 4,2, \text{d.f.} = 130)$ graus-dia acima da temperatura limiar inferior de desenvolvimento que é $k = 10^\circ\text{C} (\pm 0,36)$.

O modelo de desenvolvimento foi, então, usado para calcular graus-dia a partir de registros de temperatura diárias em Porto Velho e São Carlos, usando o método de onda senoidal de meio-dia (ALLEN, 1976), sem ajuste para a latitude e os efeitos micro-habitat. Começando no primeiro dia de observação, as fêmeas recém-emergidas na população foram assumidas como aquelas que realizaram a oviposição três dias mais tarde, e, em seguida, os descendentes foram previstos para emergir como adultos em uma data posterior, determinada com o auxílio da tabela de valores limites de desenvolvimento de *H. irritans* proposta por Palmer et al. (1981), quando um adicional de 193 graus-dia acima de 10°C foi acumulado. Este processo em duas etapas foi aplicado em série para obter uma sequência de datas que delimitam gerações consecutivas (adulto-adulto).

Susceptibilidade das populações da mosca-dos-chifres a pesticidas

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade de populações de *H. irritans* a inseticidas piretroides e organofosforados, realizou-se em Rondônia a avaliação fenotípica da resistência em 45 rebanhos bovinos e três rebanhos bubalinos estabelecidos nas microrregiões de Porto Velho e Ji-Paraná, duas importantes regiões pecuárias do Estado de Rondônia onde segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) (IBGE, 2010) encontram-se estabelecidos 41,08% e 57,43% do efetivo de bovinos e bubalinos de Rondônia. No Estado de São Paulo foram visitadas 22 propriedades diferentes, e somente dez apresentaram infestações com quantidade de moscas suficientes para execução dos bioensaios: duas dos municípios de São Carlos e Sertãozinho e uma de cada um dos seguintes municípios: São Manuel, Nova Odessa, Botucatu, Lavínia, Ribeirão Bonito e Colina.

Tabela 1. Microrregiões de Rondônia e São Paulo onde foram realizadas as colheitas de mosca-dos-chifres nos rebanhos bovinos e bubalinos entre os meses de novembro de 2010 a maio de 2014.

Microrregião	Estados/municípios	Número de rebanhos avaliados
Rondônia		
Ji-Paraná	Jaru, Nova União, Ouro Preto do Oeste, Presidente Médici e Vale do Paraíso	30
Porto Velho	Candeias do Jamari, Nova Mamoré e Porto Velho	18
Total		48
São Paulo		
São Carlos	São Carlos, Ribeirão Bonito	3
Botucatu	Botucatu, São Manuel	2
Campinas	Nova Odessa	1
Ribeirão Preto	Sertãozinho	2
Barretos	Colina	1
Araçatuba	Lavínia	1
Total		10
Total (Rondônia + São Paulo)		58

Os bioensaios foram realizados com o método de papel filtro impregnado com pesticidas de acordo com a metodologia proposta por Sheppard e Hinkle (1987) e adaptada por Barros et al. (2002) (Figura 4). Os kits inseticidas foram preparados no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Rondônia e confeccionados com cipermetrina em grau técnico (Sigma) diluído em acetona PA nas concentrações de 1,6; 6,4; 25,6; 102,4; e 409,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e diazinon em grau técnico (Diazinon, analytical standart, Pestanal®, CAS number 333-41-5) diluído em acetona PA nas concentrações de 3,2; 2,4; 1,2; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 e 0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Após a impregnação dos papéis filtro com os pesticidas e a secagem dos mesmos à temperatura ambiente, os papéis impregnados foram embalados em papel alumínio, datados e mantidos em temperatura de refrigeração até o momento do uso. Para realização dos bioensaios os papéis impregnados foram alocados em placas de Petri descartáveis mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para a refrigeração dos kits. Todas as concentrações foram preparadas em triplicata além do controle o qual foi preparado também em triplicata com acetona.

Os kits inseticidas preparados na Embrapa Rondônia foram enviados para o Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, TX, para a realização do bioensaio com *H. irritans* pertencentes a colônia suscetível de referência, mantida pelo referido centro de pesquisa. Os resultados obtidos a partir da colônia de referência foram analisados da mesma forma que os obtidos nas propriedades

Fotos: Fábio da Silva Barbieri/Embrapa Rondôni

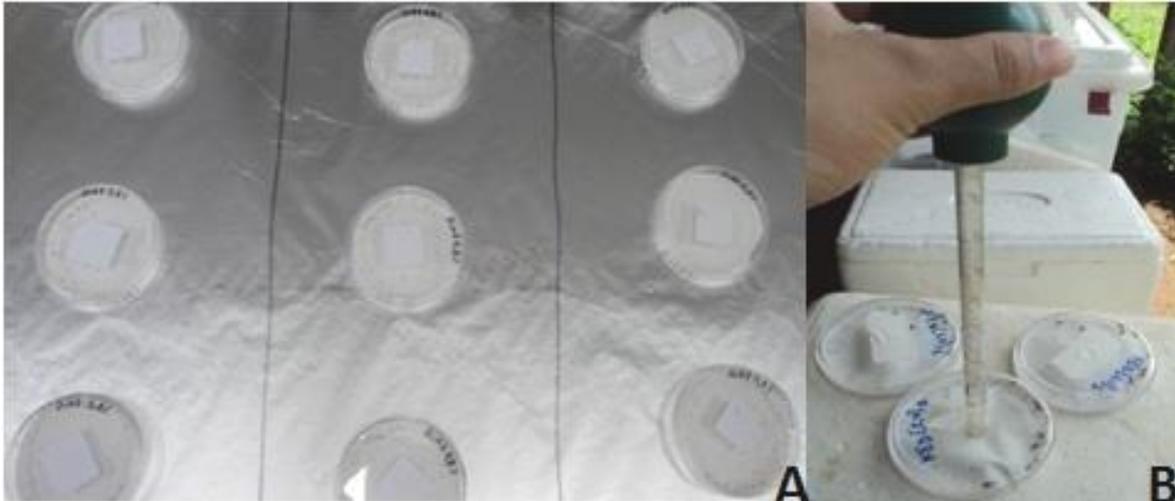


Figura 4. Kit inseticida confeccionado com papel filtro impregnado com pesticida em grau técnico diluído em acetona (A) e realização do bioensaio a campo com populações de mosca-dos-chifres (B).

Fotos: Fábio da Silva Barbieri/Embrapa Rondônia

As moscas-dos-chifres foram colhidas diretamente sobre os animais infestados com auxílio de uma rede entomológica (Figura 5). As moscas foram transferidas para as placas de Petri com o papel impregnado, onde cada placa continha cerca de 25 espécimes por repetição, os quais permaneceram por um período de 2 horas (Figura 4). Após este período foi realizada a leitura, onde foram separadas as moscas vivas (resistentes) e as mortas (sensíveis) em cada concentração. Moscas com incapacidade de voar foram consideradas mortas.



Figura 5. Captura de espécimes de *Haematobia irritans* sobre os animais.

Concluída a leitura das placas dos bioensaios, amostras da população de mosca-dos-chifres foram depositadas em frascos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior realização das provas de detecção molecular e caracterização do perfil genotípico das populações com relação aos alelos da resistência aos pesticidas piretroides e organofosforados.

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios, tanto das propriedades quanto da colônia de referência, foi calculada a porcentagem de mortalidade e realizada a análise de sobrevivência com o procedimento (PROC) Probits do Programa Statistical Analysis Systems (SAS) (SAS INSTITUTE..., 2003) para o cálculo da concentração letal referente a mortalidade de 50% dos indivíduos (CL50) de cada população avaliada. Foi calculado ainda o fator de resistência (FR), de cada uma das populações por meio da divisão da CL50 da população testada a campo e a CL50 da colônia de referência.

Diagnóstico molecular da resistência a pesticidas

Piretroides

Para a validação das provas moleculares diagnósticas para amplificação dos alelos *kdr* e *super-kdr* em populações brasileiras da mosca-dos-chifres foram selecionadas três populações de mosca-dos-chifres coletadas nos municípios de Porto Velho, Nova Mamoré e Nova União. Utilizou-se como amostra controle positivo homocigoto resistente das reações de PASA-PCR amostras de DNA de uma população de *H. irritans* proveniente do Estado da Geórgia (USA) cedidas pelo Dr. Felix Guerrero do ARS/USDA. As três populações de *H. irritans* de Rondônia selecionadas apresentaram-se fenotipicamente resistentes a pesticidas piretroide por meio dos bioensaios com papel filtro impregnado com fator de resistência (FR) de 32,75; 34,90 e 40,80.

A extração de DNA genômico se deu de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2003). Resumidamente, as moscas foram separadas de acordo com o sexo e as fêmeas tiveram a cabeça cortada e o corpo descartado. As moscas foram armazenadas a temperaturas a -80 °C em tubos plásticos com a identificação, até o momento da análise. Moscas individualizadas foram transferidas para placas de Petri previamente resfriadas em gelo seco e colocadas em microtubos de 1,5 mL também pré-resfriados e mantidos em gelo seco. As moscas foram esmagadas com o pistilo plástico descartável previamente resfriado em gelo seco por aproximadamente 15 segundos. Foram adicionados 25 µL do buffer de isolamento de DNA (1667 µL de 3M KCl; 600 µL de 1M Tris-Cl, pH 8,5; 400 µL de 1M Tris-Cl, pH 8,0; 7333 µL de água ultrapura) e novamente a mosca foi esmagada com o pistilo gelado por mais 15 segundos. Teve-se a preocupação de se observar se a mosca foi totalmente fragmentada e então o tubo foi novamente transferido para o gelo seco até que todas as moscas estivessem processadas. Os tubos contendo as moscas foram rapidamente centrifugados para total mistura da larva com o tampão de isolamento. As moscas fragmentadas no tampão de isolamento foram submetidas a banho-maria (temperatura de ebulição) por 3 a 5 minutos. O DNA total extraído foi mantido em freezer a -20 °C para uso imediato ou por até 2 dias ou a -80 °C quando o tempo para realização da reação em Cadeia da Polímera (PCR) excedeu para 48 horas. Para a realização das provas moleculares, as amostras contendo o DNA total foram centrifugadas a 4 °C por 14.000 rpm por 4 minutos.

Para a genotipagem das moscas em relação aos alelos tipo *kdr* foi necessário a otimização da reação em cadeia da polimerase, onde o volume de reação utilizado foi de 20 µL. Todas as baterias de reação contavam com uma amostra de DNA controle *kdr* RR proveniente de uma população de *H. irritans* do Estado da Geórgia (USA) cedida ARS/USDA e uma amostra controle *kdr* SS também cedida pelo ARS/USDA.

Os protocolos otimizados apresentam condições de temperatura de anelamento e concentração de polimerase diferenciadas às condições estabelecidas anteriormente por Guerrero et al. (1997), sendo estes:

1. Amplificação de alelos tipo *kdr*

- Mix alelo susceptível
 - 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8,5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,2% Tween 20, 0,4 mM de dNTPs e 0,05 unidades/µl taq DNA polimerase)
 - 0,2 µL de *primer* FG 130 (5' - TAC TGT TGT CAT CCG CAA TC -3')
 - 0,2 µL de *primer* FG 138 (5' - CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3')
 - 0,2 µL de *primer* FG 234 (5' -CTT CTT CAT CCG TGT AGC - 3')
 - 0,2 µL de *primer* FG 243 (5' -GGC ATG GCT TTC CGT GTC C - 3)
 - 8,2 µL de água ultrapura
 - 1,0 µL de DNA diluído 1:10
- Mix alelo resistente

- 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8.5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 units/µl taq DNA polimerase);
- 0,2 µL de *primer* FG 134 (5' –TAC TGT TGT CAT CGG CAA TT -3'')
- 0,2 µL de *primer* FG 138 (5' – CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3)
- 0,2 µL de *primer* FG 234 (5' –CTT CTT CAT CGG TGT AGC – 3')
- 0,2 µL de *primer* FG 243 (5' –GGC ATG GCT TTC CGT GTC C – 3)
- 8,2 µL de água ultrapura
- 1,0 µL de DNA diluído 1:10

Condições de amplificação: Foram testadas oito temperaturas de anelamento para os *primers*, sendo que estas variaram de 55,7 °C a 65 °C, sendo a temperatura de 55,7 °C considerada ótima para as condições de amplificação avaliadas. As condições de amplificação estabelecidas para a amplificação de alelos tipo *kdr* foram:

- Desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos
- 35 ciclos de
- 94 °C por 1 minuto
- 57,5 °C por 1 minuto
- 72 °C por 1 minuto
- Extensão final a 72 °C por 7 minutos

As amostras de *H. irritans* amplificadas para caracterização dos alelos de resistência tipo *kdr* com *amplicons* de 285 pb para *kdr* e 154 pb para GAPDH foram visualizadas em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo. Buscando a identificação genotípica da resistência a pesticidas piretroides, amostras de DNA de espécimes de *H. irritans* genotipados como *kdr* resistentes homocigoto (RR) e *skdr* heterocigotos (SR) à pesticidas piretroides foram submetidas a reação de sequenciamento para avaliação da presença das mutações que conferem a resistência ao pesticida.

Foram sequenciados somente os alelos *kdr* e *skdr* R proveniente das populações avaliadas da mosca-dos-chifres. Os *amplicons* foram clonados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector Systems vector (Promega) e transformados em *Escherichia coli* (DH5α). As colônias brancas foram selecionadas e incubadas a 37 ± 1 °C "overnight" sob agitação. Após a confirmação da presença do fragmento de PCR no vetor, as amostras foram purificadas e sequenciadas no equipamento Applied Biosystems/HITACHI ABI Prism[®] 3100 Avant Genetic Analyzer, usando o kit Big Dye terminator v.3.1.

As sequências *kdr* e *skdr* provenientes das populações brasileiras de *H. irritans* foram confrontadas com as sequências de referência de *H. irritans* que contêm as mutações que conferem a resistência a pesticidas piretroides e encontram-se depositadas no banco público de nucleotídeos *GenBank* (U83874.1, U83873.1, U83872.1 e U83871.1.) utilizando-se o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*) (ZHENG et al., 2000).

Organofosforados

Para a genotipagem das populações de moscas-dos-chifres em relação aos alelos da resistência a pesticidas organofosforados conferido pelo gene *AchE* foi necessário a otimização da reação em cadeia da polimerase, onde o volume de reação utilizado foi de 20 µL. O protocolo otimizado utilizado foi:

- Mix alelo susceptível
 - 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8.5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 units/µl taq DNA polimerase);
 - 0,2 µL de *primer* FG 417 (5' –GGC ATG ATG CAA TCG GG– 3')

- 0,2 µL de *primer* FG 419 (5' –GCA GTA GTG ATG CAT TAC AA– 3')
- 0,2 µL de *primer* FG 234 (5' –CTT CTT CAT CGG TGT AGC – 3')
- 0,2 µL de *primer* FG 243 (5' –GGC ATG GCT TTC CGT GTC C – 3)
- 8,2 µL de água ultrapura
- 1,0 µL de DNA diluído 1:10

- Mix alelo resistente

- 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris–HCl pH 8,5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,2% Tween 20, 0,4 mM de dNTPs e 0,05 units/µl taq DNA polimerase);
- 0,2 µL de *primer* FG 418 (5' –GGC ATG ATG CAA TCG GC– 3')
- 0,2 µL de *primer* FG 419 (5' –GCA GTA GTG ATG CAT TAC AA– 3)
- 0,2 µL de *primer* FG 234 (5' –CTT CTT CAT CGG TGT AGC – 3')
- 0,2 µL de *primer* FG 243 (5' –GGC ATG GCT TTC CGT GTC C – 3)
- 8,2 µL de água ultrapura
- 1,0 µL de DNA diluído 1:10

Condições de amplificação:

- Desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos
- 35 ciclos de
- 94 °C por 1 minuto
- 57,5 °C por 1 minuto
- 72 °C por 1 minuto
- Extensão final a 72 °C por 7 minutos

As amostras de *H. Iritans* amplificadas para caracterização dos alelos de resistência tipo AchE com *amplicons* de 115 pb para AchE e 154 pb para GAPDH foram visualizadas em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo.

A pesquisa de alelos mutantes que conferem resistência aos pesticidas piretroides e organofosforados em populações de moscas-dos-chifres foi realizada nos indivíduos fenotipicamente caracterizados como resistentes nos bioensaios e também nos indivíduos do grupo controle de cada bioensaio.

Foram genotipadas para resistência a pesticidas piretroides 48 populações de *H. Iritans* de Rondônia e dez populações de *H. Iritans* de São Paulo. Em relação aos pesticidas organofosforados, 48 populações de *H. Iritans* foram genotipadas, sendo 38 de Rondônia e 10 de São Paulo.

Levantamento dos fatores de risco relacionados à emergência da resistência a pesticidas em rebanhos bovinos

Buscando identificar e estudar os cenários probabilísticos que determinam a fixação de alelos relacionados a resistência a pesticidas foram entrevistados 33 proprietários de rebanhos bovinos estabelecidos no Estado de Rondônia. Nessas mesmas propriedades também foram colhidas amostras de mosca-dos-chifres para realização do bioensaio do papel filtro impregnado (SHEPPARD; HIINKLE, 1987) para determinação da resistência a pesticidas piretroides.

Questionários foram aplicados a fim de se conhecer os aspectos referentes ao uso de pesticidas nas propriedades, a frequência de realização de tratamentos para o controle de ectoparasitas no rebanho, a aptidão do rebanho e percepção do produtor quanto à época de maior ocorrência das infestações parasitárias nos rebanhos estabelecidos em uma área sob a influência do clima megatérmico tropical chuvoso (Aw) (Anexo A). O cálculo para determinação do número de

questionários aplicado nas propriedades seguiu o modelo matemático preconizado por Cannon (2001), sendo este:

$$n = \frac{(1 - (1 - \alpha)^{1/D}) \left(N - \frac{1}{2} (SeD - 1) \right)}{Se}$$

onde:

n = número de questionários aplicados;

α = acurácia das informações;

N = número de propriedades com rebanhos bovídeos na região estudada;

D = número de rebanhos suscetíveis a infestações por populações da mosca-dos-chifres;

Se = prevalência estimada do número de rebanhos com populações da mosca-dos-chifres resistentes a pesticidas.

Análises estatísticas

Fatores climáticos

Para quantificar grau de associação entre as características climáticas e a intensidade das infestações da mosca-dos-chifres foram obtidas as estimativas de correlação simples e parcial entre as características avaliadas. As correlações simples foram estimadas utilizando a expressão (CRUZ; REGAZZI, 2001):

Para quantificar grau de associação entre as características climáticas e a intensidade das infestações da mosca-dos-chifres foram obtidas as estimativas de correlação simples e parcial entre as características avaliadas. As correlações simples foram estimadas utilizando a expressão (CRUZ; REGAZZI, 2001):

$$(i) \quad r_{xy} = \frac{COV_{(x,y)}}{\sqrt{\sigma_x^2 \sigma_y^2}}$$

$COV_{(x,y)}$ = covariâncias entre duas características x e y; σ_x^2 = variância da característica x, σ_y^2 = variância da característica y. As estimativas dos coeficientes de correlação parcial foram obtidas utilizando a expressão (CRUZ et al., 2004):

$$(ii) \quad r_{xy.z} = \frac{r_{xy} - r_{xz}r_{yz}}{(1 - r_{xz}^2)(1 - r_{yz}^2)}$$

$r_{xy.z}$ = correlação parcial entre duas características x e y retirando o efeito de z, r_{xy} = correlação simples entre x e y, r_{xz} = correlação simples entre x e z, r_{yz} = correlação simples entre y e z. A significância dos coeficientes de correlação parcial foi avaliada pelo teste t, em 5% e 1% de probabilidade (CRUZ; REGAZZI, 2001).

Visando o desenvolvimento de modelo para prever a resposta da variável dependente "intensidade das infestações da mosca-dos-chifres" em função das variáveis independentes, "pluviosidade", "número de dias com chuva" e "temperatura média", mensuradas em estação climática instalada na Embrapa Rondônia em Porto Velho foi ajustado modelo de regressão de acordo com o seguinte modelo:

$$(ii) \quad Y_{ij} = \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_3$$

Em que Y_{ij} = é a intensidade das infestações da mosca-dos-chifres, $\beta_1 \beta_2 \beta_3$ parâmetros do modelo de regressão, $X_1 X_2 X_3 X_4$, variáveis independentes “pluviosidade”, “número de dias com chuva” e “temperatura média”.

Para seleção das variáveis de maior importância para predição da temperatura dentro do aparelho foi o método “stepwise” com probabilidade limite para a variável entrar no modelo de 0,25 e de permanecer de 0,30 (YONEZAMA et al., 2000).

Estimação do efeito médio de substituição gênica

Uma das estimativas mais importantes a ser considerada no estudo da resposta de resistência em função da variabilidade do gene de resistência, e o efeito médio de substituição alélica que mensura a mudança na resposta de resistência causada pelas mudanças nas frequências alélicas nas populações. A decomposição da variância total em suas partes atribuídas à variância aditiva e a variância por causa dos efeitos de dominância pode ser feita utilizando um modelo de regressão, em que os valores genotípicos são expressos em função do número de alelos de resistência (R) que as populações apresentam (CRUZ et al., 2012).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \varepsilon_i$$

Em que: Y_i : é o valor genotípico, β_0 : constante da regressão, β_1 : coeficiente linear da regressão, X_1 : variável independente que expressa o número de alelos de uma população.

Nesta modelagem, a estimativa do efeito médio de substituição gênica é obtida a partir do coeficiente angular da regressão:

$$\alpha = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2} = \hat{b}_1$$

Em que: α : é o efeito médio de substituição gênica, \hat{b}_1 : coeficiente angular da regressão em função do número de alelos favoráveis. E as estimativas de variância aditiva é por causa dos desvios de dominância.

A decomposição da variância total nas frações associadas aos efeitos aditivos dos genes e dos desvios de dominância pode ser estimada da seguinte maneira (FALCONER, 1993):

$$SQ_{Total} = \sum f_i y_i = p^2(y_1)^2 + 2pq(y_2)^2 + q^2(y_3)^2 = \sigma_G^2$$

$$SQ_{Regressão} = \hat{b}_1 \sum f_i x_i y_i = 2pq\alpha^2 = \sigma_A^2$$

$$SQ_{Desvio} = \sum f_i e_i = (2pqd)^2 = \sigma_D^2$$

Resultados

Influência dos fatores climáticos na sazonalidade da mosca-dos-chifres

Por meio das análises de correlação simples e parcial relacionadas a infestação de *H. irritans* as variáveis climáticas que mais exerceram efeito sobre a intensidade das infestações de mosca-dos-chifres nos animais em ambas as condições climáticas estudadas foram a temperatura, a pluviosidade e o número de dias de chuva (Tabela 2).

A temperatura média foi o fator climático que exerceu maior influência sobre as infestações da mosca-dos-chifres sob as condições climáticas prevalentes no clima Cw, enquanto que sob as condições do clima Aw, observa-se que a pluviosidade e o número de dias de chuva foram determinantes para a regulação da intensidade das infestações de *H. irritans* sobre os animais.

Tabela 2. Estimativas de correlação simples e parcial das características climáticas com a intensidade das infestações de moscas-dos-chifres nas condições climáticas do clima megatérmico tropical chuvoso (Aw) e do clima mesotérmico temperado úmido (Cw).

Característica	Aw			Cw		
	r _{simples}	r _{parcial}	t	r _{simples}	r _{parcial}	t
Temperatura média	0,65	-0,12	0,69 ^{NS}	0,04	0,49	3,45**
Pluviosidade	0,46	0,36	2,18*	0,02	-10,9	0,66 ^{NS}
Número de dias	0,36	-0,35	-2,18*	0,03	-0,21	1,35 ^{NS}
Temp. máxima	-0,04	0,02	0,11 ^{NS}	-0,18	-0,62	4,83**
Temp. mínima	0,65	0,12	0,72 ^{NS}	0,13	-0,33	2,17*

r_{simples}: estimativa de correlação simples, r_{parcial}: estimativa de correlação parcial, t: teste t, que testa a hipótese *: significativo a 5% de probabilidade, **: significativo a 1% de probabilidade.

Observou-se que a infestação da mosca-dos-chifres tanto sob as condições climáticas Cw quanto Aw apresentaram comportamento sazonal, sendo as maiores infestações observadas no período de maior pluviometria em ambos os regimes climáticos estudados. A temperatura média foi o fator climático de maior influência no aumento das infestações de moscas-dos-chifres no clima Cw, enquanto que para o clima Aw a pluviometria foi a condicionante climática determinante para a ocorrência de picos de infestações de *H. irritans*. Observou-se que o número de dias de chuvas também influenciou no comportamento sazonal da espécie, sendo mais crítico para o decréscimo das populações estabelecidas no clima megatérmico tropical chuvoso (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo das estimativas do modelo de superfície de resposta.

Tipo climático	Na	GL	a	b ₁ (Temp)	b ₂ (PP)	b ₃ (Ndias)	b ₄ (Tmax)	B ₅ (Tmin)	σ ²	R ² A
Aw	25	23	0.0619	0.0016	-0.0359	-0.0148	0.1251	-2.2590	5.28E-02	0.43
Cw	25	23	1.0965	-0.0006	-0.0300	-0.7625	-0.3712	5.7640	0.1026	0.55

Em relação ao comportamento sazonal das infestações de *H. irritans* sob as condições do clima Cw, observou-se um declínio muito acentuado na contagem de moscas no final do outono (maio) e durante todo o inverno (junho a agosto) do hemisfério sul. Tal fenômeno pode ser explicado pela queda de aproximadamente 4,5 °C na temperatura média observada durante os meses de maio a agosto, sendo também esse o período de menor pluviometria, a qual foi variável entre 52,2 mm e 72,7 mm. Não foram observadas contagens de moscas sobre os animais durante os meses de agosto de 2011 e julho de 2012 nas condições do clima mesotérmico temperado úmido (Figura 6).

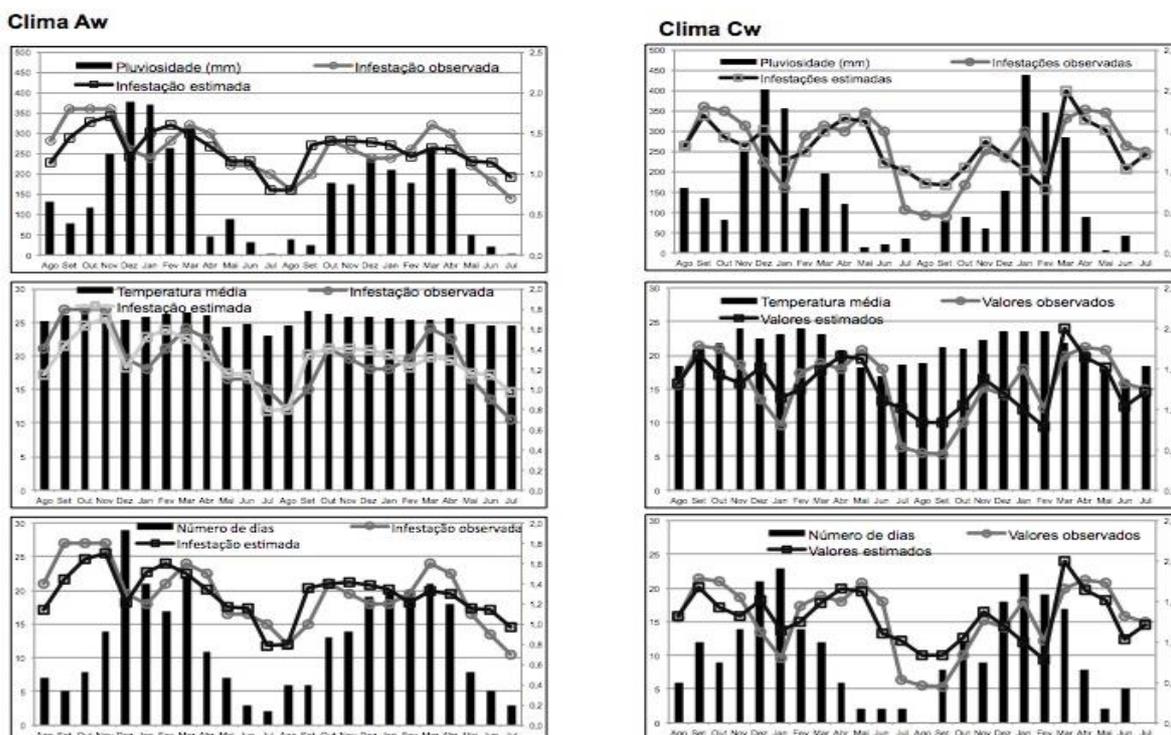


Figura 6. Influência dos fatores climáticos sobre a intensidade das infestações de moscas-dos-chifres determinadas pelas condições climáticas prevalentes nos climas mesotérmico temperado úmido (Cw) e megatérmico tropical chuvoso (Aw).

Infestações pela mosca-dos-chifres foram observadas durante todo o período de estudo nas condições de clima Aw, sendo as menores infestações observadas nos meses de julho de 2011 e julho de 2012. Observou-se a ocorrência de dois picos de infestação de *H. irritans* nos animais, sendo esses picos coincidentes com o início e o final do período chuvoso. Nota-se que sob as condições climáticas Aw, as infestações pela mosca-dos-chifres apresentam decréscimo acentuado nos meses subsequentes àqueles com mais de 20 dias de chuva.

Estabelecimento da fase não parasitária da mosca-dos-chifres em laboratório

Durante o período de colheita dos bolos fecais (dezembro/2012 a maio/2013) a temperatura média ambiental foi de 25,9 °C, com precipitação média de 220,1 mm e umidade relativa média de 88%. Foram realizadas 14 avaliações referente a emergência de *H. irritans* nas massas fecais, totalizando 35 colheitas e a captura de 292 adultos, dos quais 168 machos (57,5%) e 131 fêmeas (42,5%). Observou-se maior número de machos no início do período de emergência das moscas (Tabela 4).

Tabela 4. Ritmo de emergência, período de ovo a adulto, percentagem de emergência e proporção sexual de adultos de *Haematobia irritans* obtidos em laboratório.

Avaliação	Colheita	Mês	Emergência	Período	% Emergência	Macho	Fêmea	Média ± DP
1	1	out/12	10	9	76,9	7	3	2,6
	2	out/12	3	10	23,1	3	0	
2	3	out/12	12	9	40	8	4	6,0
	4	out/12	16	10	53,3	8	8	
3	5	out/12	2	11	6,7	0	2	5,2
	6	nov/12	8	9	30,8	8	1	
3	7	nov/12	13	10	50	7	6	5,2
	8	nov/12	5	11	19,2	2	3	

4	9	nov/12	13	9	39,4	9	4	6,6
	10	nov/12	17	10	51,5	9	8	
	11	nov/12	3	11	9,1	0	3	
5	12	dez/12	14	9	87,5	8	6	3,2
	13	dez/12	2	10	12,5	2	0	
6	14	dez/12	11	9	37,9	6	5	5,8
	15	dez/12	12	10	41,4	7	5	
	16	dez/12	6	11	20,7	2	4	
7	17	jan/13	8	9	66,7	5	3	2,4
	18	jan/13	4	10	33,3	1	3	
8	19	fev/13	14	8	100	8	6	2,8
9	20	mar/13	14	8	63,6	8	6	4,4
	21	mar/13	8	9	36,4	4	4	
10	22	mar/13	12	8	85,7	9	3	2,8
	23	mar/13	2	10	14,3	2	0	
11	24	mar/13	7	9	33,3	3	4	4,2
	25	mar/13	8	10	38,1	5	3	
	26	mar/13	4	11	19,0	1	3	
	27	mar/13	2	12	9,5	1	1	
12	28	abr/13	14	9	87,5	8	6	3,2
	29	abr/13	2	11	12,5	0	2	
13	30	mai/13	6	10	21,4	4	2	5,6
	31	mai/13	19	11	67,9	11	8	
	32	mai/13	3	12	10,7	1	2	
14	33	mai/13	2	8	11,1	2	0	3,6
	34	mai/13	13	9	72,2	8	5	
	35	mai/13	3	10	16,7	1	2	
Total			292	9,77	-	168	124	-
% Sexual			-	-	-	57,5	42,5	-
Emergência moscas/bolo fecal			4,17	-	-	-	-	4,17 ± 1,23

Em relação ao período de desenvolvimento de ovo a adulto de *H. irritans* sob condições controladas em laboratório, verificou-se que o mesmo foi variável entre 8 e 12 dias. A maioria das moscas emergiram do pupário entre o nono e o décimo dia (62,8%) após a oviposição no bolo fecal e observou-se uma média de emergência de $4,17 \pm 1,38$ moscas/bolo fecal. Fundamentado nos resultados obtidos, pode-se afirmar que, nas condições experimentais em que foram mantidos os bolos fecais, o período médio de emergência de *H. irritans* correspondeu a 9,8 dias (235 horas e 12 minutos) (Figura 7).

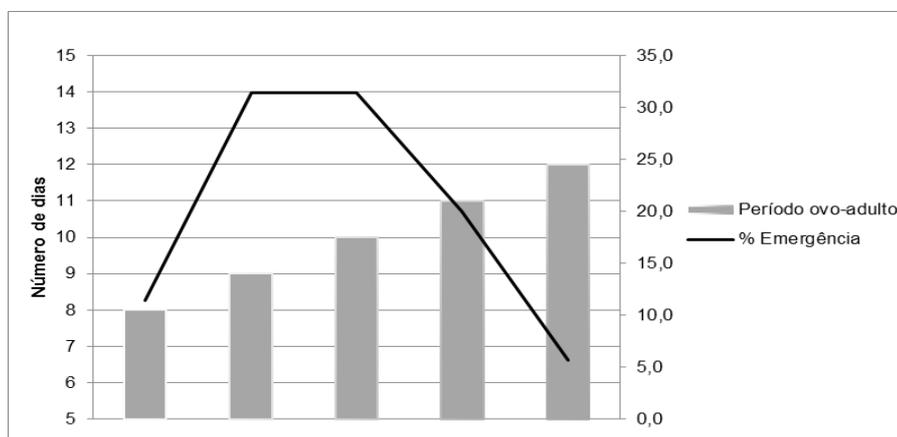


Figura 7. Período de desenvolvimento e percentual de emergência de *Haematobia irritans* em bolos fecais mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade (25 °C e UR de 65%).

Determinação do número de gerações anuais da mosca-dos-chifres

A partir do modelo de graus-dia utilizado para predição das taxas de desenvolvimento de *H. irritans* permite inferir que para as condições de temperatura do clima megatérmico tropical chuvoso (Aw) podemos observar até aproximadamente 15 gerações anuais de *H. irritans*, enquanto que para as condições térmicas do clima mesotérmico temperado úmido (Cw) tem-se a possibilidade de ocorrência de aproximadamente dez gerações anuais da mosca-dos-chifres (Tabela 5).

Tabela 5. Cálculo do número de gerações anuais de *Haematobia irritans** sob as condições de temperatura dos climas megatérmico tropical chuvoso (Aw) mesotérmico temperado úmido (Cw).

Clima mesotérmico temperado úmido (Cw)							
Mês	Temperatura máxima média	Temperatura mínima média	Temperatura média	Graus dia	Graus x geração	Número de gerações	Graus/ geração
Janeiro	27,54	12,24	19,7	9,52	291,391	0,98	285,68
Fevereiro	28,62	16,30	21,9	11,65	349,600	1,00	349,60
Março	28,12	15,69	21,5	11,29	316,129	1,07	338,71
Abril	29,04	17,21	22,7	12,53	363,273	1,03	375,80
Mai	29,57	19,35	24,0	13,85	373,906	1,11	415,45
Junho	29,27	19,72	22,8	12,58	302,013	1,25	377,52
Julho	29,93	19,61	22,9	12,69	304,457	1,25	380,57
Agosto	26,28	18,96	21,5	11,30	327,596	1,03	338,89
Setembro	27,48	17,33	20,7	10,53	315,857	1,00	315,86
Outubro	24,90	13,39	17,9	7,72	236,276	0,98	231,64
Novembro	23,81	11,17	16,2	5,98	185,446	0,97	179,46
Dezembro	25,90	13,38	17,7	7,53	230,374	0,98	225,86
Número de gerações anuais						9,61	

Continua...

Tabela 5. Continuação.

Clima megatérmico tropical chuvoso (Aw)							
Mês	Temperatura máxima média	Temperatura mínima média	Temperatura média	Graus dia	Graus x geração	Número de gerações	Graus/ geração
Janeiro	34,2	17,5	25,9	15,66	391,500	1,20	469,8
Fevereiro	34,6	21,1	27,9	17,66	388,520	1,36	529,8
Março	33,2	21,7	27,4	17,25	370,768	1,40	517,35
Abril	31,7	21,9	26,8	16,62	365,640	1,36	498,6
Mai	31,3	22,5	26,9	16,69	367,180	1,36	500,7
Junho	30,5	22,7	26,6	16,41	360,910	1,36	492,15
Julho	29,9	22,3	26,1	15,92	398,000	1,20	477,6
Agosto	30,5	22,4	26,5	16,27	390,360	1,25	487,95
Setembro	31,1	22,0	26,6	16,37	392,880	1,25	491,1
Outubro	31,0	20,4	25,7	15,48	386,875	1,20	464,25
Novembro	31,3	19,9	25,6	15,42	393,210	1,18	462,6
Dezembro	32,6	18,5	25,6	15,35	345,375	1,33	460,5
Número de gerações anuais						15,46	

* Cálculo número de gerações/mês = graus dias x 30/graus dias x 2 (período de ovo-adulto + 3).

Observa-se que o número possível de gerações da mosca-dos-chifres sob as condições térmicas do clima megatérmico tropical chuvoso (Aw) é praticamente 50% superior ao do clima temperado úmido (Cw), o que pode influenciar diretamente no que refere-se ao estabelecimento e a fixação de populações de *H. irritans* resistentes aos pesticidas utilizados no controle das infestações nas diferentes regiões.

Resistência a pesticidas nas populações da mosca-dos-chifres

Em Rondônia, de acordo com os bioensaios e os ensaios moleculares para identificação da resistência a pesticidas piretroides realizados em 48 propriedades, evidencia-se a presença de populações de *H. irritans* com a presença das mutações KDR e SKDR, as quais conferem resistência a essa base pesticida. Nas populações de *H. irritans* avaliadas no Estado de São Paulo observou-se uma frequência inferior de mutações tipo KDR que a observada nas populações de Rondônia e não foi identificada a presença de mutações tipo SKDR (Figuras 8 e 9).

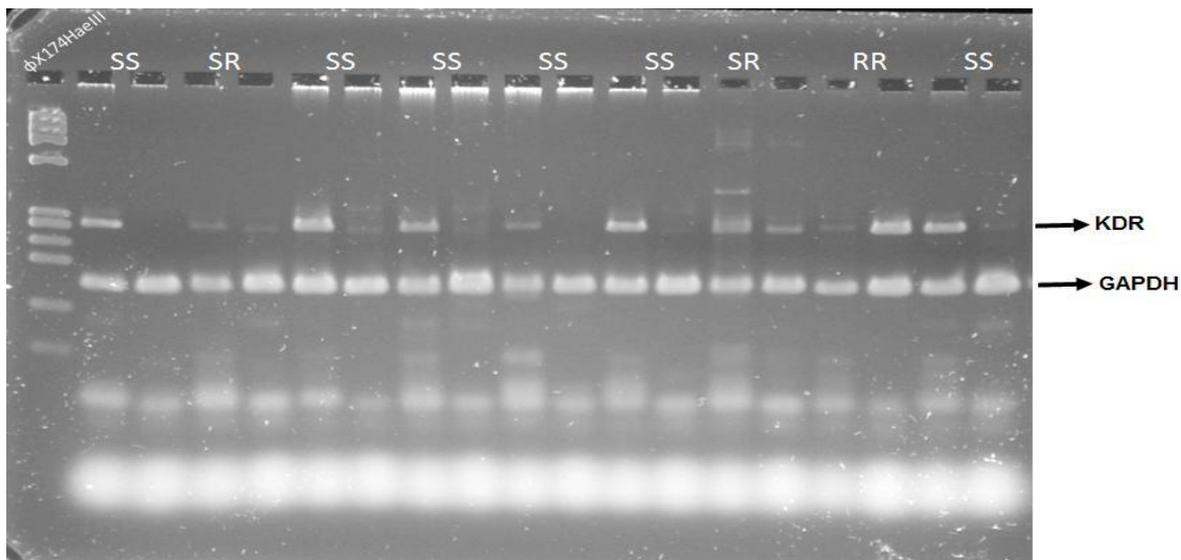


Figura 8. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo contendo os produtos de amplificação das amostras de DNA de moscas (*Haematobia irritans*) genotipadas para KDR, mutação que confere resistência aos pesticidas piretroides. Onde: ØX 174 Hae III= padrão de pares de bases; SS= amostras de moscas com genótipo para suscetibilidade; SR= amostras de moscas heterozigotas para a característica; RR= amostra de mosca com genótipo para resistência; KDR= indicação da banda com cerca de 285 pb que torna possível o diagnóstico da mutação; GAPDH(Gliceraldeído 3- fosfato dehidrogenase) *amplicon* com cerca de 154 pb usado como controle da reação de PCR.



Figura 9. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo com produtos de amplificação das amostras de DNA de *Haematobia irritans* genotipadas para a mutação tipo Super-KDR (74 pb), a qual confere uma super resistência aos pesticidas piretroides. Onde: Marcador 100pb= padrão de pares de bases; Controle SS= amostras de mosca com genótipo para suscetibilidade; RR= amostras de mosca com genótipo para resistência; GAPDH (Gliceraldeído 3- fosfato dehidrogenase) *amplicon* com cerca de 154 pb usado como controle da reação de PCR.

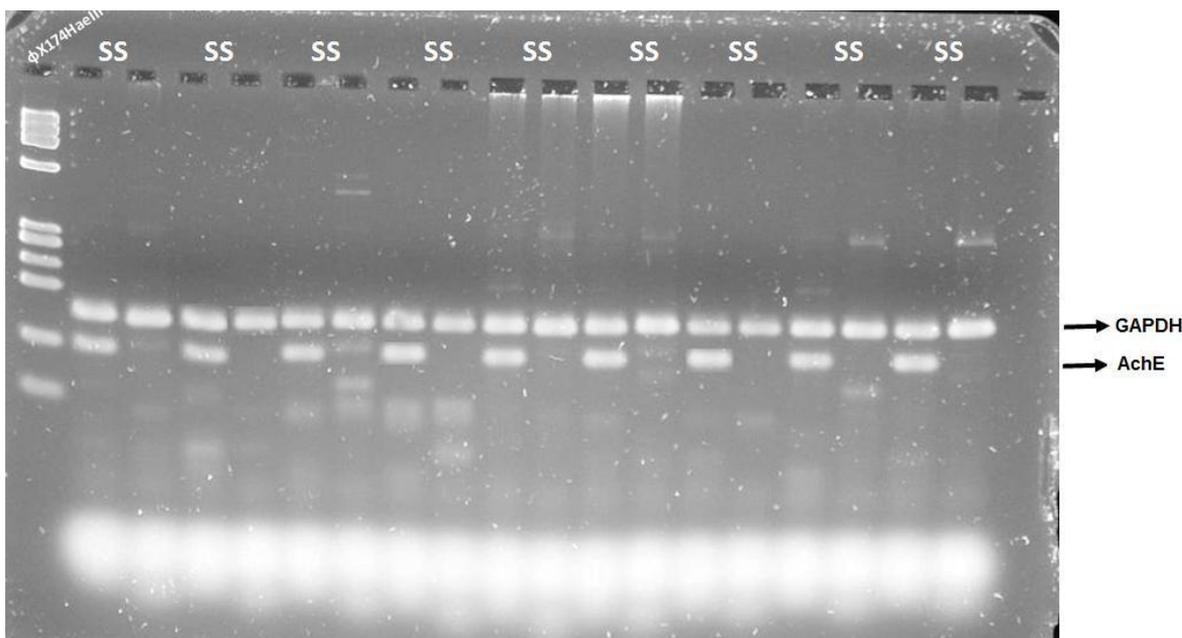


Figura 10- Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo contendo os produtos de amplificação das amostras de DNA de *Haematobia irritans* genotipadas para resistência a pesticidas organofosforados utilizando o gene que transcreve a enzima acetilcolinesterase (AChE). Onde: ØX 174 Hae III= padrão de pares de bases; SS= amostras de moscas com genótipo para suscetibilidade; AChE= indicação da banda com cerca de 115 pb que torna possível o diagnóstico da mutação; GAPDH (Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase) = banda com cerca de 154 pb usada como controle da reação.

Com base nos resultados obtidos permite-se afirmar que a maior pressão de seleção nas populações de campo da mosca-dos-chifres avaliadas está sendo exercida pelos pesticidas piretroides. A fim de se estimar o efeito médio da substituição gênica priorizou-se a avaliação da resistência a pesticidas piretroides, uma vez que não foram detectadas fenotipicamente ou genotipicamente a presença de populações resistentes aos pesticidas organofosforados.

Por meio da avaliação da frequência genotípica e alélica do gene KDR em populações da mosca-dos-chifres de Rondônia é possível afirmar que as populações avaliadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), ou seja, nenhum dos fatores que altera a frequência alélica, incluindo o efeito da seleção causada pela aplicação de inseticidas, não ocorreu de maneira significativa na geração anterior (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas do gene *kdr* em populações de moscas-dos-chifres no Estado de Rondônia

Localidades	Número de moscas	Frequências genotípicas			Frequências alélicas	
		SS	SR	RR	S	R
*MPVH _(observado)	568	0.61	0.36	0.03	0.79	0.21
MPVH _(esperado)		0.62	0.33	0.04		
χ^2		0,00	0,01	0,06	χ^2_{calc}	0,07
**MJIPA _(observado)	918	0.54	0.40	0.06	0.74	0.26
MJIPA _(esperado)		0.55	0.39	0.07		
χ^2		0,00	0,00	0,02	χ^2_{calc}	0,02

* MPVH – Microrregião de Porto Velho; ** Microrregião de Ji-Paraná

Observa-se que a frequência do alelo resistente (R) está positivamente associada ao fator de resistência, indicando que o componente genético é o fator mais importante de expressão desta característica e, a cada aumento de 10% na frequência do alelo resistente temos um aumento de 0,436 no FR da população (Figura 11).

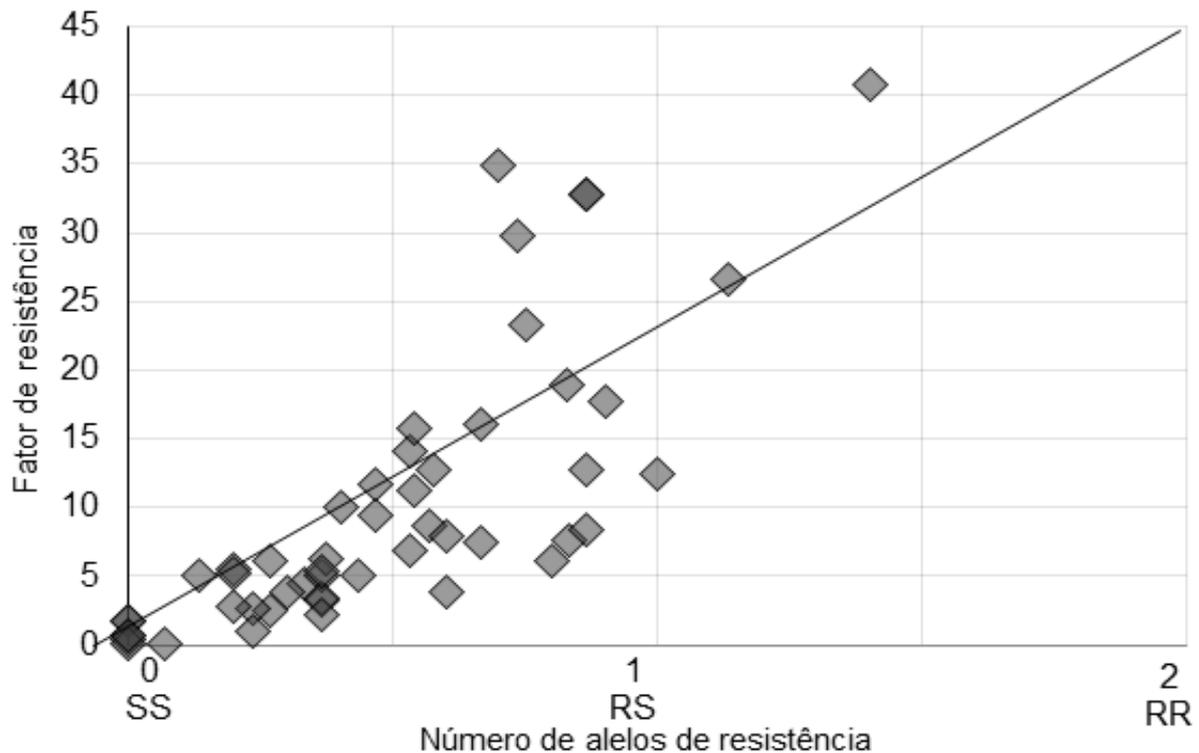


Figura 11. Dispersão do Fator de Resistência (FR) em função do número de alelos de resistência (R) presentes nas populações de *Haematobia irritans*, considerando que o homocigoto (SS) não apresenta genes de resistência, o heterocigoto RS apresenta um alelo resistente e o homocigoto RR apresenta dois alelos resistentes.

As análises genotípicas realizadas nas populações de moscas-dos-chifres avaliadas, nos permite afirmar que a frequência de genótipos kdr heterocigotos (SR) é de cerca de 39%, sendo ainda predominante a presença de genótipos kdr homocigotos sensíveis (SS), os quais apresentaram uma frequência de aproximadamente 56% e genótipos kdr homocigotos resistentes foram encontrados em 5% dos indivíduos genotipados.

A frequência de genótipos kdr homocigotos resistentes (RR) apresenta-se baixa considerando-se a totalidade das amostras genotipadas, porém em algumas populações com FR acima de 18 já se observa um aumento da frequência de indivíduos homocigotos resistentes com frequência de aproximadamente 11%, sendo que nestas populações foram encontrados 26 indivíduos com perfil genotípico super-kdr heterocigoto (SR) e 12 com perfil genotípico super-kdr homocigoto, sendo estes todos pertencentes a uma única população de *H. irritans*.

Em relação a resistência a pesticidas organofosforados observou-se pelo teste do papel filtro impregnado que a totalidade das populações não apresenta resistência a esta base pesticida, o que genotipicamente também se confirma, uma vez não se identificou a presença de mutações relacionadas a resistência ao pesticida em nenhuma das populações de *H. Irritans* avaliadas.

Fatores de risco relacionados à emergência da resistência a pesticidas em rebanhos bovinos

Buscando identificar e estudar os cenários probabilísticos que determinam a ocorrência e a fixação de alelos a resistência a pesticidas foi realizada uma análise por árvore de eventos com o objetivo de se determinar os fatores de risco associados ao estabelecimento da resistência a pesticidas nas populações de moscas-dos-chifres. Aspectos referentes ao uso de pesticidas nas propriedades, frequência de realização de tratamentos para o controle de ectoparasitas no rebanho, aptidão do rebanho e percepção do produtor quanto a época de maior ocorrência, são apresentados a seguir:

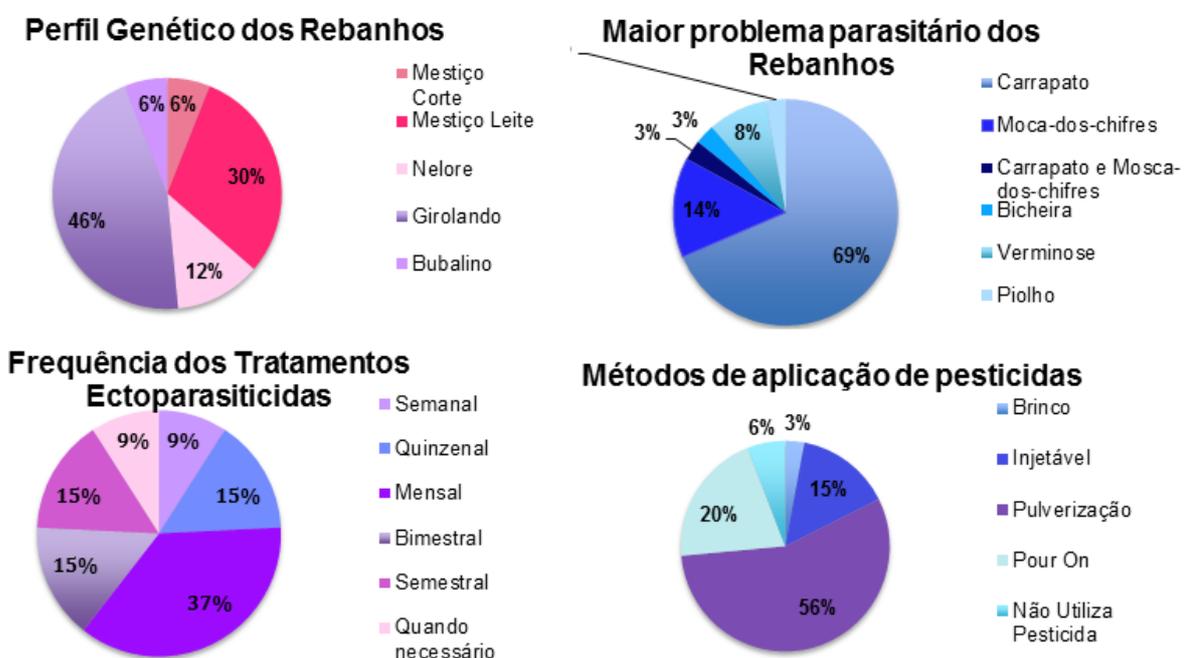


Figura 12. Representação gráfica dos resultados relacionados ao perfil genético, principais problemas parasitários, frequência de tratamentos e métodos de aplicação de pesticidas nos rebanhos aferidos através da aplicação dos questionários.

A análise dos resultados referente a frequência dos tratamentos pesticidas e o fator de resistência das populações de moscas-dos-chifres aos pesticidas piretroides e organofosforados nos permite inferir que a maior frequência na aplicação dos pesticidas determina a ocorrência de maiores fatores de resistência nas populações de *H. Irritans* relacionado aos pesticidas piretroides, possibilitando demonstrar que a presença da pressão de seleção por pesticidas piretroides está ocorrendo nestas populações (Figura 13).

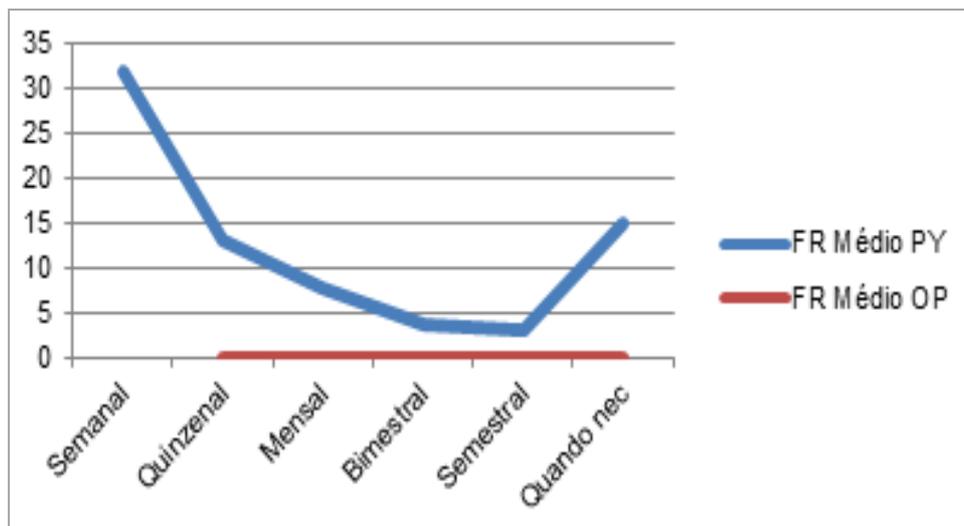
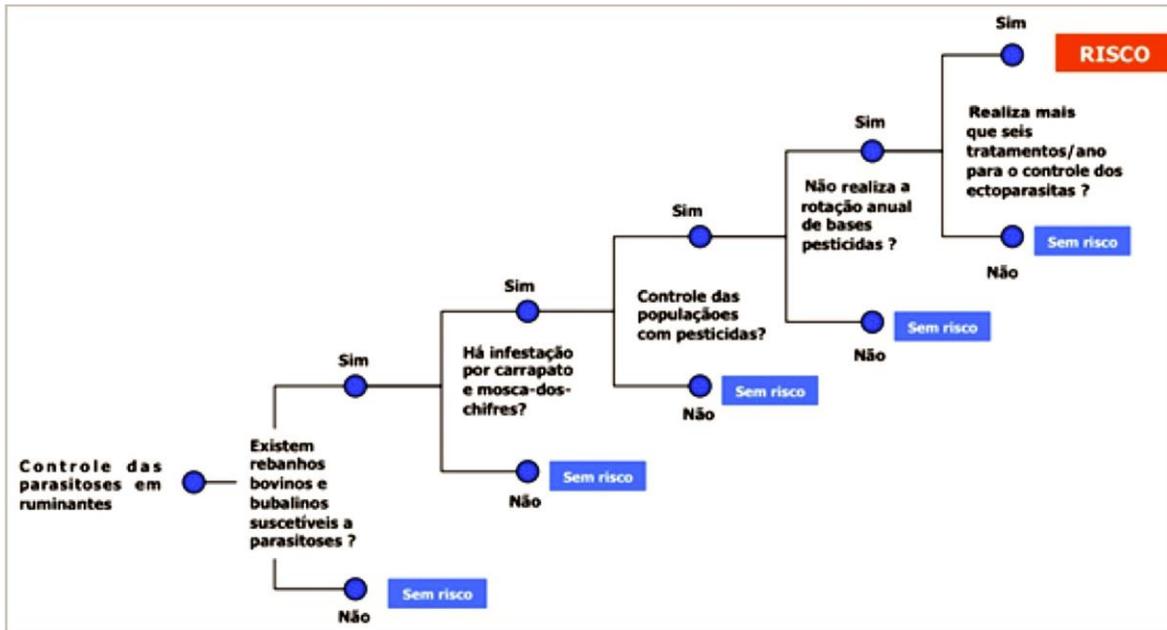


Figura 13. Fatores de resistência médios calculados para os pesticidas piretroides e organofosforados em relação a frequência de realização dos tratamentos direcionados ao controle das parasitoses nos rebanhos.

Analises qualitativas de risco referentes a emergência e a fixação da resistência a pesticidas foram realizadas a partir da análise dos questionários. A análise por árvore de cenários, método utilizado para se identificar as várias e possíveis consequências resultantes de evento inicial, nos permitiu evidenciar a presença do risco de estabelecimento da resistência a pesticidas nas populações de moscas-dos-chifres determinado pelo intensivo uso de pesticidas direcionado ao controle das populações de *R. microplus*.



Discussão

O padrão da intensidade da infestação por *H. irritans* observado nas duas regiões de estudo mostra bastante similaridade, apesar das condições climáticas e ambientais contrastantes, sendo também bastante similar a sazonalidade observada nos demais países da América do Sul (GUGLIELMONE et al., 2001; CASTRO et al., 2008; COSTA et al., 2014; SHOWLER et al., 2014).

O padrão da sazonalidade da mosca-dos-chifres observado nas regiões estudadas permite inferir um padrão sazonal geral das infestações da mosca-dos-chifres no Brasil, o qual é similar aos observados nesse estudo. Pode-se considerar que as maiores infestações de mosca-dos-chifres são observadas em condições e épocas definidas. Dois picos de infestações de mosca-dos-chifres tendem a ocorrer no Brasil: um ao final da primavera (março-abril), quando se inicia o período chuvoso e, outro no início do outono (setembro-outubro). Condições relacionadas ao aumento no número de dias de chuva como um fator desfavorável ao aumento das infestações de *H. irritans* foram também observadas por diversos autores que afirmam que uma grande quantidade de chuva em um curto espaço de tempo, faz com que ocorra a destruição das massas fecais nas pastagens, o que acaba por provocar a interrupção do ciclo evolutivo da mosca (HORNER et al., 1990; TORRES et al., 1992; BIANCHIN; ALVES, 1997; MACEDO et al., 2001)

As maiores infestações de moscas-dos-chifres sobre os animais observadas durante o período de transição climática, demonstra que condições ambientais não extremas de temperatura e pluviometria possibilitam um aumento na emergência de adultos, o qual resultará em aumento da infestação sobre os animais. A análise das variáveis climáticas observadas nesse estudo permite inferir que condições de pluviometria entre 190 mm/mês e 250 mm/mês, de temperatura média variável de 22 °C a 26 °C e um número de dias de chuva não superior a 16 dias/mês podem ser considerados como favoráveis ao aumento das populações de *H. irritans* nas áreas de produção pecuária tropicais localizadas entre as latitudes 23° 26'14"N e 23° 26'14"S, na qual está localizada grande parte do território brasileiro.

Durante o período de estudo da fase não parasitária da mosca-dos-chifres observou-se que as condições de temperatura e umidade foram favoráveis tanto ao desenvolvimento dos instares imaturos quanto à emergência dos adultos. Os valores observados para o desenvolvimento dos instares imaturos a 25 °C foram bem semelhantes ao descrito por Melvin e Beck (1931) que observaram um período de desenvolvimento embrionário, larval e pupal de 238 horas e 35 minutos (aproximadamente 9,9 dias) a 30 °C. Palmer et al. (1981) e Collares (1990) também constataram períodos de desenvolvimento de *H. irritans* de ovo a adulto superiores a nove dias e inferiores a dez dias, respectivamente, o que corroboram os resultados obtidos no presente estudo e demonstram a adaptação de *H. irritans* às condições climáticas predominantes nas áreas tropicais, as quais foram mantidas durante o período experimental e mantiveram-se dentro da faixa de 22 °C a 26 °C e 65%-90% de umidade descrita por Morgan (1964) como ótima para o desenvolvimento da espécie.

Wagner et al. (1984) já demonstraram a importância da predição da ocorrência sazonal de insetos direcionada pela elaboração de modelos matemáticos que descrevam as taxas de desenvolvimento em função da temperatura ambiente e as exigências térmicas de desenvolvimento da espécie. A utilização do modelo graus-dia utilizado no estudo permitiu prever o número possível de gerações anuais da mosca-dos-chifres em regiões climáticas brasileiras contrastantes, informação essa que pode ser incorporada às estratégias de manejo das bases pesticidas utilizadas para o controle da espécie de acordo com a sua dinâmica populacional local. A indicação de que na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul poderiam se estabelecer até cerca de 22 gerações anuais (BARROS, 2002) corresponde a um aumento de cerca de 32% no número de gerações observadas no clima Aw e de cerca de 55% no número de gerações de moscas-dos-chifres estimadas para o clima Cw.

Em relação a resistência a pesticidas piretroides e organofosforados em populações de *H. irritans*, os resultados obtidos possibilitam identificar elevados níveis de resistência fenotípica aos pesticidas piretroides nas populações avaliadas, tendo sido inclusive identificada a presença de alelos tipo SKDR que conferem alta resistência aos pesticidas piretroides em duas populações de *H. irritans* estabelecidas em Rondônia, sendo esses os primeiros diagnósticos da presença da mutação SKDR no Brasil. Diversas populações resistentes aos pesticidas piretroides têm sido identificadas em vários estados brasileiros, como os reportados por Braga e Barros (2003) em Roraima, Oliveira et al. (2006) nos Tabuleiros Costeiros de Alagoas, Sergipe e Bahia, Barros et al. (2007), Saueressig e Barros (2003) em Goiás, Tocantins e Distrito Federal e, Barros et al. (2013) o que é um indicativo da ineficiência desse grupo pesticida para o controle das infestações pela mosca-dos-chifres, uma vez que mecanismos metabólicos responsáveis pela resistência a essa base encontram-se já estabelecidos nas populações brasileiras de *H. irritans*.

Populações susceptíveis aos pesticidas organofosforados também foram reportadas em outros estados brasileiros nas regiões Sul (RS), Sudeste (ES, MG, RJ), Centro-Oeste (GO, DF, MS, MT) Nordeste (AL, BA, MA, PI, SE) e Norte (RR, TO), com a CL50 variando entre 0,1 e 1,2 µg/cm² (BARROS, et al. 2012). No Chile, Oyarzún et al. (2011) avaliaram oito rebanhos bovinos onde também foram encontradas populações com alta susceptibilidade à pesticidas organofosforados, sendo que em cinco todas as moscas morreram durante o bioensaio.

A alta susceptibilidade das populações de mosca-dos-chifres aos inseticidas organofosforados parece estar associada ao baixo uso de formulações que utilizam organofosforados como princípio ativo para o controle das populações dos ectoparasitas que infestam os bovinos, principalmente em rebanhos bovinos de corte. Entretanto, o uso de brincos impregnados com pesticidas organofosforados apresenta-se como uma tendência para o controle das infestações de *H. irritans* em Rondônia, o que pode ser observado durante a condução deste estudo.

Vale ressaltar que o uso contínuo de um princípio ativo como os organofosforados, que na atualidade mostram-se efetivos para o controle das populações, acaba por exercer uma pressão de seleção nas populações de parasitas, o que as tornam resistentes a base química, caso não sejam estabelecidos critérios e práticas de manejo para o controle parasitário e utilização dos pesticidas. Barros et al. (2001) realizaram estudo na Louisiana, EUA e, verificaram o

desenvolvimento da resistência ao diazinon em populações de moscas-dos-chifres após quatro anos de uso contínuo dessa base.

Conclusões

O fator climático de maior influência sobre a infestação de moscas-dos-chifres é o número de dias de chuvas. Meses de intensa pluviometria são desfavoráveis ao desenvolvimento dos instares imaturos de *H. irritans*. Aspectos relacionados a alterações físicas da massa fecal de bovídeos, tais como, a desagregação do bolo fecal promovida pelo impacto das gotas de chuva e o excessivo encharcamento das fezes, acabam por modificar esse microambiente fecal. Períodos chuvosos contínuos, os quais podemos considerar iguais ou superiores a 16 dias consecutivos de chuva, mostram-se prejudiciais à taxa de emergência de adultos nas fezes e implicaram diretamente sobre o nível de infestação observado nos animais.

Visando a manutenção das infestações de *H. irritans* abaixo do nível de dano econômico (NDE), estabelecido por Hogsette et al. (1991) em cerca de 200 moscas/bovino, não se recomenda a utilização de produtos comerciais inseticidas que utilizem mais que um grupo químico em sua composição. Tal recomendação de manejo de bases inseticidas visa resguardar as populações de moscas-dos-chifres da exposição a múltiplos grupos pesticidas. Tal recomendação busca evitar a múltipla pressão de seleção sobre as populações de *H. irritans* determinada por duas ou mais classes pesticidas simultaneamente. O aumento do FR das populações frente a diferentes bases pesticidas simultaneamente determina na perda da eficácia das mesmas em poucos anos. Visto que podemos considerar, que de uma forma geral, há a possibilidade da ocorrência de uma média de 12,5 gerações/ano da mosca-dos-chifres no Brasil, o correto manejo das bases pesticidas deve considerar que é desnecessária a realização de tratamentos direcionados ao controle das infestações de *H. irritans* durante os períodos com maior número de dias de chuva, os quais ocorrem nos meses de novembro a janeiro nas regiões que encontram-se sob os regimes de clima megatérmico tropical chuvoso e mesotérmico temperado úmido, assim como nas áreas de transição entre os mesmos.

O resultado da pressão de seleção determinada pelo uso de bases pesticidas é o aumento na frequência de mutações genotípicas relacionadas a resistência aos pesticidas. A emergência e a fixação da resistência a determinado grupo(s) pesticida(s) acontecerão muito mais rapidamente em regiões propícias ao desenvolvimento de um maior número de gerações anuais da mosca-dos-chifres. Por esse motivo e, aliado a capacidade de voo da espécie e a intensa mobilidade de bovinos decorrente do transporte para abate ou comercialização, regiões que encontram-se sob o domínio de condições climáticas megatérmicas e mesotérmicas devem evitar a utilização de bases pesticidas direcionadas ao controle das infestações pela mosca-dos-chifres em situações em que a infestação encontra-se no limite de NDE estabelecido para a espécie.

Tais recomendações visam também resguardar o aparecimento e a fixação da resistência aos pesticidas nas populações do carrapato dos bovinos, uma vez que, normalmente, a dose de ação inseticida recomendada é menor que a dose acaricida, o que expõem as populações do carrapato dos bovinos a subdoses do pesticida que acabam por desencadear processos metabólicos que selecionarão indivíduos mais resistentes às bases utilizadas.

Referências

- ALLEN, J. C. A modified sine wave method for calculation degree days. **Environmental Entomology**, College Park, v. 5, n. 3, p. 338-396, 1976.
- BARROS, A. T. B. Dynamics of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) infestation on nelore cattle in the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 445-450, 2001.
- BARROS, A. T. M.; OTTEA, J.; SANSON, D.; FOIL, L. D. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 243-256, 2001.

- BARROS, A. T. M. Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 217-221, 2002.
- BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, p. 109-110, 2004.
- BARROS, A. T. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. Insecticide susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 16, n. 3, p. 145-151, 2007.
- BARROS, A. T. M.; SAUERESSIG, T. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W.; FURLONG, J.; GIRÃO, E. S.; PINHEIRO, A. da C.; ALVES-BRANCO, F. de P. J.; SAPPER, M. de F. M.; BRAGA, R. M.; OLIVEIRA, A. A. Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 125-132, 2013.
- BIANCHIN, I.; ALVES, R.G. DE O. **Mosca-dos-chifres: comportamento e danos em bovinos nelores**. Campo Grande, MS: Embrapa CNPQC, 1997. 8p. (Embrapa-CNPQC. Comunicado Técnico, 55).
- BRAGA, R. M.; BARROS, A. T. M. **Avaliação da susceptibilidade da mosca dos chifres, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) a inseticida da classe dos organofosforados (diazinon) em Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima; 2004. 6 p. (Embrapa Roraima, Comunicado Técnico, n. 6). Available from: http://www.cpafr.embrapa.br/embrapa/attachments/788_cot00604_mosca_ramayana.pdf.
- BRITO, L. G.; SILVA NETTO, F. G. da; ROCHA, R. B. **Influência dos fatores climáticos na flutuação sazonal da mosca-do-chifre no município de Presidente Médici, Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007. 11 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 50).
- BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; De ROUEN, S. M.; KIMBALL, M. D.; MORRISON, D. G.; WYATT, W. E.; FOIL, L. D. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in horn fly (Diptera: Muscidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 125-135, 1999.
- CANNON, R. M. Sense and sensitivity – designing surveys based on an imperfect test. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 49, n. 3-4, p. 141-163, 2001.
- CASTRO, E.; GIL, A.; PIAGGIO, J.; CHIFFLET, L.; FARIAS, N. A.; SOLARI, M. A.; MOON, R. D. Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 151, n. 2-4, p. 286-299, 2008.
- CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; CALURA, F. H.; FERRENZINI, J.; FORIM, M. R.; BARROS, A. T. M. Efficacy evaluation of a commercial nem cake for control of *Haematobia irritans* on Nelore cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 217-221, 2010.
- CHAMBERLAIN, W. F. Dispersal of horn flies: 3. Effect of environmental factors. **The Southwestern Entomologist**. Weslaco, v. 9, n. 1, p. 73-78, 1984.
- COLLARES, N.C.P. **Alguns aspectos etológicos da *Haematobia irritans* em Roraima**. 1990. 65 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1990.
- COSTA, M. S. F.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, W. S.; COSTA, A. J. F.; FACURY FILHO, E. J.; ARAÚJO, R. N. Seasonal Variation and Frequency Distribution of Ectoparasites in Crossbreed Cattle in Southeastern Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, Article ID 759854, 2014.
- CRUZ-VÁZQUEZ, C.; HERNÁNDEZ, J. B.; MENDOZA, I. V.; PARRA, M. R.; MARTINEZ, M. T. Q.; VÁZQUEZ, Z. G. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. **Veterinaria México**, México, v. 31, n. 3, p. 195-199, 2000.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 390p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, v.1, 480 p., 2004.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4.ed. Viçosa: UFV, v.1, 514p., 2012.
- FALCONER, D. S. **Quantitative genetics in Edinburgh: 1947–1980**. *Genetics* **133**:137–142, 1993.
- FAO (Roma). **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. 77p.
- FOIL, L. D.; GUERRERO, F.; ALISON, M. W.; KIMBALL, M. D. Association of the kdr and superkdr sodium channel mutations with resistance to pyrethroids in Louisiana populations of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 149–158, 2005.
- FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A. Genetics analysis of the infestation of females of Caracu cattle breed by horn fly (*Haematobia irritans*) (L.) (diptera, Muscidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 2, p. 242-247, 2005.

- GARCIA, C. A.; COVARRUVIAS, A. C.; FLORES, A. V.; VAZQUEZ, Z. G.; KUNZ, S.; LEDESMA, A. M. Horn fly (*Haematobia irritans*) resistance to cypermethrin and diazinon in the state of Tamaulipas, Mexico: current situation. **Veterinaria México**, v. 35, n. 3, p. 237–244, 2004.
- GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 27, n. 8-9, p. 745-755, 1997.
- GUERRERO, F. D.; KUNZ, S. E.; KAMMLAH, D. Screening of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance-associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assay. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 710-715, 1998.
- GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H.; KUNZ, S. E.; KAMMLAH, D. M. Esterase profiles of diazinon susceptible and resistant horn flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, n. 2, p. 286–292, 1999.
- HOELSCHER, C. E. Horn fly control options: a total herd health plan. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 22, p. 585–587, 2000.
- HOELSCHER, C. E.; COMBS JUNIOR, R. The horn fly. I. Seasonal incidence of diapause in Mississippi. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 64, p. 256-259, 1971.
- HOGSETTE, J. A.; PRICHARD, D. L.; RUFF, J. P. Economic effects of horn fly (Diptera: Muscidae) populations on beef cattle exposed to three pesticide treatment regimes. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 84, n. 4, p. 1270-1274, 1991.
- IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?t=2&z=t&o=1&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u8=1&u9=1&u10=1&u11=1&u12=3&u13=1&u14=26674&u15=1&u16=1>>. Acesso em: 5 out. 2012.
- KAUFMAN, P. E.; LLOYD, J. E.; KUMAR, R.; LYSYK, T. J. Horn fly susceptibility to diazinon, fenthion, and permethrin at selected elevations in Wyoming. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, Clemson, v. 16, n. 2, p. 129–139, 1999.
- KUNZ, S. E.; BLUME, R. R.; HOGAN, B. F.; MATTER, J. J. Biological and ecological investigations of horn flies in central Texas: influence of time of manure deposition on oviposition. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 63, n. 3, p. 930-933, 1970.
- KUNZ, S. E. Horn fly production as affected by seasonal changes in rangeland forage conditions. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 5, n. 2, p. 80-83, 1980.
- KUNZ, S. E.; ESTRADA, M. O.; SANCHEZ, H. F. Status of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in northeastern Mexico. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 726–729, 1995.
- LI, A. Y.; GUERRERO, F. D.; ALMAZAN, C. A.; GEORGE, J. E. Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a multiplex polymerase chain reaction assay to detect resistance alleles in the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v. 40, n. 6, p. 942–949, 2003.
- LYSYK, T. J. Simulating development of immature horn flies, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), in Alberta. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 5, p. 841-851, 1992.
- LYSYK, T. J.; MOON, R. D. Diapause induction in the horn fly (Diptera: Muscidae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 126, n. 4, p. 949-959, 1994.
- MACEDO, D. M.; BRITO, L. G.; MOYA BORJA, G. E. Emergência *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) em fezes bovinas no Município de Seropédica, RJ, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 77-80, 2001.
- McKENZIE, C. L.; BYFORD, R. L. Continuous, alternating, and mixed insecticides affect development of resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). **Journal of economic entomology, England**, v. 86, n. 4, p. 1040-1048, 1993.
- MELVIN, R.; BECK, D. E. Length of the developmental stages of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) at constant temperatures. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 24, n. 1, p. 330-331, 1931.
- MORGAN, N. O. Autecology of the adult horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Ecology**, Tempe, v. 45, n. 4, p. 728-736, 1964.
- OLIVEIRA, A. A.; AZEVEDO, H. C.; MELO, C. B.; BARROS, A. T. M. Suscetibilidade da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) a inseticidas nos tabuleiros costeiros de Alagoas, Bahia e Sergipe. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n. 2, p. 65-70, 2006.
- OYARZÚN, M. P.; LI, A. Y.; FIGUEROA, C. G. High levels of insecticide resistance in introduced horn fly (Diptera: Muscidae) populations and implications for Management. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 104, n. 1, p. 258-265, 2011.
- PALMER, W. A.; BAY, D. E.; SHARPE, P. J. H. Influence of temperature on the development and survival of the immature stage of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Protection Ecology**, Amsterdam, v. 3, p. 299-309, 1981.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.
- SAS Institute, 2002–2003. SAS/INSIGHT User's Guide, version 9.1.3, version for Windows. SAS Institute, Cary, NC, USA.

SHEPPARD, D. C.; HINKLE, N. C. Field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 4, n. 1, p. 87-89, 1987.

SHOWLER, A. T.; OSBRINK, W. L. A.; LOHMEYER, K. H. Horn Fly, *Haematobia irritans irritans* (L.), Overwintering. **International Journal of Insect Science**, v. 6, p. 43-47, 2014.

SAUERESSIG, T. M.; BARROS, A.T. **Diagnóstico da susceptibilidade de populações da mosca-dos-chifres a inseticidas em Goiás Tocantins e Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados; 2003. 16 p. (Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 82). Available from: www.cpac.embrapa.br/baixar/90/t.

TORRES, P. R.; ABRAHAMOVICH, A. H.; ROMANO, A.. Estudio de la eficacia de la Ciflutrina "Pour on" contra *Haematobia irritans* (L. 1758) (Diptera: Muscidae) en bovinos bajo condiciones de pastoreo en el norte de la provincia de Santa Fe (Argentina). *Veterinaria Argentina*, v. 86, p. 394-398, 1992..

WAGNER, T. L.; WU, H.; SHARPE, P. J. H.; SCHOOLFIELD, R. M.; COULSON, R. N. Modeling insect development rates: a literature review and application of a biophysical model. *Annals of the entomological society of America*, v. 77, n. 2, p. 208-220., 1984.

YONEZAMA, K.; ISHII, T.; YANO, K. Definition of the Probability Efficiency Index for Optimization of the Stepwise Yield Selection Procedures of Plant Varieties. **Biometrics**, Washington, n. 56, n. 4, p.1213-1217, 2000.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7: 203-214, 2000.

Embrapa

Rondônia