

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE INGENIERIA, CIENCIAS Y ADMINISTRACION

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES

INSTITUTO DE AGROINDUSTRIA



SEMIOQUÍMICOS QUE MEDIAN LA RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDERO ENTRE LA MOSCA DE LOS CUERNOS (*Haematobia irritans*) Y EL GANADO BOVINO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES**

MARIA PAZ OYARZUN GAJARDO

TEMUCO-CHILE

2008

SEMIOQUÍMICOS QUE MEDIAN LA RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDERO ENTRE LA MOSCA DE LOS CUERNOS (*Haematobia irritans*) Y EL GANADO BOVINO

Esta tesis es presentada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. ANDRES QUIROZ CORTEZ, del Departamento de Ciencias Químicas para su aprobación por la comisión.

MARIA PAZ OYARZUN GAJARDO

DIRECTOR PROGRAMA
DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE
RECURSOS NATURALES

Dr. ANDRES QUIROZ

DIRECCIÓN DE POSTGRADO
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Dr. CHRISTIAN FIGUEROA

Dr. EDUARDO FUENTES

Dr. RAMON REBOLLEDO

Dr. FERNANDO ROMERO

A mi hijo Martín

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a mi tutor, Dr. Andrés Quiroz, y al grupo de Ecología Química, por su apoyo y colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

También agradezco al proyecto DIUFRO160604 por el financiamiento de la tesis; al Proyecto UFRO309 por el financiamiento de la estadía de investigación; y a la Universidad de La Frontera por las becas de mantención y arancel. Agradezco además, a Dillman Boero y Jorge Sáez, de la Estación Experimental Maquehue, por la colaboración prestada en las actividades de campo.

Mis sinceros y profundos agradecimientos a Evelyn, Emilio y Marcelo por su inestimable y valiosa ayuda en el trabajo de terreno y a mis compañeros y amigos, Rubén y Anita, por ayudarme siempre con tan buena disposición en el desarrollo de mi tesis.

Quiero expresar mi gratitud a los amigos y compañeros de Postgrado que hicieron más acogedora y amena la jornada. Un especial recuerdo para Bárbara, Gabriela y Paulina, quienes llegaron a convertirse más que en amigas, en parte de mi familia.

Deseo expresar también mi agradecimiento a todos aquellos que ayudaron de una u otra forma al desarrollo de esta investigación: a mi tío Hernán y a Juan Pablo, porque me incentivaron a tomar este desafío y a mi amiga Danai por ser un constante apoyo en los momentos más difíciles.

Finalmente agradezco a mis padres, y mis hermanos, cuyo amor incondicional permitió que llegara a la meta.

RESUMEN

La mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), causa importantes pérdidas a la producción animal. Debido a las dificultades asociadas al desarrollo de resistencia a los insecticidas por parte de esta plaga, el desarrollo de trampas con compuestos químicos atrayentes o repelentes, podría constituir un método alternativo para su control.

En la presente investigación se estudió la relación química entre este parásito y su hospedero bovino, para lo cual se evaluó la respuesta de *H. irritans* a volátiles emitidos por vaquillas Holstein Friesian con diferente carga-mosca. El análisis de olores emitidos por los animales , mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM), identificó algunas metilcetonas y otros compuestos como *m*- y *p*-cresol y 6-metil-5-hepten-2-ona, entre otros. Posteriormente, las propiedades semioquímicas de estos compuestos fueron evaluadas mediante técnicas de electroantenografía, olfatometrías en tubo-Y, y ensayos de campo. Adicionalmente, se realizaron experimentos destinados a la identificación de odorant-binding proteins (OBPs) en *H. irritans*. En los bioensayos de laboratorio, 2-decanona fue identificada como repelente, mientras que 2-undecanona, 1-octen-3-ol y *m*- y *p*- cresol fueron identificados como atrayentes. De esta manera, se reporta el descubrimiento de dos nuevos semioquímicos, 2-decanona y 2-undecanona, para la mosca de los cuernos. En los ensayos de campo, *m*- y *p*- cresol, disminuyeron el número de insectos presente sobre el rebaño, demostrando que es posible utilizar métodos de control basados en semioquímicos derivados del hospedero para controlar la mosca de los cuernos. La presencia de proteínas del tipo OBPs en muestras de antena, confirma la utilización de las señales odoríferas por parte de *H. irritans*, y abre un nuevo campo en las investigaciones ligadas al control de este insecto.

Los resultados aquí presentados contribuyen de manera importante a las investigaciones futuras a realizar en *H. irritans*. Los semioquímicos informados entregan información relevante en el campo de la química ecológica, tanto para aumentar el conocimiento de los factores relacionados al proceso de búsqueda y selección de hospedero de la mosca de los cuernos, como por su posible aplicación en el desarrollo de métodos de control alternativos enfocados a la interrupción de este proceso

SUMMARY

The horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), causes important economic damage to the cattle industry. Because the horn fly is becoming increasingly resistant to insecticides, odor-based fly traps may provide an alternative method for pest control.

In this work, the chemical relationship of the horn fly and cattle was studied. We evaluated the response of *H. irritans* to odors emitted by Holstein Friesian heifers with different individual horn fly loads. The analysis of host-odors revealed a number of volatile 2-ketoalkanes and other compounds such as *m* and *p*- cresol and 6-methyl-5-hepten-2-one among others, were identified from the gas chromatograph profiles of odor samples taken from cattle attracting both above and below average fly loads. The semiochemical properties of these compounds were then investigated further in laboratory through electrophysiology, behavioral bioassays in a Y-tube olfactometer and field assays. Additionally, experiments leading to identification of odorant-binding proteins (OBPs) in *H. irritans* were carried out. Based on the behavioral data, 2-decanone was identified as a repellent, while 2-undecanone, 1-octen-3- ol, *m*- and *p*-cresol were identified as attractants. Thus, this is the first report of the discovery of two new semiochemicals, 2-decanone and 2-undecanone, for *H. irritans*. In the field, *m* and *p*-cresol reduced the horn fly population present on the herd, showing that semiochemicals host-derived could be used for horn fly controlling. The presence of OBPs likely proteins in the antenna, confirm the utilization of olfactory cues by *H. irritans* and offer a new approach for research of horn fly controlling.

The result here reported are relevant for future research on *H. irritans*. This new semiochemicals add new information to the fully understanding not only of the host selection process of the horn fly but also for its possible application for developing new odor-based control methods.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes generales.....	1
1.2.	Hipótesis.....	4
1.3	Objetivos.....	4
1.3.1	Objetivo general.....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
2	REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	<i>Haematobia irritans</i> : biología y ciclo de vida.....	5
2.2	Impacto económico.....	7
2.3	Control y resistencia de <i>H. irritans</i> a los insecticidas	10
2.4	Métodos alternativos de control.....	13
2.5	Relación parásito-hospedero entre <i>H. irritans</i> y el ganado bovino.....	15
2.6	Semioquímicos y futuros métodos de control.....	16
2.6.1	Proteínas que enlazan olores (odorant-binding proteins, OBPs).....	18
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1.	Descripción del área de estudio.....	20
3.2.	Animales.....	20
3.3.	Censo.....	21
3.4.	Insectos.....	22
3.5.	Análisis de volátiles.....	23
3.5.1	Captura de volátiles por método headspace.....	23
3.5.2.	Cromatografía gaseosa (CG)	24
3.5.2.	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)...	24
3.6.	Electroantenografía.....	24
3.7.	Bioensayos olfatométricos.....	25
3.7.1.	Olfatómetro de tubo Y.....	25
3.7.2	Procedimiento experimental.....	26
3.8	Estándares químicos.....	27
3.9	Ensayos de campo.....	27
3.9.1.	Procedimiento.....	27

3.9.2	Dispositivos de liberación lenta.....	28
3.10.	Determinación de OBP.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Identificación de animales AC y BC.....	30
4.2.	Identificación de compuestos volátiles.....	36
4.3	Electroantenografía (EAG)	40
4.4.	Bioensayos olfatométricos.....	41
4.5.	Experimentos de campo.....	44
4.6.	OBPs.....	45
5	DISCUSIÓN.....	46
5.1.	Distribución de <i>H. irritans</i> sobre el rebaño.....	46
5.2.	Identificación de compuestos volátiles.....	47
5.3.	EAG.....	49
5.4.	Olfatometrías.....	50
5.5	Ensayos de campo.....	52
5.6	OBPs.....	54
5.7	Preferencia por el hospedero.....	55
6	PROYECCIONES.....	58
7	CONCLUSIONES	59
8	REFERENCIAS.....	62
9	ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>H. irritans</i> en rebaño Holstein Friesian temporada 2005-2006 (Rebaño A).....	31
Figura 2. Distribución de <i>H. irritans</i> en rebaño Holstein Friesian temporada 2006-2007 (Rebaño B)	32
Figura 3. Distribución de <i>H. irritans</i> en rebaño Holstein Friesian temporada 2007-2008 (Rebaño C)	33
Figura 4. Persistencia de posición en el ranking elaborado según carga-mosca individual de 3 individuos de BC (V3404 V8104 y V6904) y 3 de AC (V5804, V2304 y V1404) del rebaño A.....	35
Figura 5. Correlación entre población de <i>H. irritans</i> y temperatura ambiental.....	36
Figura 6. Perfil de volátiles emitidos por animales Holstein Friesian de AC y BC del rebaño A.....	38
Figura 7. Respuesta electrofisiológica de antenas de <i>Musca domestica</i> a distintos compuestos identificados en el olor de vaquillas Holstein-Friesian.....	40
Figura 8. Proteínas solubles de <i>H. irritans</i> separadas en un PAGE nativo 15%, teñido con azul de Coomasie.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Incremento en el peso total de terneros (PTT), y ganancia de ganancia diaria de peso (GDP) de ganado tratado contra <i>Haematobia irritans</i> comparado con ganado no tratado.....	9
Tabla 2.	Promedio número de <i>Haematobia irritans</i> en animales de extremos del ranking carga-mosca en rebaños Holstein Friesian.....	34
Tabla 3.	Compuestos identificados en los extractos de volátiles de vaquillas Holstein Friesian del rebaño A.....	39
Tabla 4	Respuesta de <i>Haematobia irritans</i> a compuestos idénticos a los identificados en el perfil de volátiles de animales AC y BC, y a extractos puros.....	43
Tabla 5	Efecto de tratamiento con distintos compuestos sobre la población de <i>Haematobia irritans</i> en distintos rebaños.....	44

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

El presente estudio se enmarca dentro de las investigaciones conducentes a esclarecer el aspecto ecológico-químico que media la relación entre el ganado bovino y *Haematobia irritans*, la mosca de los cuernos, ectoparásito que tiene gran incidencia en la pérdida de productividad en la ganadería de leche y carne en Chile.

La mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* Linneaus (Diptera: Muscidae), es un insecto hematófago del ganado bovino (Byford et al. 1992) que tiene amplia difusión a nivel mundial (Cupp et al. 2004) y que fue introducido en Chile en 1993 (Campano y Avalos 1994).

El impacto económico que produce la infestación masiva por la mosca de los cuernos, viene dado básicamente por una menor entrada y una mayor salida energética en el sistema pradera-animal. Esto se traduce en disminución en la ganancia de peso y en la producción de leche, disminución de la libido y mayor susceptibilidad a riesgos sanitarios (Velasco et al. 2001).

Un infestación mayor a 200 moscas por animal, puede producir una disminución de ganancia de peso corporal en un rango que varía entre un 4 a 20% (Haufe 1982, DeRouen et al. 2003); mientras que puede reducir su producción de leche en un 4 a 12% aproximadamente (Guglielmone et al. 1998a). Se ha estimado que sólo en Estados Unidos la mosca de los cuernos es responsable de producir pérdidas económicas por sobre los US \$730 millones anuales (Byford et al. 1992). La industria peletera también sufre importantes pérdidas económicas a causa de la disminución de la calidad de los cueros. En Uruguay se registraron pérdidas por US \$3.5 millones

por cada millón de cueros industrializados (Vanzini et al. 1997). En Chile, Velasco et al. (2001), calcularon el costo potencial mínimo de la infestación por mosca de los cuernos, aplicando una disminución de un 3% en la producción de carne y 4% en la producción de leche, lo que dio como resultado un costo anual de US \$24,5 millones para el sector ganadero.

En Chile, el control de este parásito se ejerce principalmente en base a insecticidas del tipo piretroides, los cuales son aplicados rutinariamente cuando la infestación es masiva. Desafortunadamente, su excesiva utilización ha provocado el desarrollo de resistencia de *H. irritans* a estos compuestos, disminuyendo la eficiencia del control. Algunos estudios han demostrado una reducción en el período de protección de permetrina 10% (Schwabe 2002) y cipermetrina 6% y 15% cuando son aplicados en forma epicutánea (Zaramati 2002). En la actualidad, los productores han comenzado a aplicar insecticidas organofosforados tales como ethion y diazinon en forma de aretes impregnados, sin embargo, ya hay informes de disminución del período de protección (Sievers, com. pers.)¹.

El desarrollo de resistencia a los insecticidas ha derivado en la búsqueda y experimentación con métodos alternativos de control tales como trampas mecánicas, controladores biológicos y selección de animales resistentes. La utilización de trampas y controladores biológicos han tenido resultados exitosos en algunos países como Australia, mientras que en otros los resultados han sido poco alentadores. En Chile, se demostró que la eficiencia de una trampa mecánica es comparable a los tratamientos con insecticidas, pero con un costo muy superior, lo que ha desincentivado su utilización por partes de los ganaderos (Xavier 2003).

¹ Dr. Gerold Sievers, 2008. Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. Comunicación personal.

La selección de animales resistentes se basa en la explotación de la atracción diferencial interespecífica e intraespecífica de los hospederos, es decir, de la existencia de razas que son menos atrayentes para la mosca, y dentro de ellas, individuos que son menos atrayentes para la mosca de los cuernos, siendo este rasgo de moderada heredabilidad. Sin embargo, aún no se ha podido establecer con exactitud cuáles son los factores que otorgan esta resistencia y en qué medida, lo cual hace engorrosa la identificación precisa de los individuos menos atrayentes.

La variabilidad de los resultados obtenidos con la experimentación de métodos alternativos para el control de *H. irritans*, se explica en gran parte por la falta de información relacionada con los aspectos específicos de su relación con su hospedero. Según la FAO (2003), esta información es imprescindible para el diseño de métodos alternativos de control que sean eficientes.

Estudios recientes demuestran la factibilidad de desarrollar un método de control etológico basado en la utilización de compuestos semioquímicos naturalmente emitidos por el hospedero que actuarían como atrayentes o repelentes para la mosca (Birkett et al. 2004). Sin embargo, debido a los resultados inconsistentes encontrados en diversas investigaciones en cuanto a cuáles son en definitiva los factores propios del hospedero que influyen en su selección, queda planteada la interrogante acerca del rol que cumplirían los compuestos semioquímicos en la selección de hospedero y la naturaleza de los compuestos. Hasta ahora no existen investigaciones que tengan como objetivo esclarecer la discusión al respecto.

1.2 Hipótesis

La interacción parásito-hospedero entre *Haematobia irritans* y el ganado bovino es mediada por compuestos del tipo kairomonas y alomonas que son utilizados por la mosca en la localización y selección del hospedero bovino, influyendo en su distribución sobre el rebaño.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Aislar, identificar y caracterizar las kairomonas y alomonas que median la localización del hospedero en la relación parásito-hospedero entre *Haematobia irritans* y el ganado bovino.

1.3.2 Objetivos específicos

- i. Identificar los compuestos que difieran cuantitativa o cualitativamente en los perfiles de volátiles provenientes de animales con mayor y menor carga-mosca.
- ii. Evaluar los extractos puros en bioensayos olfatométricos en poblaciones de *H. irritans* provenientes de animales con mayor y menor carga-mosca.
- iii. Evaluar la actividad olfatométrica de los compuestos diferenciales puros en poblaciones de *H. irritans*.
- iv. Evaluar el efecto de los compuestos diferenciales puros en el comportamiento de *H. irritans* en ensayos de campo.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Haematobia irritans*: biología y ciclo de vida

La especie *Haematobia irritans* posee 2 subespecies: *H. irritans irritans* Linneaus, 1758, la mosca de los cuernos propiamente tal, distribuida en Europa y América; y *H. irritans exigua* De Meijere, 1903 o “the buffalo fly”, distribuida en Australia y Malasia (Xavier 2003). El insecto adulto mide aproximadamente 2-5 mm y es de color gris oscuro, su cabeza está provista de un par de ojos grandes de coloración rojiza. Posee un par de antenas cortas en las que se encuentran los órganos sensoriales olfatorios y un aparato bucal o prosbólide adaptado para perforar la piel y succionar sangre (Cicchino et al. 1983). Los ojos son más grandes en los machos y se encuentran más juntos que en las hembras, mientras que el post-abdomen en los machos se encuentra replegado sobre si mismo, además, a nivel del tarso III, los machos poseen setas que no están presentes en las hembras (Xavier 2003).

El ciclo biológico de *H. irritans* comienza cuando los huevos son depositados en heces bovinas frescas para eclosionar después de 20-24 h a primer estadio, el que luego mudará a segundo y tercer estadio y luego a pupa. El desarrollo desde huevo a pupa toma entre 6-8 días, dependiendo de las condiciones de temperatura (Foil y Hogsette 1994). En total, el período que transcurre entre el estado de huevo al estado de imago es de aproximadamente entre 9 a 12 días en verano y 45 días en los meses más fríos (Kramm 2000, Xavier 2003), ya que la duración del período de desarrollo tiene correlación positiva con la temperatura (Lysyk 1992). El insecto adulto puede vivir entre 2-7 semanas. En Chile, se le puede ver entre los meses de Noviembre a Mayo (Kramm 2000, Xavier 2003), período durante el cual permanece la mayor parte del tiempo sobre el hospedero (Kunz et al. 1984). Durante el resto del año, el insecto permanece bajo el suelo en

estado de pupa, paraemerger en la primavera. La cópula se realiza sobre el hospedador desde el segundo día de vida y el macho es capaz de inseminar hasta 8 hembras, mientras que la hembra se aparea sólo una vez (Harris et al. 1968). Luego de transcurridas 24 horas desde la cópula, las hembras abandonan su hospedero para realizar la oviposición en materia fecal bovina recién excretada, en la cual se desarrollarán los distintos estados larvales del insecto (Kuramochi 2000). En promedio, una hembra puede poner hasta 200 huevos en toda su vida (Foil y Hogsette 1994).

Una vez emergido, el adulto debe encontrar su hospedero en un tiempo máximo de 26 horas, ya que no sobreviven más tiempo sin alimentarse (Lysyk et al. 1999). El hospedero específico de *H. irritans* es el bovino, aunque ocasionalmente también puede parasitar equinos y otros animales domésticos (Kuramochi 2000). En el animal, la mosca se ubica preferentemente en la zona de la cruz y el dorso, aunque también se puede localizar en los flancos y zona ventral, dependiendo del momento del día y condiciones climáticas (Lysyk 2000). Su posición característica es posada cabeza abajo con las alas abiertas en un ángulo de 60° cuando están en reposo y replegadas cuando se alimentan (Xavier 2003), siendo común encontrar animales con cientos de moscas sobre su cuerpo (Velasco et al. 2001).

La picadura de *H. irritans* puede extenderse por 10-25 minutos, tiempo en el cual introduce y retira su proboscis en el mismo punto repetidas veces, a manera de bombeo. Si se tiene en cuenta que un solo insecto puede picar entre 30-35 veces por día (Artigas 1994), un animal infestado con 500 moscas, podría perder hasta 7 ml de sangre al día (Xavier 2003).

Además de los efectos indirectos en la producción ganadera, se ha indicado que *H. irritans* puede ocasionalmente actuar como vector de algunas enfermedades importantes para los animales y el

ser humano, aunque sólo se ha confirmado su papel como vector de *Staphylococcus aureus*, uno de los agentes causantes de la mastitis bovina (Gillespie et al. 1999), *Stephanofilaria* sp., causante de la dermatitis parasitaria del ganado y *Dermatobia hominis*, responsable de la miasis cutánea forunculosa o forunculoide en el hombre (Leite et al. 1998).

La dispersión de *H. irritans* se efectúa por el traslado de animales y por migración espontánea, ya que tiene el potencial de infestar rebaños ubicados a más de 8 Km. (Kunz et al. 1983). Su erradicación es casi imposible, por lo que sólo ha sido factible mantenerla bajo control, principalmente en base a insecticidas (Velasco et al. 2001).

2.2 Impacto económico

La pérdidas económicas en sistemas de producción ganadera se producen a consecuencia de la extrema irritación y molestia generada por la picada de *H. irritans*, lo cual conduce a la reducción de ganancia de peso, producción de leche y eficiencia de alimentación (Byford et al. 1992). Aunque no hay consenso acerca de qué nivel de infestación comienza a ser perjudicial para la producción, se ha establecido que 200 insectos por animal es el umbral de daño económico para la mosca de los cuernos (Haufe 1979, Kunz et al. 1984, Schreiber et al. 1987).

El impacto de la picadura de la mosca de los cuernos en la reducción de ganancia de peso en el ganado de carne ha sido ampliamente estudiado, sin embargo dado que la cuantificación del daño no es un objetivo fácil de alcanzar, los resultados al respecto son contradictorios. Estudios realizados en sistemas vaca-ternero de animales tratados versus no tratados, han demostrado mínimo o ningún incremento en el peso en los terneros (Schreiber et al. 1987, Sanson et al. 2003), aún cuando los niveles de infestación estuvieran sobre el umbral económico (Hogsette et

al. 1991, Foil y Hogsette 1994). Por el contrario, otros estudios han demostrado ventajas significativas de ganancia de peso en animales tratados contra la mosca de los cuernos, tanto para sistemas vaca-ternero (Campbell 1976, Quisenberry y Strohbehn 1984, Haufe 1986) como para ganado en crecimiento (Harvey y Brethour 1979, Haufe 1982, Kunz et al. 1984, DeRouen et al. 2003), informándose que existe una reducción de 8,1 kg en la ganancia de peso de los terneros por cada 100 moscas por vaca (Steelman et al. 1991).

Tomando en consideración la variación de precios y el costo de los tratamientos con insecticidas, varios estudios en Estados Unidos han descrito un ingreso extra de entre US\$ 1,16 – 25,60 por animal cuando se controla la mosca de los cuernos (Harvey y Brethour 1979, Kunz et al. 1984, DeRouen et al. 2003), aunque otros no han encontrado beneficios en el tratamiento (Schreiber et al. 1987, Hogsette et al. 1991). Debido a la dificultad de cuantificar los efectos de la infestación sobre la ganancia de peso en el ganado, algunos estudios midieron respuestas fisiológicas y nutricionales del ganado de carne a la infestación por *H. irritans*, sin embargo no obtuvieron resultados consistentes (Riley et al. 1994, Presley et al. 1996). La Tabla 1 presenta un resumen de resultados de diversos estudios que evaluaron la ventaja de ganancia de peso en terneros e incremento de peso diario en ganado que ha sometido a tratamiento contra la mosca de los cuernos.

Tabla 1. Incremento en el peso total de terneros (PTT) y ganancia de ganancia diaria de peso (GDP) de ganado tratado comparado con ganado no tratado contra *H. irritans* ($*= P \leq 0,05$).

Autores	Incremento PTT (kg)	Incremento GDP (kg)
DeRouen et al. 1995	12*	0.12*
DeRouen et al. 2003	7*	0.04*
Harvey y Brethour 1979	10	-
Haufe, 1982	2	-
Kunz et al. 1984	12.5 *	0.04*
Sanson et al. 2003	10	0.09*

(Oyarzún et al. 2008)

Aunque el efecto de la infestación por mosca de los cuernos en la producción de leche ha sido menos estudiado, Jonsson y Mayer (1999) estimaron mediante modelos matemáticos que una infestación de 200 insectos por animal reduce la producción en aproximadamente 520 mL diarios. Otros estudios han establecido una reducción de un 4-12% en la producción de leche en vacas infestadas con *H. irritans*, dependiendo del grado de infestación (Guglielmone et al. 1998a, Velasco et al. 2001). Adicionalmente, la infestación por *H. irritans* produce indirectamente un detrimiento en la producción de leche debido a su rol como vector de *Staphylococcus aureus*, bacteria responsable de la mastitis (Gillespie et al. 1999).

La industria peletera también es afectada en forma importante. La picadura del insecto produce separación de las fibras de la piel, puntos negros y cicatrices que disminuyen posteriormente la calidad de los cueros, con la consiguiente reducción de su valor comercial (Torres et al. 1993, Owens et al. 1998, Bulman et al. 1999, Guglielmone et al. 1999b). Un estudio realizado por Guglielmone et al. (1999b), determinó que existe una correlación entre el daño tisular y el grado de infestación por *H. irritans* en un animal, sin embargo, además de ello, incidirían otros factores

no relacionados directamente a la infestación, tales como la variabilidad individual en la reacción inmunológica a la picadura. Otros estudios informaron un incremento en el daño en los cueros en Uruguay luego de la introducción de *H. irritans* (Vanzini et al. 1997). En Argentina, una investigación demostró que el mayor daño en los cueros se produce en los meses de verano, en un orden decreciente desde los toros, vacas, novillos y vaquillas hasta los terneros (INTA 1995).

En otro aspecto y en menor escala, se ha reportado el efecto de *H. irritans* sobre la producción ganadera al actuar como vector de parásitos como *Stenophilaria stilesi* en Estados Unidos, Canadá (Watrelot-Virieux y Pin 2006) y Australia (Shaw y Sutherland 2006). En Brasil, se demostró además que *H. irritans* puede ser un vector potencial de *Dermatobia hominis* (Diptera: Curterebidae) (Leite et al. 1998).

2.3 Control y resistencia de *H. irritans* a los insecticidas

El primer insecticida utilizado para controlar *H. irritans* fue el DDT (diclorodifeniltricloroetano) en el año 1945, el cual proporcionaba protección por hasta cuatro semanas. Sin embargo, en 1961 se publicaron los primeros informes sobre poblaciones resistentes a este compuesto (Burns y Wilson 1963). Posteriormente, entre la década de los 60' y los 80' se desarrollaron distintos principios activos pertenecientes a nuevas clases de insecticidas, como la de los organofosforados (OFs) (Harris et al. 1966) y piretroides (Ahrens y Cocke 1979) que probaron ser altamente efectivos en el control de la mosca de los cuernos. Sin embargo, pronto se observó que uno a dos años de iniciada la aplicación los insecticidas, la efectividad de cada uno de ellos disminuía drásticamente a causa de la aparición de poblaciones de *H. irritans* resistentes a los compuestos activos (Ahrens 1979, Sheppard 1983, Quisenberry et al. 1984, Schmidt et al. 1985).

Actualmente se siguen utilizando nuevos OFs y piretroides, con mayor o menor efectividad en distintas zonas geográficas. La mayoría de los insecticidas incorpora compuestos sinérgicos como el piperonil butóxido (PBO) en su formulación, que en algunos casos ha logrado aumentar la efectividad de los piretroides y reducir la dosis letal en cepas resistentes (Bull et al. 1988), mientras que en otros no ha ejercido ningún efecto (Farnsworth et al. 1997, Guglielmone et al. 1999a). La introducción de avermectinas y milbemicinas a principio de la década de los 90' aumentó la gama de insecticidas disponibles para el control de *H. irritans*, con la ventaja adicional de poseer un efecto larvicida que permite el control de el insecto en sus primeros estados de desarrollo en la materia fecal (Miller et al. 1986, Guglielmone et al. 1998b, Miller et al. 2003). La desventaja de estos insecticidas, sin embargo, radica en que son excretados a través de la glándula mamaria, limitando su uso en la producción lechera. Otro insecticida introducido recientemente es el clorfenapir, derivado pirrólido muy efectivo en el control de la mosca (Sheppard y Joyce 1998), pero extremadamente tóxico, con un poder residual similar al del DDT (Xavier 2003).

Otros compuestos utilizados para controlar *H. irritans*, son los reguladores del crecimiento e inhibidores del desarrollo de los insectos (RCI e IDI) (Kunz et al. 1977, Silva y Mendes 2002), cuyo mecanismo de acción consiste en imitar la acción de la hormona juvenil, interfiriendo con el desarrollo normal del proceso de muda en el caso de los RCI (Bloomquist 1996) e inhibiendo la formación de cutícula, en el caso de los IDI (Kunz et al. 1977, Silva y Mendes 2002). Estos compuestos son una buena alternativa de control contra las poblaciones de insectos resistentes, pero su costo es elevado y tienen un efecto tóxico en la fauna acuática (Way y van Emden 2000).

El excesivo uso de insecticidas ejerce una presión selectiva sobre las especies que se quieren controlar, lo que conduce al desarrollo de resistencia como una respuesta genético-evolutiva de

muchas de estas poblaciones (Conway y Comins 1979, FAO 2003). En el caso de la mosca de los cuernos, la resistencia a los insecticidas se lleva a cabo a través de una variedad de mecanismos bioquímicos, fisiológicos y conductuales (Sparks et al. 1985). El principal mecanismo de resistencia a piretroides es por insensibilidad del sitio activo o “knockdown resistance” (*kdr*), que consiste en una disminución de la sensibilidad del sistema nervioso al insecticida, debida a una menor accesibilidad de éste al sitio activo (Byford et al. 1999). El segundo mecanismo de resistencia involucra la detoxificación del insecticida mediante la sobreexpresión de esterasas y la expresión de esterasas específicas (Bull et al. 1988, Sheppard y Joyce 1992, Li et al. 2007); un tercer mecanismo de resistencia es el desarrollo de repelencia, mediante la cual los insectos se refugian en áreas del animal no expuestas al insecticida (Zyzak et al. 1996).

En *H. irritans*, se conjugan la mayoría de las condiciones para lograr una rápida tasa de desarrollo de resistencia a los insecticidas, esto es, desde factores operacionales como el excesivo uso de insecticidas, hasta factores intrínsecos como su etología y su alto potencial genético y biológico (Denholm y Rowland 1992, Byford et al. 1999, FAO 2003).

2.4 Métodos alternativos de control

El control de la mosca de los cuernos basado exclusivamente en el uso de productos químicos no es sostenible en el mediano y largo plazo. Las principales razones son: la actual problemática de resistencia a los insecticidas y el elevado costo económico que supone el desarrollo de nuevos principios activos para la industria química; la improbabilidad de encontrar moléculas aún más eficaces que las actuales; y la conciencia de los consumidores, acertada o no, acerca del daño que producen los residuos químicos tanto en la salud humana como en el medioambiente (Pruett 1999).

Dentro de este contexto surge la necesidad de combinar el uso de pesticidas con métodos alternativos de control enmarcados en el concepto de manejo integrado de plagas (MIP). El MIP ha sido definido como un sistema de apoyo de decisiones para la selección y uso de tácticas de control de plagas coordinadas dentro de una estrategia de manejo (Kogan 1998). Algunas alternativas de control de *H. irritans* sin el empleo de insecticidas y que se encuentran disponibles actualmente, son el uso de trampas y controladores biológicos. Las trampas mecánicas y eléctricas han tenido un éxito relativo, dado que aunque algunos estudios han demostrado que pueden lograr la misma eficiencia que los insecticidas, aún requieren cierto nivel de tecnología para su utilización, lo que en el caso de países como el nuestro, donde la producción animal se centra en su mayoría en pequeños productores, hace inviable su utilización (Xavier 2003). El uso de controladores biológicos tales como nemátodos entomopatógenos (Mendes y Linhares 1999), escarabajos estercoleros (Mariategui 2001), himenópteros (Lemke y Kissam 1988, Azevedo et al. 2000), bacterias (Gough et al. 2002) y hongos entomopatógenos (Steenberg et al. 2001) han resultado de utilidad en algunas zonas geográficas, pero no se ha logrado su utilización masiva, principalmente por la baja ubicuidad de los agentes controladores (ver Oyarzún et al. 2008).

En las últimas décadas se ha invertido una cantidad importante de recursos y esfuerzos en el desarrollo y evaluación de vacunas eficaces para endo y ectoparásitos. Estas vacunas operan contra blancos fisiológicos o antígenos ocultos, es decir que no surgen como consecuencia de una infección prolongada o natural por el hospedero y que son más inmunogénicos (Willadsen 1997). Hasta ahora, los estudios se han enfocado a buscar un antígeno que permita interferir con el mecanismo de anticoagulación usado por *H. irritans* (Zhang et al. 2002, Cupp et al. 2004).

Otra alternativa de control sin insecticidas, consiste en explotar la variabilidad de infestación que existe en el ganado bovino, tanto entre distintas razas como entre individuos dentro un mismo rebaño. Se ha demostrado que hay animales que poseen un fenotipo resistente a la mosca de los cuernos, refiriéndose de esta forma a aquellos que en forma consistente a través del tiempo mantienen un bajo nivel de infestación (Doube 1984, Schreiber y Campbell 1986, Steelman et al. 1993), y que este rasgo es heredable (Brown et al. 1992). Algunos estudios han determinado que razas como Brahman (Steelman et al. 1994), Chianina (Steelman et al. 2003) y Criolla (Guglielmone et al. 2000) son más resistentes a la infestación por *H. irritans* que las razas Hereford y Angus (Steelman et al. 2003). Cuando la selección de una raza resistente no es viable, la selección de animales con esta característica dentro de un mismo rebaño podría funcionar como un método sustentable de control de poblaciones de *H. irritans* resistentes a los insecticidas dentro de una estrategia que combine dos o más métodos de control (Steelman et al. 2003).

2.5 Relación parásito-hospedero entre *H. irritans* y el ganado bovino

Se sabe que en general, los insectos hematófagos utilizan una amplia variedad de estímulos visuales, olfatorios, gustativos y físicos para la localización y selección del hospedero (Birkett et al. 2004). La mosca de los cuernos es atraída por animales de color negro u oscuro (Schreiber y Campbell 1986) y de mayor tamaño, lo que influye en una menor infestación en las razas resistentes, de tamaño más pequeño (Guglielmone et al. 2000).

En cuanto a los estímulos olfatorios utilizados por *H. irritans* para orientarse en la localización y elección del hospedero. Christensen y Dobson (1979) establecieron que el insecto era fuertemente atraído por el olor emitido por las glándulas sebáceas de los toros . Años más tarde, un estudio demostró la factibilidad de manipular el nivel de infestación de un rebaño al introducir animales

más o menos infestados, por lo que los autores sugirieron que necesariamente hay un factor asociado a dichos animales, que estaría influyendo en la atracción diferencial hacia *H. irritans* (Jensen et al. 2004). Con el objetivo de dilucidar esta interrogante, Birkett et al. (2004) llevaron a cabo un estudio en el cual se analizaron los compuestos volátiles emanados de los animales del estudio de Jensen, concluyendo que el factor estaría dado por los compuestos volátiles liberados por los animales que actuarían como repelentes o atrayentes para la mosca de los cuernos.

Adicionalmente, se ha demostrado que existen factores intrínsecos de los animales habitualmente menos infestados que les confieren una resistencia física contra la picadura de *H. irritans*. Esta inmunidad sería necesariamente innata, ya que estudios realizados en *H. irritans exigua* han demostrado que, aun cuando se forman anticuerpos séricos en la sangre de bovinos expuestos a la saliva de la mosca, esta respuesta es insuficiente para ejercer un efecto deletéreo en la supervivencia y reproducción de *H. irritans exigua* (Kunz et al. 1975, Kerlin y Allingham 1992). Stear et al. (1984) sugieren que posiblemente existen diferencias en el complejo antígeno linfocítico bovino (BoLa) entre animales susceptibles y resistentes. Pruett et al. (2003) plantean que los animales resistentes poseen alguna modificación en la moléculas de la cascada de la coagulación que les confiere resistencia contra el mecanismo de anticoagulación utilizado por la mosca.

Por otro lado, Steelman et al. (1997) determinaron que algunos de los factores responsables de la resistencia a la mosca de los cuernos en las razas Chianina y Brahman están dados por características morfológicas tales como una mayor densidad de pelo y mayor secreción sebácea.

Hasta la fecha existe poca información sobre los factores específicos involucrados en la elección del hospedero y que influyen en la distribución desigual de la mosca de los cuernos sobre los individuos de un rebaño de similares características fenotípicas.

2.6 Semioquímicos y futuros métodos de control

Uno de los enfoques más recientes dentro de la investigación de métodos alternativos de control para la mosca de los cuernos, es la identificación de semioquímicos que puedan ser utilizados en un método de control etológico estímulo-disuasivo o “push-pull”, como parte de una estrategia MIP (Miller y Cowles 1990, Agelopoulos et al. 1999). Los semioquímicos son moléculas involucradas en la comunicación intraespecífica (feromonas) o interespecífica de un ecosistema (aleoquímicos). Entre los semioquímicos que median en la comunicación interespecífica se encuentran las kairomonas, que actúan en detrimento del emisor y las alomonas, que actúan en beneficio del emisor, aunque en algunos casos es más adecuado nombrarlas simplemente como repelentes o atrayentes (Agelopoulos et al. 1999).

En interacciones insecto-planta la quimiorrecepción juega un rol fundamental en la localización de hospedero a larga distancia. De la misma forma, se ha comprobado que en insectos hematófagos los compuestos semioquímicos también cumplen un rol importante en la localización del hospedero, y que los insectos se sienten atraídos a compuestos volátiles emitidos por la piel, orina y estiércol del ganado (Pickett et al. 1998). Por otra parte, la conducta de orientación hacia el hospedero es afectada por la estrategia de alimentación utilizada por las distintas especies, es decir, las que dependen de la sangre como única fuente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y reproductivos, tal como sucede con *H. irritans*, responderían de una forma más

enfática a las señales emitidas por sus hospederos que a las emitidas por otras fuentes de alimento (Gibson y Torr 1999).

En la producción agrícola, el método push-pull es una estrategia de manipulación del comportamiento mediante la cual, con el uso integrado de atrayentes y repelentes (o estimulantes y disuasivos), la plaga es desplazada desde una fuente que se quiere proteger (los cultivos) y simultáneamente es atraída hacia un compuesto atrayente que puede estar acoplado a un agente controlador de plagas (Nalyanya et al. 2000). Se ha demostrado que es posible extrapolar el uso de esta técnica en relaciones hematófago-vertebrados, como en el caso del mosquito de la malaria *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), donde se ha establecido el potencial de usar volátiles semioquímicos para reducir la atracción del hospedero humano hacia el mosquito (Costantini et al. 2001).

El dióxido de carbono (CO_2) emanado en el aliento de los vertebrados es virtualmente una kairomona universal utilizada por los insectos hematófagos para orientarse hacia su hospedero (Gibson y Torr 1999). Se ha demostrado que *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), la mosca de los establos, presenta respuestas anemotácticas al CO_2 , así como también al 1-octen-3-ol y acetona emitidos igualmente en el aliento del ganado (Vale y Hall 1985, Schofield et al. 1995). Asimismo, se sabe que la interacción entre la mosca tsetse (*Glossina spp.*) tanto con sus hospederos como con sus no-hospederos, es mediada por kairomonas y alomonas (Gikonyo et al. 2002). Birkett y col. (2004) capturaron los compuestos volátiles emitidos por el cuerpo y la orina de vaquillas identificadas como “atraventos” o “no atrayentes” según su grado de infestación con *H. irritans*. Entre los compuestos identificados figuraba 1-octen-3-ol y 6-metil-5-hepten-2-ona, que también han sido identificados en el olor de otros rumiantes (Gikonyo et al. 2002). Los

experimentos de campo del mismo estudio, dieron como resultado un efecto de disminución de la población de *H. irritans* sobre el ganado, sin embargo, la actividad biológica de estos compuestos sobre la mosca de los cuernos, no fue comprobada en el laboratorio. El estudio demostró la factibilidad de desarrollar un método de control etológico de tipo estimulo-disuasivo utilizando compuestos naturalmente emitidos por los animales, y la necesidad de nuevos estudios tendientes a identificar la naturaleza de los compuestos involucrados en la elección de hospedero de *H. irritans*.

2.6.1 Proteínas que enlazan olores (odorant-binding proteins, OBPs)

Dentro del contexto del desarrollo de nuevos métodos de control, es importante entender las bases moleculares de la olfacción en insectos, de tal manera de elucidar completamente el rol y la identidad de los semioquímicos involucrados. Es sabido que para poder ejercer su función, los semioquímicos deben atravesar una primera barrera constituida por la linfa sensilar, antes de alcanzar los receptores olfatorios ubicados en la superficie de las neuronas olfatorias receptoras (Ishida et al. 2002). El transporte a través de esta barrera es asistido por proteínas que enlazan olores, las “odorant-binding proteins” (OBPs), que las solubilizan protegiéndolas de la inactivación antes de que el mensaje sea entregado (Vogt 2002, Ishida et al. 2002). De esta manera, las OBPs conforman la primera parte de un filtro, en el cual sólo se unen las moléculas para las cuales existe afinidad (Leal 2005). Una de las utilidades de las OBPs, es su uso en la identificación de nuevos semioquímicos (Leal 2005). Es así como se han desarrollado un rango de herramientas que permiten determinar en forma simultánea la interacción cinética ligando/OBP, tales como desplazamiento mediante ligandos fluorescentes y ensayos de cinética de ligamiento, en un proceso que se conoce como “química ecología reversa” (Logan y Birkett 2007, Leal 2005). Éstas técnicas se utilizan para la búsqueda de librerías de potenciales ligandos contra una OBP en

particular. Una vez establecida la relación ligando/OBP, los compuestos que no se unen son eliminados del rango de búsqueda de potenciales semioquímicos. El paso posterior es elucidar la interacción ligando/OBP con los receptores olfatorios. (Leal 2005, Logan y Birkett 2007). La química ecológica reversa es complementaria a los otros métodos empleados por la química ecológica, tal como lo es la electroantenografía acoplada a cromatografía gaseosa, y tiene como objetivo facilitar la identificación de moléculas odoríferas con actividad biológica (Leal 2005).

La utilización del conocimiento de los ligandos/OBP y su interacción con los receptores olfatorios en una especie en particular tiene usos potenciales en el desarrollo de futuros métodos de control que incluyan, por ejemplo, el uso de insectos con OBP modificadas que interfieran con esta interacción, o la utilización de biosensores para la detección de feromonas en un sistema de monitoreo. Las OBP han sido identificados y/o clonadas en varios órdenes de insectos, incluyendo Diptera (Vogt 2002), sin embargo aún no se han identificado para *Haematobia irritans*.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área de estudio

Los ensayos con animales fueron conducidos en el Centro Experimental Maquehue, Universidad de La Frontera, Chile ($38^{\circ} 75'$ latitud sur, $72^{\circ} 6'$ longitud oeste), donde el agua caída promedia 2.000 mm por año con una estación seca relativa durante el verano. Las temperaturas tienen una oscilación de 5°C , el promedio anual es 12°C , 8°C en el mes más frío y 15°C en el mes más cálido. El suelo es un Typic Placudands (Andisol) y la pradera es permanente y está compuesta principalmente por gramíneas *Lolium perenne* y *Festuca sp.*

3.2 Animales

El estudio abarcó tres temporadas de vuelo de *Haematobia irritans*. Para cada temporada, se seleccionaron animales desde un hato bovino compuesto sólo por hembras de raza Holstein Friesen, con las cuales se formó un rebaño más pequeño. Para cada temporada se realizó un ranking de la distribución de *H. irritans* por individuo, medida como el porcentaje de insectos por animal (carga-mosca) con respecto al número total. Los rebaños además se utilizaron como fuente de insectos para los bioensayos y captura de volátiles. Para la primera temporada, Diciembre del 2005 a Marzo del 2006, se seleccionaron 29 vaquillas nacidas el 2004 (rebaño A), las que se utilizaron para el estudio de la distribución de *H. irritans*, captura de volátiles de animales de alta y baja-carga mosca, y para los análisis estadísticos asociados a la distribución de *H. irritans*. En la segunda temporada, Diciembre del 2006 a Marzo del 2007, se seleccionaron 15 hembras de distintas edades (rebaño B). En la tercera temporada, Diciembre del 2007 a Marzo del 2008, se seleccionaron 25 hembras de distintas edades (rebaño C) para llevar a cabo los ensayos de campo.

Los rebaños fueron manejados a pastoreo en un potrero separado 500 m del resto del hato, y no fueron tratados con insecticidas ni antiparasitarios durante todo el período de estudio.

3.3 Censo

Para realizar el censo de los insectos, se siguió la metodología informada por (Jensen et al. 2004) consistente en el conteo directo de los insectos presentes en ambos lados de cada animal, mientras éstos se encuentran pastando. Todos los conteos se realizaron entre las 10:00 y 14:00 hrs, y se anotaron en una hoja de protocolo cada vez. Adicionalmente, se llevó un registro del promedio de la temperatura ambiental, la que se midió con un termómetro portátil (Mini Thermo-Anemometer Model 45118, Extech, United States) en cada censo. Los censos se realizaron en cada una de las temporadas estivales mencionadas: en la primera temporada se realizaron 12 conteos, desde el 21 de Noviembre al 16 de Diciembre del 2005; en la segunda, nueve conteos, desde el 4 al 25 de Enero del 2007; y en la tercera, ocho conteos, desde el 4 al 14 de Febrero del 2008. Los conteos individuales se estandarizaron de acuerdo al porcentaje de *H. irritans* por cada animal con respecto al total del rebaño por cada día de conteo (carga-mosca). Se definieron como animales de alta carga-mosca (AC) a aquellos ubicados en el cuartil superior del ranking carga-mosca y como animales de baja carga-mosca (BC) a aquellos ubicadas en el cuartil inferior, según lo descrito por Birkett y col. (2004) y Pruett y col. (2003).

Se evaluó la persistencia del rasgo AC/BC en el rebaño A, para ello se seleccionaron tres vaquillas AC y tres BC, a las cuales se les comparó su posición en el ranking a través del tiempo. De esta manera, se asignó un número a cada animal según su posición en el ranking carga-mosca para cada día de conteo analizado, asignando el “1” para la vaquilla de menor carga-mosca y el “29” para la de mayor-carga. Luego, el número de posición asignado para cada animal para el

primer día de conteo fue comparado con su número de posición en el segundo conteo y luego en los dos últimos días de conteo (11° y 12°). Los datos se analizaron con un test de correlación de dos-lados diferente de cero ($P \leq 0,05$) (GenStat 9.1, VSN International, United Kingdom).

Adicionalmente, se analizó la relación del número promedio de insectos del animal con mayor promedio con la de menor promedio de insectos para cada temporada (Jensen et al. 2004). Se utilizó el test de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,001$) para la separación de grupos (Stat Direct, U.K.).

La correlación entre temperatura ambiental y número promedio de *H. irritans* sobre el rebaño se analizó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman ($P \leq 0,05$).

3.4 Insectos

La temporada de vuelo de *Haematobia irritans* en la zona sur de Chile transcurre entre Noviembre y Mayo. Los insectos son fácilmente distinguibles sobre el flanco del ganado que está a pastoreo debido a que se encuentran siempre en grupos numerosos y en una característica posición “boca abajo”.

Para los bioensayos, los insectos se colectaron manualmente desde animales AC y BC de cada rebaño, dispuestos en una manga, de tal manera de dejar sus lomos y flancos accesibles para la toma de las muestras. Una vez capturados, los insectos se transportaron al laboratorio en grupos de 30-40 en frascos de vidrio de 1 L de capacidad, tapados con mallas de gasa. En el laboratorio, los insectos se almacenaron en una cámara bioclimática programada a 12-15°C, con régimen L:O, 16:8, y fueron alimentados con sacarosa al 10% *ad libitum*. De esta manera se logró una sobrevida de los insectos de aproximadamente 3- 4 días, tiempo suficiente para llevar a cabo los bioensayos

en el laboratorio antes de buscar una nueva muestra de insectos. Una vez terminados los ensayos, las moscas se examinaron bajo la lupa para la determinación de sexo mediante características morfológicas, como la relación ocular-frontal y el extremo abdominal (Xavier 2003), y luego se almacenaron en microtubos de 1,5 mL a -20°C para los análisis en electroforesis.

3.5 Análisis de volátiles

3.5.1 Captura de volátiles por método headspace

Siguiendo la metodología propuesta por Birkett et al. (2004). Se capturaron los compuestos volátiles de las vaquillas de AC y BC seleccionadas desde el rebaño A, las que fueron inmovilizadas dentro de un establo en una manga portátil individual. Mediante el uso de poleas y cuerdas se montó un sistema modificado de líneas de vacío ($1,2 \text{ L min}^{-1}$), en cuyos extremos se adosaron las trampas para retener los volátiles. Las trampas consistieron en dos tubos de vidrio (0,5 cm d.i. x 12 cm) cargados con 50 mg de Porapak Q, los cuales quedaron ubicados a aprox. 12 cm del cuello de los animales de tal manera de absorber los volátiles emitidos por su cuerpo. Cada captura tuvo una duración de 9 h y fue repetida tres veces por cada animal. Se utilizó como control la captura de volátiles en el establo vacío y limpio. Los volátiles retenidos fueron posteriormente desorbidos desde cada uno de los tubos Porapak siguiendo la metodología de Quiroz et al. (1997), con hexano y éter respectivamente (500 μL). Los solventes conteniendo los volátiles fueron recogidos en viales de 0,5 mL y luego concentrados bajo un suave flujo de N_2 hasta obtener 50 μL , posteriormente se almacenaron a 4°C hasta ser analizados.

3.5.2 Cromatografía gaseosa (CG)

Se llevaron a cabo análisis de cromatografía gaseosa de cada uno de los extractos en un equipo Hewlett-Packard 5880 equipado con un FID y una columna HP-1 de 50m x 0,32mm de diámetro interno. El equipo se programó a una temperatura de 40° C por 2 min., con una rampa de temperatura de 10° C min⁻¹ hasta alcanzar los 250° C. Se utilizó hidrógeno como gas transportador.

3.5.3 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM)

Se analizaron dos extractos, uno de AC (V5804) y uno de BC (V8104) en razón de disponibilidad de las muestras. Las muestras se llevaron desde Chile a Rothamsted Research, en Inglaterra, para su análisis de cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas en un equipo Hewlett Packard 5890 GC equipado con una columna HP-1, conectado a un espectrómetro de masas VG Autospec (Fisons, Manchester, U. K.). La ionización se produjo por impacto de electrones a 70 eV, 250° C, el CG se programó con una temperatura inicial de 30° C por 5 min, y luego una rampa de 5° C min⁻¹ hasta alcanzar los 250° C. Los compuestos fueron identificados mediante su contraste con la librería del software, la cual fue previamente chequeada mediante la inyección con estándares. Cuando fue necesario, los compuestos fueron confirmados mediante co-inyección de estándares en CG. Las cantidades se cuantificaron mediante la comparación con estándares externos (Torr et al. 2006).

3.6 Electroantenografía (EAG)

Se realizaron ensayos de electroantenografía en el Centro de Investigación de Rothamsted Research, Inglaterra. Para ello se utilizaron ejemplares de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) criadas en el laboratorio de entomología del mismo centro, ante la imposibilidad de contar con

ejemplares vivos de *H. irritans*. El objetivo fue obtener un indicio de la actividad biológica de los compuestos identificados en los extractos volátiles mediante el registro las señales eléctricas generadas por las antenas ante los diversos estímulos. Para ello se utilizó la cabeza del insecto montada entre electrodos de plata encapsulados en microcapilares de silicio con solución ringer (0,1M KCl) y 10% de PVP (polivinilpirrolidona). El electrodo indiferente se insertó en la base de la cabeza, mientras que el de registro se ubicó sobre las aristas cortadas. Las señales generadas ingresaron a través de un amplificador de alta impedancia (UN-03b, Syntech) para ser visualizadas y registradas mediante un software (Syntech).

Se aplicaron 10^{-4} g de cada compuesto disuelto en *n*-hexano destilado ($10\mu\text{L}$ de solución $10 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$) sobre tiras de papel filtro, las que luego fueron ubicadas dentro de pipetas Pasteur desechables. El estímulo fue entregado a través de una corriente continua de aire húmedo y filtrado (1 L min^{-1}) usando un generador de estímulo (CS-27, Syntech) que libera un impulso de aire de 4 L min^{-1} por $0,8$ s. El intervalo entre estímulos fue de 1 min. Los compuestos se utilizaron en un orden aleatorio y las respuestas ($N=4$) fueron estandarizadas con el promedio de las respuestas a $10 \mu\text{L}$ de *n*-hexano. Los datos se analizaron estadísticamente con la Prueba-t de Student ($P \leq 0,05$).

3.7 Bioensayos Olfatométricos

3.7.1 Olfatómetro de tubo-Y

Se realizaron bioensayos en un olfatómetro tipo tubo-Y de material de vidrio, de $0,9 \text{ cm d.i.} \times 11 \text{ cm}$ en el tronco central y 9 cm en cada brazo. Cada uno de los brazos se conectó directamente a sendos tubos de vidrio de 12 cm longitud que terminan en forma aguzada en el extremo libre, similar a una pipeta pasteur. El tronco central se conectó mediante tubos de teflón a una bomba

para hacer vacío, a un regulador y a un flujómetro de tal manera de generar y mantener una corriente de aire continua de $1,8 \text{ L min}^{-1}$ en el interior del sistema. Cada uno de los extremos del olfatómetro se cubrió con gasa, de tal manera de evitar la salida de los insectos.

3.7.2 Procedimiento experimental

Siguiendo la metodología de Koschier et al. (2000), los insectos fueron introducidos individualmente en el orificio de entrada en el extremo central del tubo-Y. Se estimuló el movimiento del insecto explotando su capacidad de responder a los estímulos luminosos (fototaxis positiva), utilizando para ello, una fuente de luz blanca (20 W) ubicada sobre los dos brazos del tubo-Y. Se definió como respuesta exitosa el traspaso de la línea de inicio de uno de los dos brazos, y como no exitosa, a la ausencia de respuesta a los 3 min, con lo que el experimento se consideró descartado. Cada cinco insectos se cambió el brazo del estímulo, mientras que cada 10, se rotó el tubo-Y en 180° , para evitar sesgos de posición (Daisy et al. 2002). Se utilizaron 30 insectos por cada concentración para cada estímulo. Para cada experimento se impregnaron tiras de papel filtro con $10 \mu\text{L}$ del compuesto estímulo, utilizando *n*-hexano como control, las que fueron introducidas luego en los tubos dispuestos para tal efecto en el tubo-Y. Los tubos y las mallas o gasas, se cambiaron después de cada experimento. Entre cada cambio de dosis y compuesto, además, el olfatómetro se lavó con agua y detergente neutro, acetona y agua destilada y luego fue secado a 100°C .

Antes de comenzar los experimentos, se probó el olfatómetro sin estímulo, para comprobar que no hubiera sesgo de posición. Durante una primera etapa se llevaron a cabo ensayos con extractos puros, para evidenciar la actividad biológica de los extractos de volátiles de las vaquillas. En la siguiente etapa se probaron ocho estándares sintéticos idénticos a los compuestos naturales

diferenciales identificados en los cromatogramas. Para el análisis estadístico se comparó el uso la prueba de Chi cuadrado no paramétrica ($P \leq 0,05$) (Daisy et al. 2002).

3.8 Estándares químicos

Se utilizaron estándares químicos comerciales de alta pureza (>99,9%, Merck). Para los ensayos de olfactometría se utilizó 6-metil-5-hepten-2-ona, 2-octanona, 2-nonenona, 2-decanona, 2-undecanona, en dosis desde 10^{-8} a 10^{-5} g; y 1-octen-3-ol, *m*-cresol y *p*-cresol en dosis desde 10^{-8} a 10^{-6} g. Para la EAG, se utilizó *p*-cresol, 1-octen-3-ol, 2-octanona, 2-nonenona, 2-decanona, 2-undecanona y 6-metil-5-hepten-2-ona en una dosis única de 10^{-4} g. Para los ensayos de campo se utilizó 2-decanona, 2-undecanona, 1-octen-3-ol, *m*-cresol y *p*-cresol en una sola dosis de 5×10^{-4} g cada uno.

3.9 Ensayos de campo

3.9.1 Procedimiento

Se realizaron ensayos de campo en Febrero del 2008 con el objetivo de estandarizar metodología y evaluar la respuesta de los insectos a los compuestos que mostraron actividad biológica. Se formaron 2 pequeños rebaños compuestos por 5 individuos cada uno. Para el rebaño de alta carga (RAC) se seleccionaron individuos del rebaño C previamente identificados como AC: V5804, V5203, V1103, V3801 y V1603; para el rebaño de baja carga (RBC), se seleccionaron los individuos BC del mismo rebaño: V1606, V9506, V10206, V2006 y V4106. Se aplicó 2-decanona sobre cuatro de los individuos del RAC, dejando un animal, V1603, sin tratar, de tal manera que pudiera servir como fuente o receptor de insectos. Aplicando el mismo criterio, se aplicó 2-undecanona, *m*- y *p*-cresol a cuatro de los individuos del RBC, dejando sin tratar la vaquilla V4106.

Siguiendo la metodología propuesta por Jensen et al. (2004) con modificaciones, se realizó un ensayo por compuesto por día utilizando los dispensadores con dispositivos de liberación lenta. Para cada ensayo, los animales a ser tratados fueron trasladados a un potrero pequeño especialmente dispuesto para tal efecto. Transcurridos 60 min, se procedió a realizar un conteo siguiendo la misma metodología utilizada anteriormente para los censos. Posteriormente los animales fueron trasladados a la manga, donde se les colocó los dispensadores. Una vez finalizado el procedimiento, los animales se devolvieron nuevamente a potrero, y se esperó nuevamente 60 min para realizar un nuevo conteo. Al terminar el ensayo, se retiraron los dispensadores y se llevaron al laboratorio, donde se lavaron con agua y acetona. El análisis estadístico consistió en la comparación del promedio total de insectos en el rebaño antes del tratamiento (0 min) con el promedio de insectos 1 h (60 min) después de aplicado el tratamiento, mediante la Prueba de Wilcoxon para rangos asignados ($P \leq 0,05$).

3.9.2 Dispositivos de liberación lenta

Se utilizó esponja de celulosa, que fue limpiada por extracción con cloroformo en Soxhlet. Una vez limpia, la esponja fue cortada en trozos de 2x2 cm, que luego fueron encapsulados en polietileno. A cada esponja se le agregó 10^{-4} g del compuesto a probar en el mismo día. Una vez preparados, los sobres fueron sellados y guardados a 4° C hasta su utilización. Para los ensayos de campo, los sobres se ubicaron en un dispensador de acero inoxidable (13 cm diámetro x 4 cm long) con múltiples orificios de aprox. 0,5 cm de diámetro, el que luego fue enganchado a un cinturón ajustado alrededor del tórax del animal, detrás de la escápula. Los datos fueron analizados mediante el test de Wilcoxon($P \leq 0,05$).

3.10 Determinación de OBPs

Con el objeto de avanzar en el entendimiento del proceso de reconocimiento del hospedero en base a señales odoríferas por *Haematobia irritans*, se realizaron experimentos destinados a la identificación de OBPs en esta especie. Los ensayos se enmarcaron dentro de la nueva línea de investigación desarrollada en el Laboratorio de Ecología Química en el campo de la biología molecular destinada a la identificación de OBPs en distintas especies de insectos. Se utilizaron insectos colectados desde los animales utilizados en la temporada 2007-2008, los que fueron almacenados vivos a -20°C. Una vez que los insectos fueron separados por sexo, se colectaron en frío y bajo la lupa, 800 antenas, 400 palpos y 120 patas (tejido control) para ambos sexos. Posteriormente, cada tejido fue homogenizado en microtubos de 1,5 mL con 40 µL de buffer 10mM Tris-HCL pH8, con la ayuda de pistilos desechables. Las muestras homogenizadas se centrifugaron 2 veces a 13.400 rpm por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se concentraron mediante centrifugación al vacío y se analizaron mediante electroforesis en gel nativo de poliacrilamida (15% PAGE), luego las bandas fueron visualizadas con azul de Comassie R-250.

4 RESULTADOS

4.1 Identificación de animales AC y BC

El análisis de los datos obtenidos para los tres rebaños (A, B y C) demostró que *H. irritans* no se distribuyó de forma homogénea sobre ninguno de los tres rebaños. Se seleccionaron aquellos animales ubicados en el cuartil superior e inferior de cada ranking elaborado según el porcentaje de carga-mosca individual.

En el rebaño A se seleccionaron como AC los animales V5804 ($7,4 \pm 0,8\%$), V2304 ($6,9 \pm 0,8\%$) y V1404 ($6,4 \pm 0,8\%$); y como BC, los animales V8104 ($1,1 \pm 0,2\%$), V3404 ($1,2 \pm 0,4\%$), V6904 ($1,3 \pm 0,2\%$) (Figura 1). En el rebaño B se seleccionaron como AC los animales V1502 ($13,2 \pm 0,7\%$), V4104 ($11,2 \pm 0,4\%$) y V5804 ($10,4 \pm 1,0\%$); y como BC a los animales V4605 ($1,7 \pm 0,2\%$), V3105 ($1,9 \pm 0,4\%$) y V4405 ($2,7 \pm 0,5\%$) (Figura 2). En el rebaño C (Figura 3), se seleccionaron como AC los animales V1603 ($16,1 \pm 2,0\%$), V5804 ($9,6 \pm 1,4\%$), V5203 ($8,7 \pm 2,3\%$) V1103 ($7,6 \pm 2,1\%$) y V3801 ($5,4 \pm 1,5\%$); y como BC, los animales V9506 ($0,3 \pm 0,1\%$), V2006 ($0,6 \pm 0,2\%$), V10206 ($1,3 \pm 0,3\%$), V4106 ($1,0 \pm 0,1\%$) y V1606 ($1,1 \pm 0,2\%$) (Figura 3).

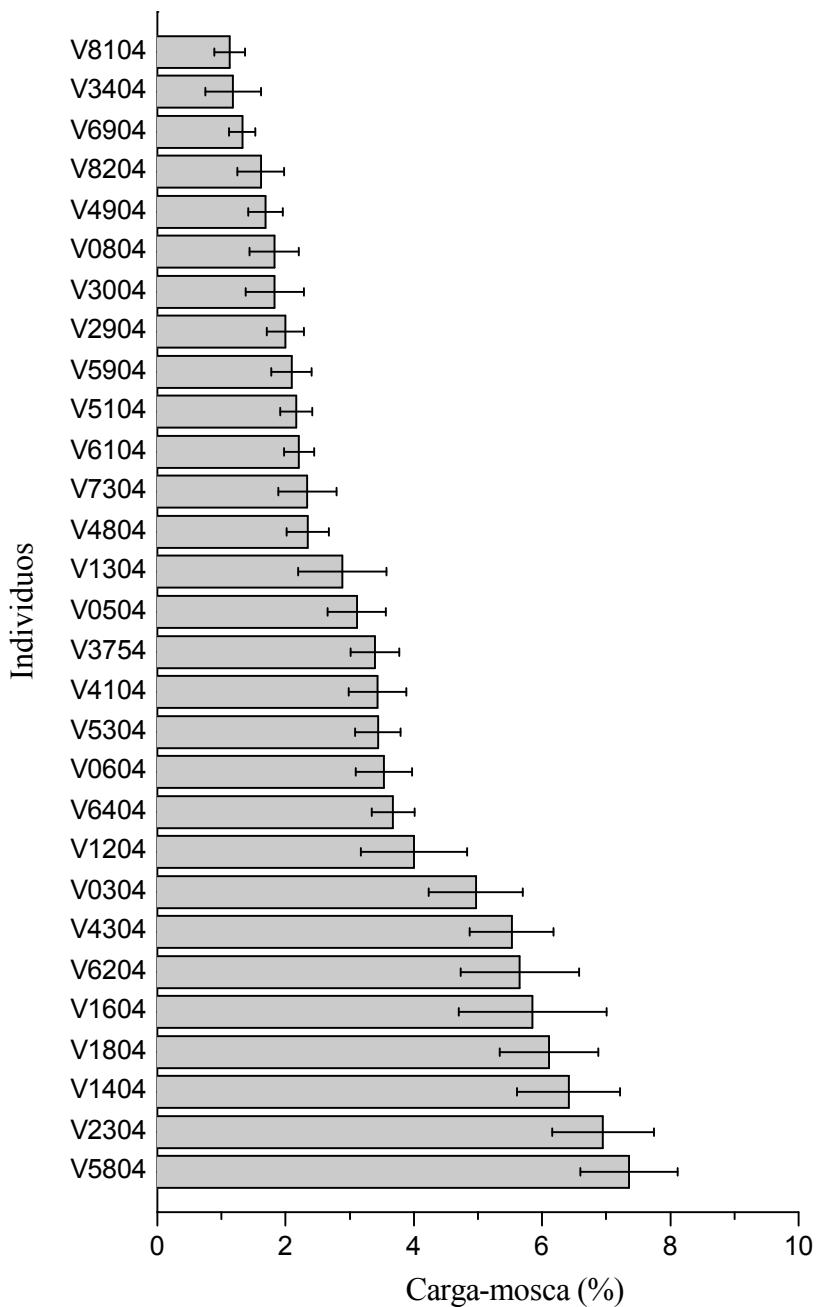


Figura 1. Distribución de *H. irritans* en rebaño Holstein Friesian A, temporada 2005-2006

(N=29). Porcentaje (\pm S.E.) de carga-mosca individual calculado sobre el total de moscas presentes en cada rebaño en doce conteos.

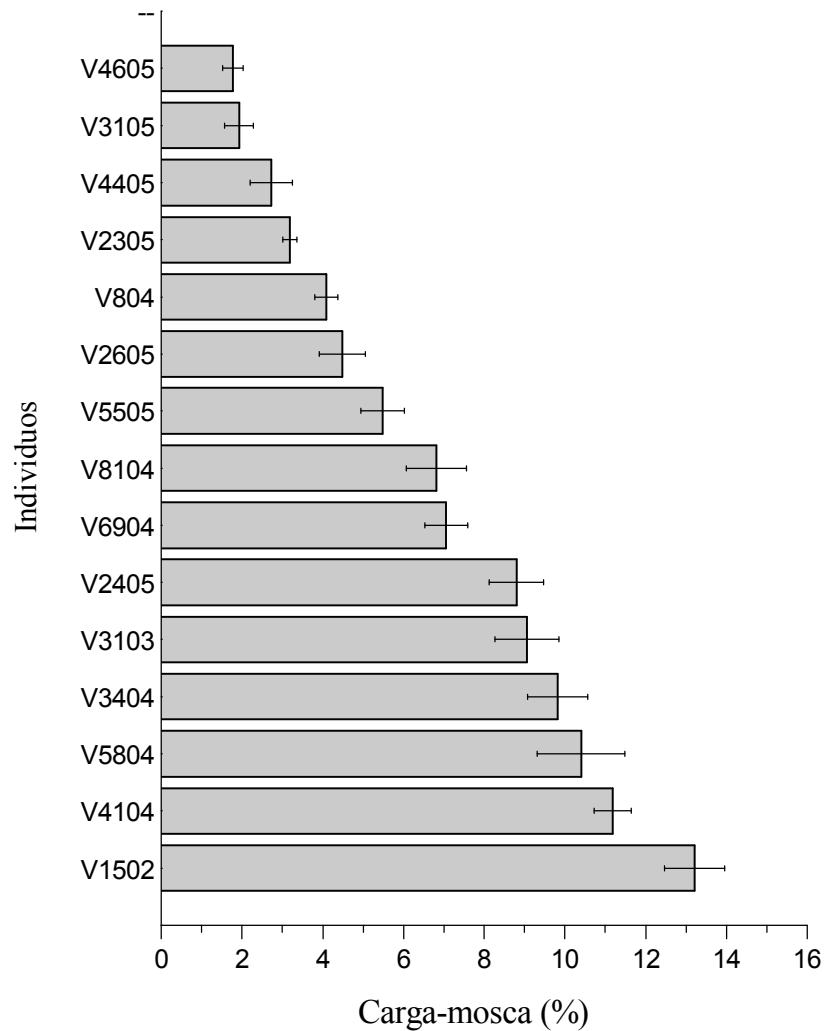


Figura 2. Distribución de *H. irritans* en rebaño Holstein Friesian B, temporada 2006-2007

(N=15)). Porcentaje (\pm S.E.) de carga-mosca individual calculado sobre el total de moscas presentes en cada rebaño en nueve conteos.

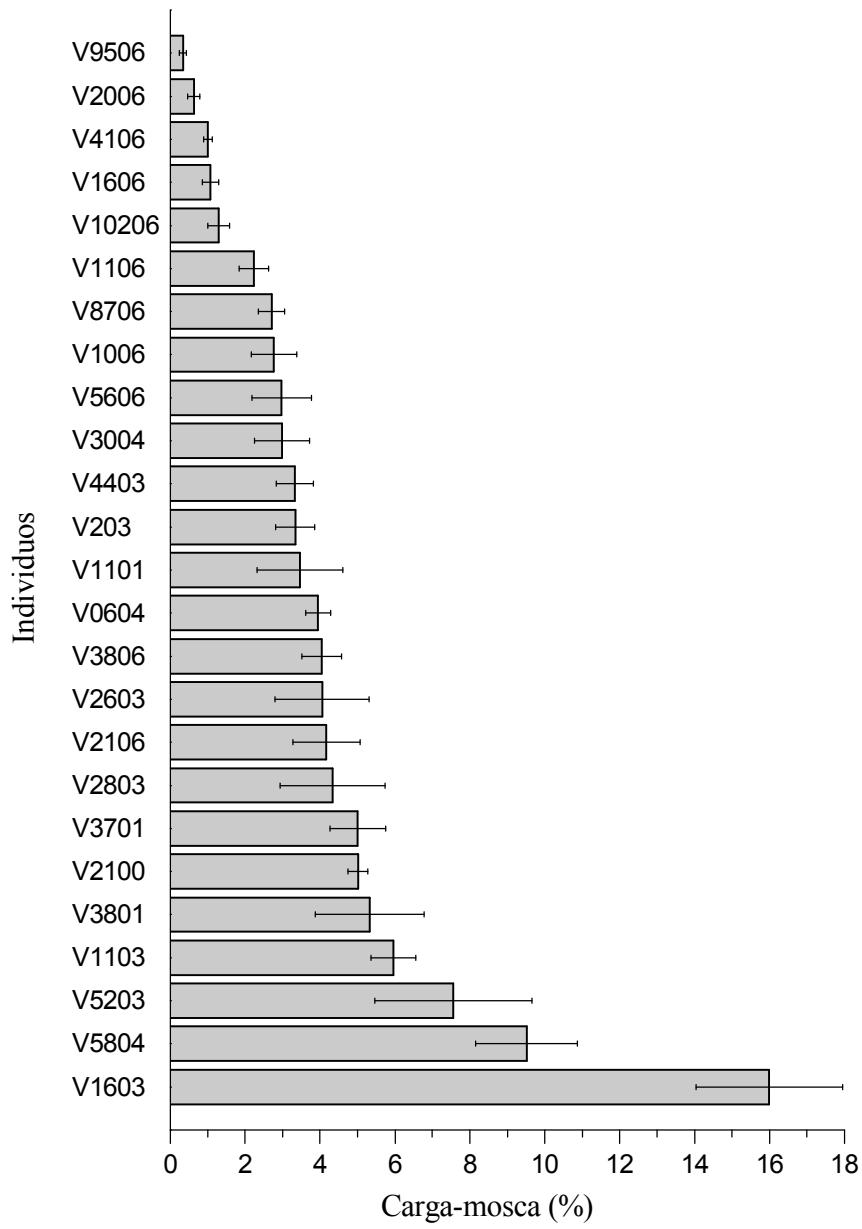


Figura 3. Distribución de *H. irritans* en rebaño Holstein Friesian C,temporada 2007-2008

(N=25). Porcentaje (\pm S.E.) de carga-mosca individual calculado sobre el total de moscas

presentes en cada rebaño en ocho conteos.

Para evaluar la magnitud de la diferencia del número de insectos entre los animales ubicados en los extremos del ranking, se evaluó, para cada rebaño, la relación entre el animal con el mayor número promedio de *H. irritans* contra el de menor número promedio mediante el test de Kruskall-Wallis. La relación más alta entre el promedio más alto y el más bajo fue de 37,1, en el rebaño C, mientras que la relación más baja fue de 7,7 en el rebaño B (Tabla 2).

Tabla 2. Número promedio de *Haematobia irritans* en animales de extremos del ranking carga-mosca en rebaños Holstein Friesian. Se utilizó prueba de Kruskall-Wallis para la diferenciación de grupos ($P \leq 0,001$)

Rebaño	<i>N</i>	Conteos	Mayor	Menor	Test Kruskall-Wallis	Relación promedio
			promedio	±		
			SE	SE		
			(Nº animal)	(Nº animal)		
A	29	12	96,9±26,8 (V5804)	10,5±3,1 (V8104)	0,001	9,2
B	15	9	352,6±27,2 (V1502)	45,6±6,1 (V4605)	0,001	7,7
C	25	8	77,9±10,0 (V1603)	2,1±0,8 (V9506)	0,001	37,1

La evaluación de la persistencia del rasgo AC y BC en el rebaño A, arrojó como resultado una correlación significativa entre el ranking en el primer día de conteo y el segundo ($r = 0,932; P \leq 0,05$) y entre el ranking del 11º y 12º día de conteo ($r = 0,973$ y $r = 0,929; P \leq 0,05$) (Figura 4).

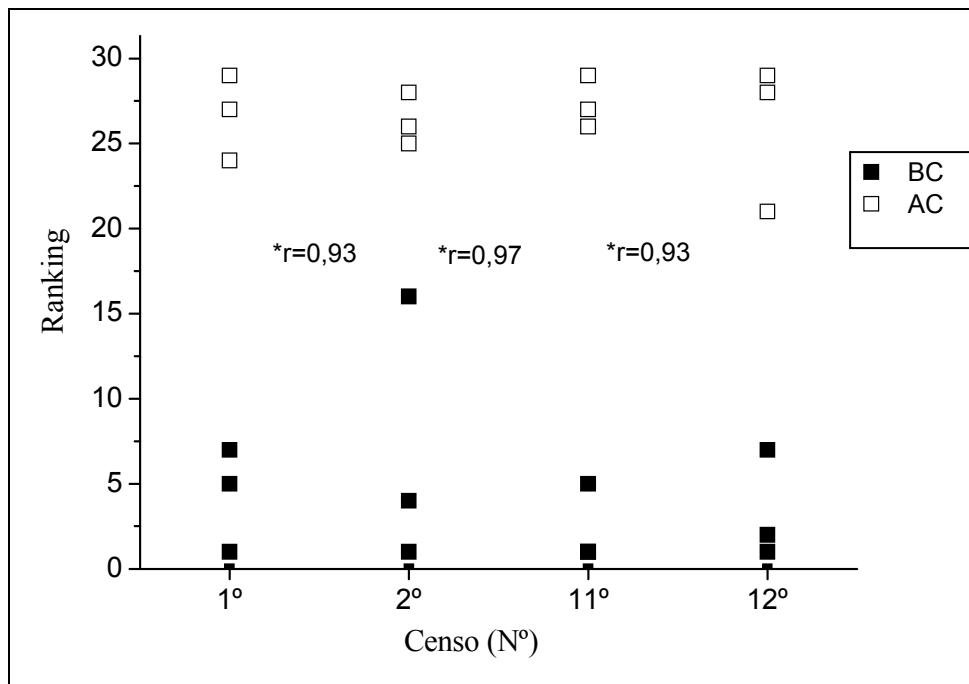


Figura 4. Persistencia de posición en el ranking elaborado según carga-mosca individual de 3 individuos de BC (V3404, V8104 y V6904) y 3 de AC (V5804, V2304 y V1404) del rebaño

A. Correlación entre el primer conteo y el segundo; y el primero y el 11º y 12º conteos. Análisis con un test de correlaciones de dos colas diferente de cero ($P \leq 0,05$).

La temperatura y el número de *H. irritans* total sobre el rebaño A demostró una alta correlación entre ambos factores ($r=0,788$; $P = 0,002$) (Figura 5).

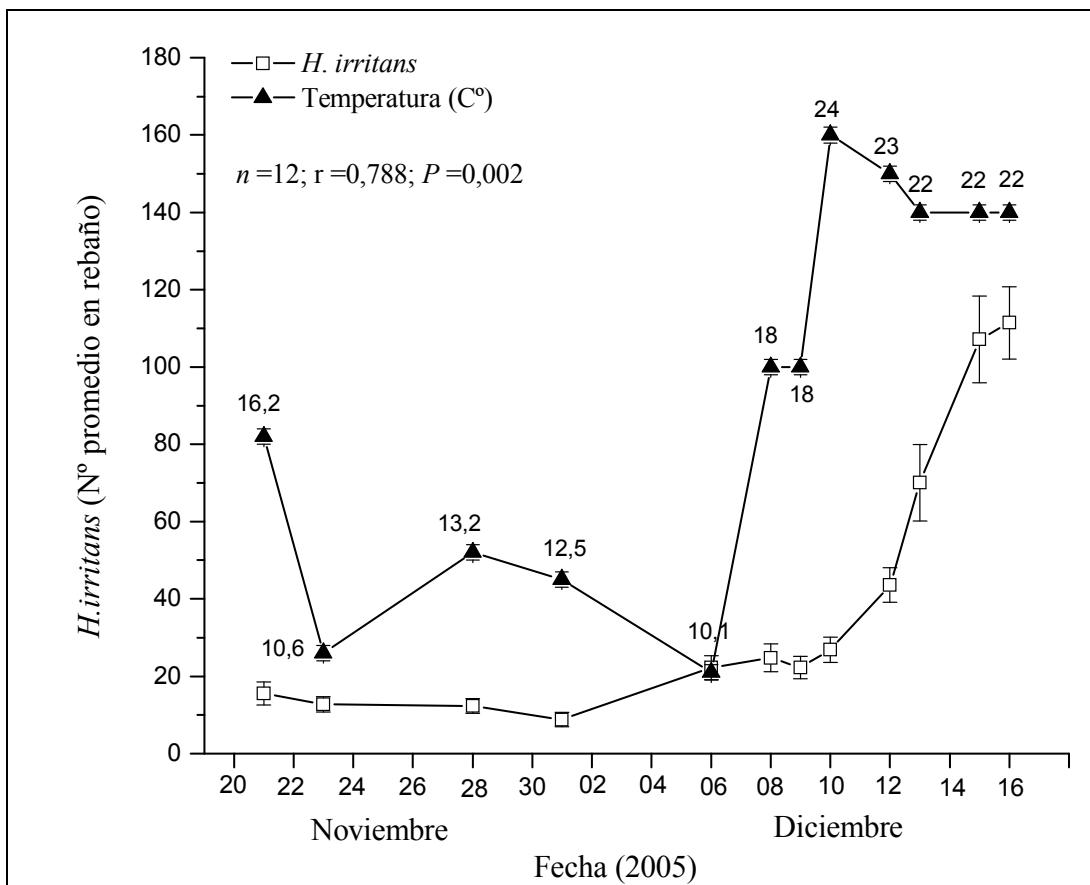


Figura 5. Correlación entre población de *H. irritans* y temperatura ambiental.

Número promedio de *H. irritans* y temperatura (C°) durante 12 conteos realizados en un periodo de 28 días en rebaño A (N=29). Datos analizados con el coeficiente de correlación de rangos de Spearman ($P=0,002$).

4.2 Identificación de compuestos volátiles

Los extractos provenientes de vaquillas V5804, V1804 y V2304 (AC); y V8104, V3404 y V6904 (BC) del rebaño A, fueron inyectados en el CG. Se realizó la identificación tentativa de los compuestos mediante comparación con librerías y base de datos propias e índices de Kovat. Además se realizó co-inyección con estándares cuando fue necesario. Se identificaron un número

de compuestos derivados de la descomposición de aminoácidos, tales como *m*- y *p*- cresol; compuestos derivados de la descomposición de ácidos grasos como los metilalcanos, 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona y 2-undecanona; los ácidos butanoico, 3-metilbutanoico, pentanoico y hexanoico, y 1-hexanol; 6-metil-5-hepten-2-ona (6MHO); y heptanal.

Las muestras provenientes de la V8104 (BC) y V5804 (AC) fueron analizadas en el CG-EM para la identificación definitiva de los compuestos. En el análisis por GC-EM de dos muestras, se observaron diferencias cuantitativas entre las dos muestras (Figura 6; tabla 3).

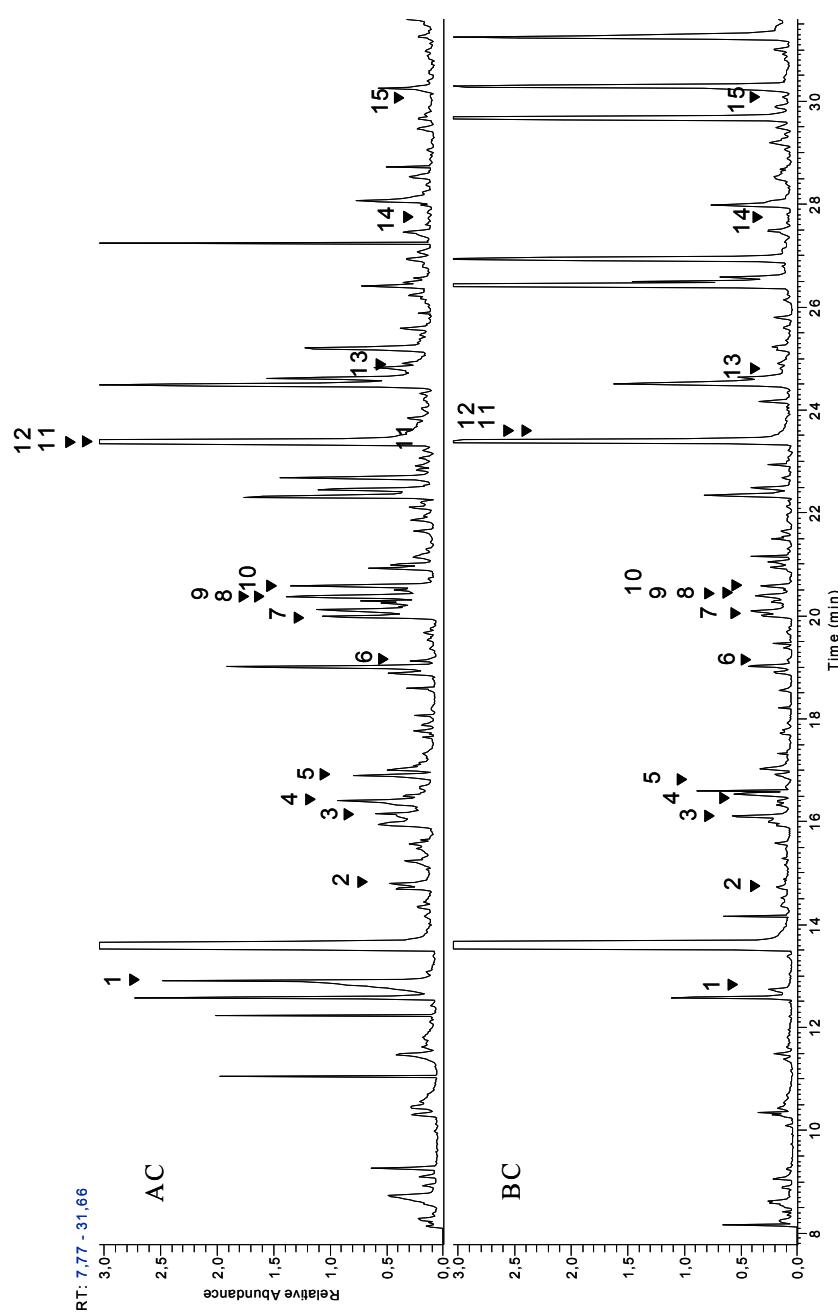


Figura 6 Perfil de volátiles emitidos por animales Holstein Friesian de AC y BC del rebaño A. Los números corresponden a los compuestos listados en la Tabla 3, los cuales fueron identificados mediante CG-MS, índices de Kovat y co-inyección con estándares. AC) Perfil de volátiles provenientes de individuo V5804. BC) Perfil de volátiles provenientes de individuo V8104.

Tabla 3. Compuestos identificados en los extractos de volátiles de vaquillas Holstein Friesian del rebaño A. Análisis CG-EM de volátiles de un individuo BC (V8104) y un AC (V5804).

Nº	Compuestos	KI	BC (ng uL ⁻¹)	AC (ng uL ⁻¹)	AC/BC
1	Ácido Butanoico	789	5,195	78,226	15,1
2	Ácido 3-metilbutanoico	831	3,148	6,214	2
3	1-hexanol	861	11,060	6,106	0,6
4	Ácido pentanoico	867	1,472	33,964	23,1
5	Heptanal	882	5,201	17,150	3,3
6	2-heptanona	938	0,993	3,788	3,8
7	Ácido hexanoico	962	4,442	17,536	3,9
8	6-metil-5-hepten-2-on	965	2,251	1,743	0,8
9	3-octanona	966	8,669	32,385	3,7
10	2-octenona	973	0,427	1,837	0,8
11	<i>m</i> -cresol	1047	2,073	25,953	12,5
12	<i>p</i> -cresol	1052	335,9	732,4	2,2
13	2-nonenona	1067	0,214	0,433	2,0
14	2-decanona	1146	0,067	0,127	1,9
15	2-undecanona	1278	0,071	0,230	3,2

KI: Indices de Kovat; AC/BC: relación cuantitativa entre compuestos provenientes de extractos de animales de alta y baja carga.

4.3 Electroantenografía (EAG)

Se analizó la respuesta EAG de antenas de *Musca domestica* a distintos compuestos sintéticos idénticos a los identificados en los extractos de las vaquillas de Maquehue. Se probaron siete compuestos: 2-octanona, 2-decanona, 2-nananona, 2-undecanona, *p*-cresol, 6-metil 5-hepten-2-ona y 1-octen-3-ol, de los cuales sólo dos: *p*-cresol y 6-metil-5-hepten-2-ona, no registraron respuesta electrofisiológica en *M. domestica*. La amplitud de la respuesta del 1-octen-3-ol (0,157 mV) fue superada por 2-nananona, que demostró la mayor amplitud corregida (0,247 mV), y por 2-decanona (0,173mV) y 2-undecanona (0,163mV) (Figura 7).

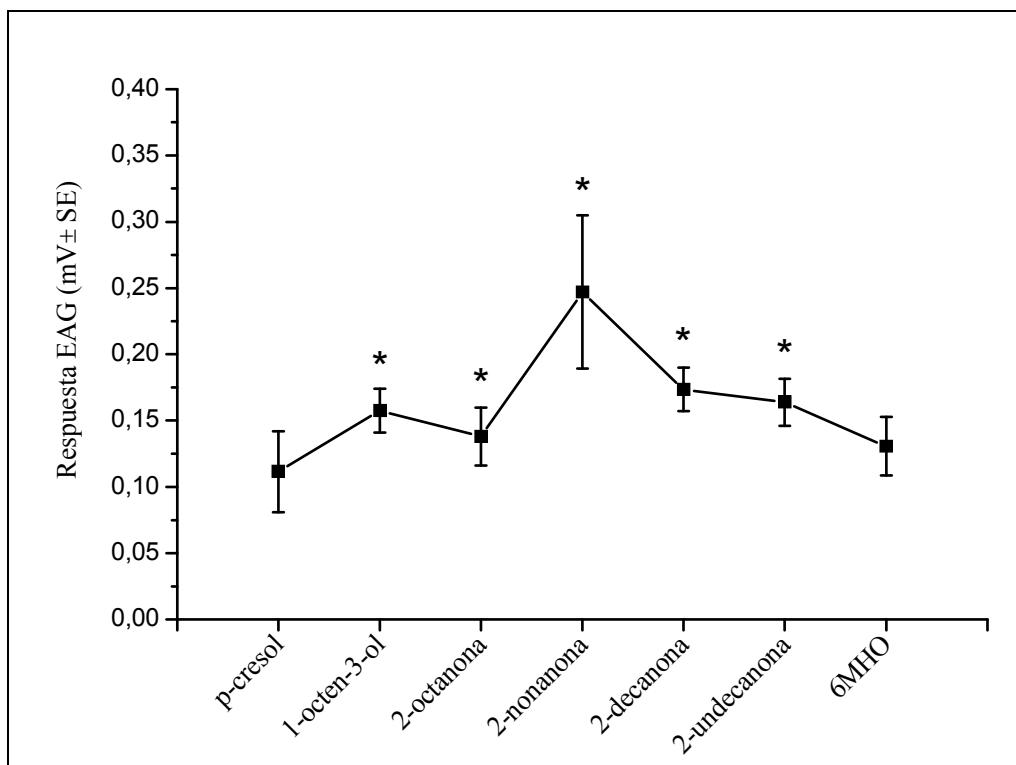


Figura 7. Respuesta electrofisiológica de antenas de *Musca domestica* (N= 4) a distintos compuestos identificados en el olor de vaquillas Holstein-Friesian. Se utilizaron 10^{-4} g como dosis única para cada compuesto. Asteriscos indican respuesta EAG significativamente diferente al control. Datos analizados mediante la Prueba-*t* de Student ($P\leq 0,05$).

4.4 Bioensayos olfatométricos

Los ensayos de respuesta conductual de insectos ante estímulos odoríferos pueden ser realizados en diferentes sistemas, tales como túneles de viento y distintos tipos de olfatómetros, dependiendo de la especie a ser estudiada y los objetivos a alcanzar. Los olfatómetros en Y de pequeño diámetro, en donde los insectos son observados de forma individual, constituyen una buena opción cuando se desea evitar el efecto de grupo.

Debido a que no existen antecedentes previos para *H. irritans*, fue necesario realizar experimentos preliminares con el objetivo de estandarizar el método de olfatometría en tubo en Y. A través de diversos experimentos se logró optimizar tanto el flujo de aire en el sistema, como también demostrar que no existieran sesgos de preferencia por ningún brazo en particular. Además, se demostró que no existe diferencia de respuesta entre ambos sexos. Posteriormente, según lo propuesto por Bhasin (2000), se utilizó el término “atrajente” para aquellas dosis de estímulos aplicadas en uno de los brazos del tubo-Y, que resultaron en un número de insectos significativamente superior en ese brazo comparado con el número esperado de insectos en el brazo con el solvente como control; de la misma manera, se definió como “repelente” aquél compuesto que resultó en un menor número de insectos en el brazo con el estímulo que en el brazo control.

Los extractos puros no ejercieron efecto significativo, sin embargo, fue posible observar una tendencia de los insectos a ser atraídos por el extracto proveniente del animal de AC. Los compuestos *m*- y *p*- cresol ejercieron atracción en la dosis 10^{-6} g, no siendo posible evaluar el efecto de la dosis más alta debido a que se produjo contaminación en el sistema. En cuanto a los

otros compuestos, no hubo respuesta significativa a las distintas dosis de 2-octanona, 2-nananona y 6-metil-5-hepten-2-onal. En cambio, cuando los insectos fueron expuestos a diferentes dosis de 2-decanona, mostraron repelencia por las dosis de 10^{-8} y 10^{-6} g, mientras que la 2-undecanona fue atractiva para los insectos cuando se aplicó en la dosis de 10^{-7} g. (Tabla 4).

Tabla 4. Respuesta de *Haematobia irritans* a compuestos idénticos a los identificados en el perfil de volátiles de animales AC y BC del rebaño A, y a extractos puros ($P \leq 0,05$).

Compuesto	log g	Estimulo/control	N	P	χ^2
2-octanona	-8	22/13	35	0,128	2,31
	-7	17/13	30	0,465	0,53
	-6	20/13	33	0,223	1,48
	-5	12/18	30	0,273	1,2
2-nonanona	-8	14/16	30	0,715	0,13
	-7	11/19	30	0,14	2,13
	-6	15/15	30	1,000	0
	-5	13/17	30	0,317	0,53
2-decanona	-8	8/22	30	0,011	6,5
	-7	17/13	30	0,465	0,53
	-6	5/25	30	0,000	13,33
	-5	16/14	30	0,384	0,13
2-undecanona	-8	17/13	30	0,465	0,52
	-7	21/9	30	0,028	4,80
	-6	17/13	30	0,465	0,53
	-5	18/12	30	0,273	1,20
6-metil-5-hepten-2-ona	-8	15/15	30	1,000	0
	-7	14/16	30	0,715	0,13
	-6	19/11	30	0,144	2,13
	-5	18/12	30	0,273	1,20
1-octen-3-ol	-8	15/15	30	1,000	0
	-7	15/13	28	0,750	0,14
	-6	24/6	30	0,001	10,8
<i>m</i> -cresol	-8	16/14	30	0,715	0,13
	-7	19/11	30	0,144	2,13
	-6	17/3	20	0,002	9,8
<i>p</i> -cresol	-8	19/11	30	0,144	2,13
	-7	18/18	36	1,000	0
	-6	24/6	30	0,001	10,80
BC (V8104)	-	14/16	30	0,715	0,13
AC (V5804)	-	20/10	30	0,068	3,33

4.5 Experimentos de campo

Se realizaron experimentos con el objetivo de evaluar la respuesta de *H. irritans* en campo a compuestos biológicamente activos en ensayos de laboratorio. Para ello, se analizó la variación de la población de *H. irritans* presentes sobre los individuos del rebaño una vez aplicado el compuesto. El criterio utilizado fue el de tratar el rebaño formado por animales de alta carga con el compuesto que en laboratorio resultó repelente, y por el contrario, tratar las muestras formadas por animales de baja carga con los compuestos que en laboratorio resultaron atrayentes. Los resultados que se muestran en la tabla 5 muestran que cuando se aplicó *m*- y *p*- cresol, se observó una disminución de la población de insectos sobre el rebaño. Para el resto de los compuestos no se observa una respuesta significativa.

Tabla 5. Efecto de tratamiento con distintos compuestos sobre la población de *H. irritans* en distintos rebaños.

Compuesto	Rebaño ^b (N=5)	Promedio <i>H. irritans</i> (\pm S.E.) ^a			<i>P</i>
		0 min	60 min		
2-decanona	RAC	63,8 \pm 12,0 a	74,0 \pm 19,0a		0,465
2-undecanona	RBC	8,2 \pm 2,2 a	4,6 \pm 0,8 a		0,343
1-octen-3-ol	RBC	6,6 \pm 2,5 a	10,4 \pm 1,0 a		0,276
<i>p</i> -cresol	RBC	11,8 \pm 2,2 a	7,2 \pm 2,0 b		0,042
<i>m</i> - cresol	RBC	17,2 \pm 5,1 a	7,4 \pm 2,2 b		0,042

^aPromedio de insectos en el rebaño antes (0 min.) y después de aplicado el tratamiento (60 min.).

^bRAC: rebaño formado por animales de alta carga; RBC: rebaño formado por animales de baja carga. Valores en una misma fila, para cada compuesto, seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes basado en la prueba de Wilcoxon para rangos asignados ($P \leq 0,05$)

4.6 OBP

La electroforesis en gel de poliacrilamida nativa de los extractos de proteína de antenas, palpos y patas de *H. irritans*, demostró la presencia de una banda específica de la antena (Figura 8), con una movilidad similar a la OBP de *Culex quinquefasciatus* (Ishida et al. 2002). Esta banda fue transferida desde el gel nativo a una membrana de polivinil difluoruro, y luego enviada a un laboratorio externo, donde posteriormente se obtendrá la secuencia aminoacídica N-terminal de (20 aminoácidos) por el método de Edman.

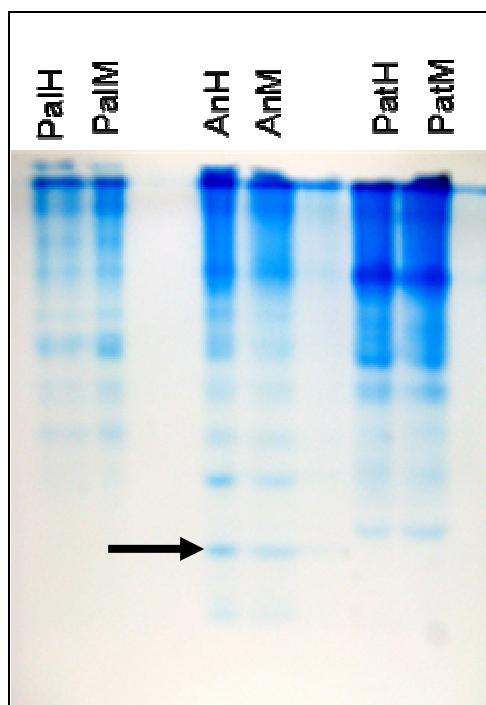


Figura 8. Proteínas solubles de *H. irritans* separadas en un PAGE nativo 15%, teñido con azul de Coomasie. PalH: palpos de hembra; PalM: palpos de macho; AnH: antenas de hembra; AnM: antenas de macho; Path: patas de hembra; PatM: patas de macho. La flecha indica la banda que será enviada para la secuenciación del N-terminal (20 aminoácidos).

5 DISCUSIÓN

5.1 Distribución de *H. irritans* sobre el rebaño

La presencia de animales de baja y alta carga en los distintos rebaños analizados durante las tres temporadas concuerda con lo informado por Jensen et al.(2004), quienes indicaron que se encontraron animales ubicados en los extremos del ranking de número de insectos por animal, que mantuvieron su posición para la segunda temporada del estudio. De igual manera, Steelman et al. (1993) llevaron a cabo un estudio de tres años, durante los cuales clasificaron 94 animales de distinta raza como susceptibles o resistentes en base al porcentaje de *H. irritans* que portaban dentro del rebaño, es decir la carga-mosca, concluyendo que los animales mantenían su clasificación durante todo el período. En otro estudio, Pruett et al. (2003), elaboraron un ranking similar en 23 vacas de distinto color durante una temporada, demostrando que los animales podían ser caracterizados como AC y BC en base a su porcentaje relativo de carga-mosca, y que el número absoluto de insectos por animal aumentaba ante el aumento del número. En forma similar a estos resultados, aunque sólo se evaluó la persistencia de la característica dentro de un período de 2 semanas, los animales clasificados como AC y BC en este estudio, también conservaron su posición durante la primera temporada.,

Los resultados de igual manera concuerdan con lo obtenido por Guglielmone et al.(2000), quienes determinaron que la distribución de insectos dentro de un rebaño no fue equitativa, ya que sólo un pequeño número de animales soportaba el 50% del total de la población de insectos. Sin embargo, los autores del mismo estudio indicaron que no hubo consistencia en la posición de los individuos dentro del ranking, ya que la mayoría de ellos se ubicó dentro del grupo de los

animales más altamente infestados en algún punto dentro del período, lo que difiere con los resultados aquí obtenidos.

Es posible observar el mayor promedio de moscas por individuo en el rebaño B, confirmando lo informado por Kramm (2000) y Schwabe (2002), que indicaron que la máxima infestación por *H. irritans* en la zona sur de Chile ocurre en el mes de Enero. La relación entre el mayor y el menor promedio fue mas estrecha a medida que el número de insectos aumentó, concordando con lo indicado por Pruett et al. (2003), en cuanto a que los insectos tienden a distribuirse de forma más equitativa sobre el rebaño cuando su población aumenta de tamaño.

La correlación entre temperatura y número de insectos es similar a la informada por Maldonado et al. (2006) en la zona central de México y a lo señalado por Guglielmone et al. (1997), quienes indican que el número de insectos por temporada en la región central de Argentina, es más dependiente de la temperatura que de otras variables ambientales.

5.2 Identificación de compuestos volátiles

El resultado de los análisis CG-EM de los extractos no coincidió con lo obtenido por Birkett et al. (2004), quienes indicaron la presencia de mayor cantidad de compuestos en el extracto perteneciente a una vaquilla de baja carga-mosca. En el presente estudio, ambos extractos presentaron el mismo perfil de volátiles, pero fueron cuantitativamente distintos.

Los compuestos *m*- y *p*-cresol identificados en los extractos de volátiles han sido identificados en otros rumiantes, lo cual no es sorprendente dado que se producen como resultado de la descomposición bacteriana de la orina (Madubunyi et al. 1996, Birkett et al. 2004).

La presencia de metilcetonas y sus diferencias cuantitativas entre los extractos volátiles fue inesperada. Algunas de éstas, desde la 2-octanona hasta la 2-undecanona, sólo habían sido descritas por Gikonyo et al. (2002) como componentes EAG activos del olor corporal del búfalo de agua (*Kobus defassa*), rumiante no-hospedero de la mosca tsétsé (*Glossina morsitans morsitans*), por lo que sugirieron su posible rol como alomonas. Igualmente, el ácido pentanoico y butanoico, han sido identificados en el olor del rumiante ya mencionado (Gikonyo et al. 2002, Torr et al. 2006).

La 6-metil-5-hetpen-2-ona es ampliamente conocida por su rol como feromona y kairomona en relaciones insecto-insecto (Wang et al. 2003, Davies et al. 2007) e insecto-planta (Quiroz et al. 1997). Sin embargo, este compuesto también ha sido identificado en el olor corporal de rumiantes. Gikonyo et al (2002) demostraron su presencia en los volátiles provenientes del búfalo de agua. Birkett et al. (2004), por otra parte, lo identificaron en el olor corporal de vaquillas Holstein Friesian, pero sólo en los extractos provenientes de vaquillas caracterizadas como altamente atrayentes para la mosca de los cuernos. Adicionalmente, otros estudios han identificado a 6-metil-5-hepten-2-ona en el olor corporal de seres humanos (Bernier et al. 2002, Logan et al. 2008).

No se identificó 1-octen-3-ol en los extractos analizados, el cual es mayoritariamente expelido en el aliento y orina de los rumiantes. Birkett et al. (2004) identificaron este compuesto en sólo uno de los extractos de volátiles. Estos resultados variables, tanto del estudio de Birkett como del presente, probablemente se deban a la metodología empleada para la captura y desorción de volátiles. Torr et al (2006) señalan que es importante tomar en consideración este aspecto, ya que

resinas como el Porapak, por ejemplo, no son capaces de retener compuestos potencialmente importantes como el CO₂ y otros carbonilos. Este razonamiento es lógico, y se reconoce la importancia de utilizar un amplio rango de técnicas de muestreo para la determinación de semioquímicos. Sin embargo, tal como señalan Logan y Birkett. (2007), debido a que compuestos como el CO₂ y ácido láctico, y en este caso, 1-octen-3-ol, son producidos en forma ubicua por los vertebrados como productos finales del metabolismo primario, es poco probable que sean los responsables de la atracción diferencial de distintos hospederos, siendo más factible que en ello estén involucrados los metabolitos secundarios producidos por el cuerpo o bacterias de la piel, que sí son retenidos por el Porapak.

5.3 EAG

Musca domestica respondió en el EAG a los compuestos metilcetónicos en forma coincidente a la respuesta observada en otra especie Diptera, la mosca tsetsé, en el estudio de Gikonyo et al. (2002).

Registros electroantenográficos de otra especie hematófaga, *Culex sp.*, demostraron que la 2-undecanona es capaz de provocar respuestas en las hembras (Du y Millar 1999), en forma similar a lo obtenido en el presente estudio para la mosca doméstica.

La falta de respuesta al *p*-cresol, coincide con lo publicado por Birkett et al. (2004) para *H. irritans*, que no mostró respuesta EAG ante este compuesto, aún cuando los ensayos conductuales realizados en el mismo estudio en *Musca autumnalis* confirmaron su efecto atractante. En cuanto a los estudios de EAG realizados en otras especies de insectos Diptera hematófagos, Bhasin et al. (2000) indican respuesta EAG dosis-dependiente de *Culicoides sp.* (Diptera: Ceratopogonidae) hacia el *p*-cresol. El mismo estudio determinó que en general, la amplitud de la respuesta EAG

para compuestos metilcetónicos era mayor que aquella producida para 1-octen-3-ol, en forma concordante con lo obtenido en el presente estudio.

5.4 Olfatometrías

Los ensayos de conducta demostraron que *m* y *p*-cresol se comportaron como atrayentes para la mosca de los cuernos, concordando con lo descrito por Hassanali et al. (1986) y Bursell et al. (1988), quienes la informan como una kairomona presente en la orina de hospederos de la mosca tssetsé. Asimismo, Bhasin et al. (2000) indican un umbral y un rango de dosis para el cual *p*-cresol resulta atrayente para especies del género *Culicoides* (10^{-8} a 10^{-7} g), después de lo cual comienza a ser repelente. En este estudio no fue posible probar dosis superiores debido a la contaminación de la sala de olfatometrías.

La repelencia experimentada a la 2-decanona es similar a aquella demostrada por la mosca tsétsé hacia trampas rociadas con compuestos cetónicos de cadena larga en un estudio realizado por Vale (1980). En cuanto a la atracción ejercida por la 2-undecanona, los antecedentes indican actividad contrapuesta para distintas especies. Haas et al. (2006), informaron que 2-undecanona provocó un efecto atrayente hacia los mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi*, cuando fue sometido a prueba en un olfatómetro tubo-Y. La respuesta EAG de mosquitos Culicidae a 2-undecanona, por otra parte, no pudo ser corroborado por ensayos conductuales en el estudio realizado por Du y Millar (1999). En contraposición a estos resultados, Muigai et al (2002) obtuvieron un efecto no sólo repelente a la 2-undecanona, sino tóxico, para la especie *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae), una plaga del tomate.

Aunque no se identificó en los extractos, el 1-octen-3-ol fue utilizado en las olfatometrías debido a su conocido rol como kairomona para varias especies hematófagas. En forma similar a los resultados obtenidos en este estudio, Birkett et al. (2004) determinaron que el umbral de respuesta positiva a 1-octen-3-ol en *M. autumnalis* es de 10^{-6} g en túnel de viento. En tanto, Bhasin et al. (2000), obtuvieron una respuesta dosis-dependiente a 1-octen-3-ol en insectos *Culicoides* con un umbral mínimo de respuesta de 10^{-5} g, superior al observado en el presente estudio para *H. irritans*. En otro estudio (Schoffield y Brady 1997), *S. calcitrans* fue atraída por el compuesto a concentraciones entre $0,0002 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ en experimentos en túnel de viento, viéndose reducida la respuesta del insecto a concentraciones superiores. En el presente estudio no fue posible evaluar la respuesta de *H. irritans* a dosis superiores a la que provocó atracción, debido a las mismas razones expuestas para *m* y *p*-cresol, la contaminación del sistema. Sin embargo, es muy probable que de haberlo hecho, se hubiese obtenido una reducción en el número de insectos atraídos tal como ha sido descrito para otros insectos hematófagos (Balckwell et al. 1996).

Aunque no se obtuvo respuesta EAG para *M. domestica*, 6-metil-5-hepten-2-ona fue sometido a prueba en el olfatómetro debido a los antecedentes bibliográficos que sugieren su implicancia en la atracción diferencial del ganado hacia distintas especies de moscas del ganado (Birkett et al 2004). Sin embargo, en este caso, tampoco hubo respuesta conductual por parte de *H. irritans* en el olfatómetro tubo en Y. Un estudio reciente comparó el perfil de volátiles de personas “atrayentes” y “no-atrayentes” para el mosquito *Aedes aegypti*, demostrando que 6-metil-5-hepten-2-ona se encontraba presente en el perfil de volátiles de ambas muestras, aunque una cantidad significativamente mayor en las personas “no-atrayentes” (Logan et al. 2008), en forma similar a lo encontrado en este estudio para animales de AC y BC, en donde el extracto proveniente del animal de BC contenía mayor cantidad de este compuesto.

Es importante aclarar que en la revisión bibliográfica sólo se encontró un estudio conductual en *H. irritans*, pero diseñado para identificar feromonas de contacto (Mackley et al. 1981). Es así como el presente estudio constituye el primero en aportar resultados sobre estudios conductuales en respuesta a compuestos volátiles utilizando un olfatómetro del tipo tubo en Y

5.5 Ensayos de campo

Los ensayos de campo se realizaron con el propósito de evaluar en forma preliminar el desempeño de los distintos compuestos estudiados según la actividad biológica demostrada en el laboratorio. De esta manera, se logró modificar y perfeccionar la metodología empleada anteriormente por Birkett et al (2004), facilitando la visualización dinámica, en cortos períodos de tiempo, de los efectos de los compuestos en la población de mosca de los cuernos, a diferencia de lo realizado en el estudio mencionado, donde los efectos se evaluaron con un día de diferencia. Los resultados obtenidos demuestran que es posible modificar la respuesta de poblaciones de *H. irritans* mediante tratamientos estímulo-disuasivos, de forma similar a lo descrito en el estudio de Birkett et al. (2004). Por primera vez se reportan resultados de la respuesta en campo de *H. irritans* a *m*-y *p*-cresol.

Es sabido que los semioquímicos pueden ser atrayentes o repelentes según la dosis dispensada (Vale y Hall 1985); cuando son aplicados en concentraciones más altas que las que se presentan naturalmente, pueden actuar como repelentes o interruptores del comportamiento (Gikonyo et al. 2000, Gikonyo et al. 2002). Los resultados contradictorios aquí obtenidos, entre los experimentos de campo y los ensayos de laboratorio para el *p*- y *m*- cresol pueden atribuirse a la alta dosis utilizada en campo con respecto a la usada en el tubo en Y, lo que ejercería un efecto de

repelencia o enmascaramiento (Logan y Birkett 2007). Se sabe que los insectos fitófagos son capaces de detectar mezclas de volátiles emitidos por plantas hospederas en relaciones específicas, dentro de una compleja base de compuestos volátiles emitidos por plantas no-hospederas (Logan y Birkett 2007). Una hipótesis planteada para interacciones insecto-planta es que los olores serían emitidos por el hospedero en forma de “paquetes”, de tal manera que los receptores olfatorios que respondieran simultáneamente indicarían la presencia de un hospedero, mientras que un retardo en la estimulación, no provocaría respuesta en los mismos receptores (Bruce et al. 2005). Probablemente, la coincidencia de detección podría ser un mecanismo utilizado por insectos hematófagos.

La disminución en el número poblacional de insectos sobre el rebaño en respuesta a compuestos semioquímicos, coincide también con los resultados de Jensen et al. (2004), quienes lograron igual efecto al sacar animales de alta carga de un rebaño y reemplazarlos por animales de baja-carga. No está claro qué le sucede a los insectos al disminuir la población en respuesta a los semioquímicos, según Jensen et al. (2004), una posibilidad es que los insectos hagan abandono del rebaño, y la otra es que simplemente pasen menos tiempo sobre los hospederos y más tiempo sobrevolando. A partir de los resultados de este estudio, no es posible deducir la respuesta, sin embargo, sí se puede concluir que el efecto de los tratamientos sobre los animales produce una respuesta inmediata en los insectos. A diferencia del estudio de Jensen et al. (2004), la respuesta de *H. irritans* en este estudio fue evaluada dentro de las horas inmediatas, mientras que en el primero, las evaluaciones fueron realizadas con días de diferencia, por lo que en ese caso la discusión se centró en si el efecto de disminución de insectos se debió al natural proceso de mortalidad de la población y a un menor ingreso de insectos recién emergidos al rebaño.

La respuesta de *H. irritans* a *m*- y *p*-cresol en campo abre nuevas perspectivas para la utilización de estos y otros compuestos aún por evaluar, en la utilización de trampas de olor. Estudios más acabados en campo permitirán definir el umbral de respuesta de la mosca de los cuernos a 2-decanona y 2-undecanona.

5.6 OBP^s

La visualización de una banda proteica específica de las antenas y su similitud con la OBP identificada en *Cx. Quiquefasciatus*, sugieren que esta proteína específica es una OBP. Esto confirmaría que la mosca de los cuernos efectivamente utiliza las señales odoríferas del ambiente, y avalaría lo demostrado en los ensayos conductuales y de campo, en cuanto a que los semioquímicos emitidos por el hospedero cumplen un rol en la relación parásito-hospedero.

Debido a su papel en los mecanismos de detección de semioquímicos, las OBP^s se proyectan como herramientas invaluables en el screening de repelentes y atrayentes de *H. irritans*, tal como se hace en otras especies de insectos (Leal 2005). Las perspectivas asociadas a estos hallazgos se relacionan con el mejoramiento y la creación de nuevas estrategias de control. La elaboración de una librería de compuestos atrayentes y repelentes para la mosca de los cuernos, por ejemplo, facilitaría el desarrollo de trampas de olor para controlar la población de moscas. Por otra parte, una utilidad directa asociada a la identificación de OBP^s, es su potencial uso como blanco para controlar las poblaciones de moscas en campo. Experimentos realizados en mutantes de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), carentes de la OBP *lush*, demostraron que es posible manipular la interacción ligando/OBP para impedir la detección de una feromonas sexual por parte de los receptores olfatorios de la mosca (Xu 2005). La identificación de OBP^s en *H.*

irritans podría conducir, por ejemplo, al desarrollo de antagonistas de las OBPs responsables de la detección de semioquímicos emitidos por el hospedero. Otra posibilidad es el desarrollo de moscas mutantes, con OBPs modificadas para la detección de hospederos poco adecuados, de tal manera de disminuir el éxito alimentario y con ello la población de moscas.

Este es el primer informe sobre la presencia de proteínas con características OBPs en *H. irritans* como primer paso hacia su identificación y caracterización. Los resultados aquí presentados abren todo un campo de posibilidades para la investigación sobre las bases moleculares de la olfacción en *Haematobia irritans*.

5.7 Preferencia por el hospedero

Respecto a la diferencia intraespecífica en la “atractividad” del hospedero, es interesante destacar los resultados mostrados para el animal V5804, que formó parte de los tres rebaños estudiados durante las tres temporadas y que en todas ellas, aparece en el extremo superior del ranking entre las 3 primeras posiciones, por lo que fue clasificado como AC para los tres rebaños. Este hecho, sin embargo, no se repite para otros animales como el V3404, quien en la primera temporada se ubicó en segunda posición en el extremo más bajo del ranking de carga-mosca, pero que subió su posición en la segunda temporada hasta ubicarse en el cuartil de los animales con mayor carga-mosca. Según Steelman et al. (1993), la edad no es un factor influyente en la carga-mosca de los individuos de un rebaño, ya que ellos identificaron animales de alta y baja carga-mosca en individuos con edades que fluctuaban entre los 2-14 años. Los resultados presentados para el animal V5804 confirmarían esta afirmación, ya que su posición en el ranking no varió a pesar de que fue aumentando su edad. Sin embargo, la variación demostrada por el individuo V3404, parecería avalar lo afirmado por otros autores que demostraron que el ganado de mayor tamaño,

es más atrayente para los insectos hematófagos, que el ganado de menor edad (Prior y Torr 2002, Schofield y Torr 2002). Estas aparentes contradicciones, en realidad no serían tales. Un reciente estudio realizado (Torr et al. 2006), en el cual se procuró aislar las señales visuales emitidas por el ganado, demostró que el olor del hospedero influye de manera importante en la atracción diferencial del ganado hacia la mosca tsetse y del establo, y que esto es independiente de la edad y/o tamaño del hospedero.

La preferencia por algunos hospederos por parte de la mosca de los cuernos está condicionada a un número de factores relacionados tanto al hospedero como al insecto, dentro de los cuales, el olor corporal juega un rol importante (Steelman et al. 1996, Birkett et al. 2004, Torr et al. 2006), tales como el sistema inmune y comportamiento del hospedero (Mullens et al. 2006) y el éxito alimentario de los insectos (Pruett et al. 2003, Untalan et al. 2006). Con el fin de evitar la interferencia de los factores no relacionados al olor del hospedero, en la medida de lo posible, en este estudio se seleccionó un rebaño homogéneo donde todos los individuos poseían un patrón de color similar, típico de la raza Holstein Friesian, lo que ayudó a mantener la proporción blanca y negra en los individuos. A pesar de estas medidas, la variación intraespecífica en los tres rebaños analizados fue visible.

Estudios previos indicaban que existían atrayentes no identificados en el olor del ganado que otorgaban la variabilidad individual. Birkett et al. (2004), indicaron que compuestos como el 1-octen-3-ol y 6-metil-5-hepten-2-ona podrían estar involucrados, sin embargo sus apreciaciones no pudieron ser corroboradas por estudios conductuales. Los resultados del presente estudio no permiten refutar ni aceptar lo señalado por el estudio de Birkett, sin embargo se demostró la presencia de al menos dos semioquímicos no reportados previamente para el ganado: 2-

undecanova y 2-decanona, que de acuerdo a lo demostrado en los estudios conductuales, estarían involucrados en la atracción diferencial de los hospederos. El asignar un rol de kairomonas o alomonas a dichos compuestos no es un objetivo fácil de lograr en una investigación preliminar como ésta, debido a la interacción que puede ocurrir entre los componentes de un perfil de volátiles tan complejo como el emitido por hospederos vertebrados. Futuras investigaciones son requeridas para lograr este objetivo.

6 PROYECCIONES

La relación parásito-hospedero de *Haematobia irritans* involucra más de un factor asociado a ambas partes. Ciertamente, es necesario seguir profundizando en los estudios relacionados al aspecto químico de esta relación ecológica, de tal manera de identificar con mayor precisión los compuestos allí involucrados. De la misma manera, el realizar más estudios de campo con los compuestos ya identificados permitirá en un futuro desarrollar un método de control alternativo para la mosca de los cuernos, que podrá ser utilizado ante la presencia de resistencia a los insecticidas o para retardar la aparición de ella. La necesidad de contar con este tipo de metodología en sistemas de producción orgánica hace muy atrayente este campo de investigación y desarrollo tecnológico.

Los resultados conducentes a la identificación de OBPs en *H. irritans* abren la puerta para una nueva línea de investigación en el campo de la proteómica aplicada al reconocimiento de las proteínas involucradas en el proceso de reconocimiento de los semioquímicos y la química ecológica reversa.

A partir de la información recaudada durante el desarrollo de este proyecto se hizo evidente un notable vacío en cuanto a la generación de información local relacionada con la mosca de los cuernos en cuanto a su distribución, epidemiología y estado de resistencia a insecticidas. La realización de investigaciones que conduzcan a la obtención de información permitirá elaborar estrategias de control más efectivas contra *Haematobia irritans*.

7 CONCLUSIONES

- En el estudio de la distribución de *Haematobia irritans* sobre el rebaño durante tres temporadas, se confirmó que su distribución sobre el ganado no es equitativa, existiendo individuos dentro de un mismo rebaño que pueden ser caracterizados según su nivel de infestación, ya que este rasgo permanece constante en el tiempo.
- El estudio de captura e identificación de compuestos volátiles permitió estandarizar el método de captura headspace para animales vertebrados. El análisis de los extractos volátiles desde vaquillas Holstein Friesian con distinto nivel de infestación por *H. irritans* en el CG-MS reveló la presencia tanto de compuestos previamente identificados como *m*-y *p*-cresol y 6-metil-5-hepten-2-onal, como de compuestos del tipo metilcetonícos hasta ahora no informados para estos rumiantes: 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona y 2-undecanona.
- Los estudios de respuesta electroantenográfica de *Musca domestica* ante distintos compuestos idénticos a los identificados en el perfil de volátiles de vaquillas Holstein Friesian permitieron una primera evaluación de su actividad biológica. Se registró respuesta EAG para 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona y 2-undecanona, pero no para *p*-cresol y 6-metil-5-hepten-2-onal. Además, se evaluó la respuesta para 1-octen-3-ol, debido a su conocido rol como kairomona, con idénticos resultados negativos.

- Los bioensayos olfatométricos en tubo-Y en laboratorio determinaron que *m*- y *p*-cresol, 1-octen-3-ol y 2-undecanona actuarían como atrayentes para *H. irritans*, mientras que 2-decanona sería repelente. La respuesta de *H. irritans* a compuestos volátiles emitidos por el hospedero no ha sido evaluada previamente en ensayos olfatométricos, por lo que los resultados presentados en esta publicación constituyen el primer informe al respecto. De la misma manera, los resultados de esta investigación validan el uso del tubo en Y como un método adecuado para estudios conductuales en la mosca de los cuernos.
- El estudio de la actividad en campo de los compuestos anteriormente evaluados en el laboratorio, permitió confirmar que es posible manipular la población de *H. irritans* en el rebaño mediante la aplicación de compuestos con actividad biológica sobre este insecto, como *m*- y *p*-cresol. El conocimiento generado en el experimento de campo permite vislumbrar nuevas alternativas de control del tipo estímulo-disuasivo para *H. irritans*, basadas en la utilización de repelentes y/o atrayentes.
- Por primera vez se informa la presencia de proteínas del tipo OBP en *H. irritans*, lo que confirma el rol importante que cumplen las señales odoríferas para este insecto, y realza los resultados obtenidos en los ensayos conductuales y de campo realizados en esta investigación. De esta manera, los resultados que aquí se presentan contribuyen a la apertura de nuevas líneas de investigación destinadas al desarrollo de métodos alternativos de control que involucren la utilización y manipulación de las OBPs .

- La diferencia intraespecífica dentro de un rebaño en cuanto a la atracción individual hacia *H. irritans* se debería en parte a la diferencia cuantitativa en la emisión de compuestos volátiles como 2-undecanona y 2-decanona. De esta manera, se han identificado 2 nuevos semioquímicos para *Haematobia irritans*, lo que sin duda, aporta valiosa información al conocimiento actual de la relación química entre este parásito y el ganado.

8 REFERENCIAS

- Agelopoulos, N., M. A. Birkett, A. J. Hick, A. M. Hooper, J. A. Pickett, E. M. Pow, L. E. Smart, D. W. M. Smiley, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock. 1999. Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide Science* 55: 225-235.
- Ahrens, E. H. 1979. Horn fly control with an insecticide impregnated ear tag. *Southwestern Entomologist* 2: 8-10.
- Ahrens, E. H., J. Cocke. 1979. Season long horn fly control with and insecticide impregnated ear tag. *Journal of Economic Entomology* 72: 215.
- Artigas, J. 1994. Mosca de los cuernos. *En Universidad de Concepción [ed.], Entomología Económica: Insectos de interés agrícola, forestal, médico veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos)*, Concepción, Chile, pp. 277-279.
- Azevedo, J. L., W. Maccheroni Jr, J. O. Pereira, W. Luiz de Araújo. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3: 40-65.
- Bernier, U. R., D. L. Kline, C. E. Schreck, R. A. Yost, D. R. Barnard. 2002. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from humans that differ in attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 18: 186-95.
- Bhasin, A., A. J. Mordue, W. Mordue. 2000. Electrophysiological and behavioural identification of host kairomones as olfactory cues for *Culicoides impunctatus* and *C. nubeculosus*. *Physiological Entomology* 25: 6-16.
- Birkett, M. A., N. Agelopoulos, K. M. V. Jensen, J. B. Jespersen, J. A. Pickett, H. J. Prijs, G. Thomas, J. J. Trapman, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock. 2004. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 313-322.
- Blackwell, A., C. Dyer, C., A. J. Mordue (Luntz), L. J. Wadhams, W. Mordue. 1996. The role of 1-octen-3-ol as a host odour attractant for the biting midges, *Culicoides impuctatus* Goetghebuer and the interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by females. *Physiological entomology* 21: 15-19

- Bloomquist, J. R. 1996. Insecticides: Chemistries and Characteristics. En E. B. Radcliffe y W. D. Hutchison [eds.], Radcliffe's IPM World Textbook. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Brown, A. H., Jr, C. D. Steelman, Z. B. Johnson, C. F. Rosenkrans, Jr, T. M. Brasuell. 1992. Estimates of repeatability and heritability of horn fly resistance in beef cattle. Journal of Animal Science 70: 1375-1381.
- Bruce, T J., L. J. Wadhams, C. M. woodcock. 2005. Insect host location: a volatile situation. Trends in Plant Science 10: 269-274.
- Bulman, M., J. Lamberti, J. A. Margueritte, J. L. Filippi. 1999. *Haematobia irritans irritans* (L.1758) y su control en Argentina: pasado, presente y futuro. Therios 28: 190-198.
- Bull, D. L., R. L. Harris, N. W. Pryor. 1988. The contribution of metabolism to pyrethroid and DDT resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). Journal of Economic Entomology 81: 449-458.
- Burns, E. C., B. H. Wilson. 1963. Field resistance of horn flies to the organic phosphate insecticide ronnel. Journal of Economic Entomology 56: 718.
- Bursell, E., A. J. E. Gough, P. S. Beevor, A. Cork, D. R. Hall, G. A. Vale. 1988. Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera, Glossinidae). Bulletin of Entomological Research 78: 281-291.
- Byford, R. L., M. E. Craig, B. L. Crosby. 1992. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. Journal of Animal Science 70: 597-602.
- Byford, R. L., M. E. Craig, S. M. DeRouen, M. D. Kimball, D. G. Morrison, W. E. Wyatt, L. D. Foil. 1999. Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). International Journal for Parasitology 29: 125-135.
- Campano, S., P. Avalos. 1994. Presencia de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en ganado bovino en Chile. Parasitología al Día 18: 59-61.
- Campbell, J. B. 1976. Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weaning weights of calves. Journal of Economic Entomology 69: 711-2.
- Cicchino, A. C., A. H. Abrahamovich, A. H. Torres, J. L. Nuñez, O. H. Prieto. 1983. Mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (Linneaus 1758), (Diptera:Muscidae). Contribuciones

para su conocimiento en la Argentina I: aspectos morfológicos básicos. Revista de Medicina Veterinaria 75: 170-186.

Conway, G. R., H. N. Comins. 1979. Resistance to pesticides. 2. Lessons in strategy from mathematical models. Span 22: 53-55.

Costantini, C., M. A. Birkett, G. Gibson, J. Ziesmann, N. F. Sagnon, H. A. Mohammed, M. Coluzzi, J. A. Pickett. 2001. Electroantennogram and behavioural responses of the malaria vector *Anopheles gambiae* to human-specific sweat components. Medical and Veterinary Entomology 15: 259-266.

Cupp, M. S., E. W. Cupp, C. Navarre, N. Wisnewski, K. S. Brandt, G. M. Silver, D. Zhang, V. Panangala. 2004. Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. Vaccine 22: 2285-2297.

Christensen, C. M., R. C. Dobson. 1979. Effects of testosterone propionate on the sebaceous glands and subsequent attractiveness of Angus bulls and steers to horn flies [(*Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae)]. Journal of Kansas Entomology Society 52: 386.

Daisy, B. H., G. A. Strobel, U. Castillo, D. Ezra, J. Sears, D. K. Weaver, J. B. Runyon. 2002. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 148: 3737-3741.

Davies, T. G. E., L. M. Field, P. N. R. Usherwood, M. S. Williamson. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life 59: 151-162.

Denholm, I., M. W. Rowland. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in Arthropods: Theory and Practice. Annual Review of Entomology 37: 91-112.

DeRouen, S. M., L. D. Foil, J. W. Knox, J. M. Turpin. 1995. Horn fly (Diptera: Muscidae) control and weight gains of yearling beef cattle. Journal of Economic Entomology 88: 666-8.

DeRouen, S. M., L. D. Foil, A. J. MacKay, D. E. Franke, D. W. Sanson, W. E. Wyatt. 2003. Effect of horn fly (*Haematobia irritans*) control on growth and reproduction of beef heifers. Journal of Economic Entomology 96: 1612-6.

Doube, B. M. 1984. The effect of breed and coat colour on numbers of the buffalo fly, *Haematobia exigua* (Diptera: Muscidae) on bovine hosts. Journal of Australian Entomologist Society 23: 39-45.

- Du, Y.-J., J. G. Millar. 1999. Electroantennogram and oviposition bioassay responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to chemicals in odors from Bermuda grass infusions. Journal of Medical Entomology 36: 158-166.
- FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina., pp. 59. In Estudio FAO Producción y sanidad animal [ed.], Roma.
- Farnsworth, W. R., M. G. Collett, I. S. Ridley. 1997. Field survey of insecticide resistance in *Haematobia irritans exigua* de Meijere (Diptera: Muscidae). Australian Journal of Entomology 36: 257-261.
- Foil, L. D., J. A. Hogsette. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. Revue scientifique et technique 13: 1125-58.
- Gibson, G., S. J. Torr. 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. Medical and Veterinary Entomology 13: 2-23.
- Gikonyo, N. K., A. Hassanali, P. G. Njagi, R. K. Saini. 2000. Behaviour of *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae) on waterbuck *Kobus defassa* Ruppel and feeding membranes smeared with waterbuck sebum indicates the presence of allomones. Acta Tropica 77: 295-303.
- Gikonyo, N. K., A. Hassanali, P. G. Njagi, P. M. Gitu, J. O. Midiwo. 2002. Odor composition of preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck) hosts of some Savanna tsetse flies. Journal of Chemical Ecology 28: 969-81.
- Gillespie, B. E., S. P. Oliver, W. E. Owens, S. C. Nickerson. 1999. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. Journal of Dairy Science 82: 1581-1585.
- Gough, J. M., R. J. Akhurst, D. J. Ellar, D. H. Kemp, G. L. Wijffels. 2002. New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. Biological Control 23: 179-189.
- Guglielmone, A., O. Anziani, A. Mangold, M. Volpogni. 1998a. Perjuicios económicos provocados por la "mosca de los cuernos" (*Haematobia irritans*). INTA EEA Rafaela. Información técnica N°146.
- Guglielmone, A. A., O. S. Anziani, A. J. Mangold, R. E. Giorgi, M. M. Volpogni, S. G. Flores. 1997. Seasonal variation of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. Bulletin of Entomological Research 87: 55-59.

- Guglielmone, A., O. Anziani, A. Mangold, M. Volpogni, G. Zimmermann. 1998b. Algunas alternativas a los piretroides sintéticos para el control de la "mosca de los cuernos" (*Haematobia irritans*) en diferentes categorías de bovinos. Publicación Miscelánea. Información Técnica para Productores (1997-1998) 89: 97.
- Guglielmone, A. A., M. E. Castelli, M. M. Volpogni, O. S. Anziani, S. G. Flores. 1999a. Cypermethrin pour-on synergized with piperonyl butoxide: effects on *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) natural populations resistant to cypermethrin. Veterinary Parasitology 83: 65-72.
- Guglielmone, A. A., E. Gimeno, J. Idiart, W. P. Fisher, M. M. Volpogni, O. Quaino, O. S. Anziani, S. G. Flores, O. Warnke. 1999b. Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. Medical and Veterinary Entomology 13: 324-329.
- Guglielmone, A. A., E. Curto, O. S. Anziani, A. J. Mangold. 2000. Cattle breed-variation in infestation by the horn fly *Haematobia irritans*. Medical and Veterinary Entomology 14: 272-6.
- Haas, S., S. Schwab, M. Geier. 2006. 2-Undecanon: ein neuartiger Lockstoff für anthropophile Stechmücken. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie 15: 127-130.
- Harris, R. L., E. D. Frazer, O. H. Graham. 1966. Resistance to ronnelin a strain of horn flies. Journal of Economic Entomology 59: 387-390.
- Harris, R. L., E. D. Frazar, P. D. Grossman. 1968. Notes on the mating habits of the horn fly. Journal of Economic Entomology 61: 1639-1640.
- Harvey, T. L., J. R. Brethour. 1979. Effect of horn flies on weight gains of beef cattle. Journal of Economic Entomology 72: 516-8.
- Hassanali, A., P. G. M. Dowell, M. L. A. Owaga, R. K. Saini. 1986. Identification of tsetse attractants from excretory products of a wild host animal, *Syncerus caffer* Insect Science and its Application 7: 5-9.
- Haufe, W. O. 1979. Reduced productivity of beef cattle infested with horn flies. Ed. G. C. R. Croome and N. D. Holmes. Agriculture Canada Research Station, Lethbridge, Alberta, 1979. p.61-63.
- Haufe, W. O. 1982. Growth of range cattle protected from horn flies (*Haematobia irritans*) on behavior of cattle. Journal of Animal Science 62: 567-573.

- Haufe, W. O. 1986. Productivity of the cow-calf unit in range cattle protected from horn flies, *Haematobia irritans* (L.), by pesticidal ear tags. Canadian Journal of Animal Science 66: 575-589.
- Hogsette, J. A., D. L. Prichard, J. P. Ruff, C. J. Jones. 1991. Development of a refillable ear tag for control of horn flies (Diptera: Muscidae) on beef cattle. Journal of Controlled Release 15: 167-176.
- INTA. 1995. Análisis general de problemas en los cueros, presuntamente provocados por la *Haematobia irritans* de acuerdo a la información presentada por empresas curtidoras. Servicio Nacional de Sanidad Animal, INTA, Argentina.
- Ishida, Y., A. J. Cornel, W. S. Leal. 2002. Identification and cloning of a female antenna-specific odorant-binding protein in the mosquito *Culex quinquefasciatus* Journal of Chemical Ecology 28: 867-71.
- Jensen, K. M., J. B. Jespersen, M. A. Birkett, J. A. Pickett, G. Thomas, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock. 2004. Variation in the load of the horn fly, *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of individual heifers. Medical and Veterinary Entomology 18: 275-80.
- Jonsson, N. N., D. G. Mayer. 1999. Estimation of the effects of buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*) on the milk production of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data. Medical and Veterinary Entomology 13: 372-376.
- Kerlin, R. L., P. G. Allingham. 1992. Acquired immune response of cattle exposed to buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). Veterinary Parasitology 43: 115-129.
- Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Annual Review of Entomology 43: 243-70.
- Koschier, E. H., W. J. De Kogel, J. H. Visser. 2000. Assessing the attractiveness of volatile plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis* Journal of Chemical Ecology 26: 2643-2655.
- Kramm, C. A. 2000. Actividad de vuelo de *Stomoxys calcitrans* (L.) y niveles de infestación de *Haematobia irritans* (L.), su relación con factores ambientales e influencia de estas especies sobre el comportamiento de vacas lecheras, pp. 149, Escuela de Agronomía. Universidad Austral de Chile, Valdivia.

- Kunz, S. E., J. L. Eschle, J. R. Cunningham. 1975. Methods of estimating sterility in a field population of horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 12: 513-7.
- Kunz, S. E., H. G. Kinzer, J. A. Miller. 1983. Areawide cattle treatments on populations of horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 76: 525-8.
- Kunz, S. E., R. L. Harris, B. F. Hogan, J. E. Wright. 1977. Inhibition of development in a field population of horn flies treated with diflubenzuron. *Journal of Economic Entomology* 70: 298-300.
- Kunz, S. E., J. A. Miller, P. L. Sims, D. C. Meyerhoeffer. 1984. Economics of controlling horn flies (Diptera:Muscidae) in range cattle management. *Journal of Economic Entomology* 77: 657-660.
- Kuramochi, K. 2000. Ovipositional behavior of the horn fly (Diptera: Muscidae) in the field. *Journal of Medical Entomology* 37: 461-466.
- Leal, W. S. 2005. Pheromone Reception, pp. 1-36. *In* Springer [ed.], *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*, Heidelberg.
- Leite, R. C., Z. Rodriguez, J. L. H. Faccini, P. R. Oliveira, A. A. Fernandes. 1998. First report of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera : Muscidae) as vector of *Dermatobia hominis* (L.jr.) (Diptera : Cuterebridae) in Minas Gerais, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 761-762.
- Lemke, L. A., J. B. Kissam. 1988. Impact of red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) predation on horn flies (Diptera: Muscidae) in a cattle pasture treated with pro-drone. *Journal of Economic Entomology* 81: 855-8.
- Li, A. Y., F. D. Guerrero, J. H. Pruett. 2007. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 147-155.
- Logan, J. G., M. A. Birkett. 2007. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science* 63: 647-657.
- Logan, J. G., M. A. Birkett, S. J. Clark, S. Powers, N. J. Seal, L. J. Wadhams, A. J. Mordue Luntz, J. A. Pickett. 2008. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology* 34: 308-22.

- Lysyk, T. J. 1992. Effect of larval rearing temperature and maternal photoperiod on diapause in the horn fly (Diptera, Muscidae). *Environmental Entomology* 21: 1134-1138.
- Lysyk, T. J. 2000. Comparison of sample units for estimating population abundance and rates of change of adult horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 37: 299-307.
- Lysyk, T. J., L. Kalischuk-Tymensen, L. B. Selinger, R. C. Lancaster, L. Wever, K. J. Cheng. 1999. Rearing stable fly larvae (Diptera: Muscidae) on an egg yolk medium. *Journal of Medical Entomology* 36: 382-8.
- Mackley, J. W., D. A. Carlson, J. F. Butler. 1981. Identification of the cuticular hydrocarbons of the horn fly and assays for attraction. *Journal of Chemical Ecology* 7: 669-683.
- Madubunyi, L. C., A. Hassanali, W. Ouma, D. Nyarango, J. Kabii. 1996. Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Journal of Chemical Ecology* 22: 1187-1199.
- Maldonado Simán, E., R. Améndola Massiotti, J. A. Cadena Meneses, L. Bermúdez Villanueva, S. E. Kunz. 2006. Preliminary observations on the seasonal fluctuation of *Haematobia irritans* in Central Mexico. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 16: 31-38.
- Mariategui, G. 2001. *Ontherus sulcator* (Fabricius) su importancia en el control de *Haematobia irritans* (Linneus) en campos de la cuenca del río salado., Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Buenos Aires.
- Mendes, J., A. X. Linhares. 1999. Diapause, pupation sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 185-90.
- Miller, J. A., D. D. Oehler, A. J. Siebenaler, S. E. Kunz. 1986. Effect of ivermectin on survival and fecundity of horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 79: 1564-9.
- Miller, J. A., R. B. Davey, D. D. Oehler, J. M. Pound, J. E. George. 2003. Efficacy of the ivomec SR bolus for control of horn flies (Diptera: Muscidae) on cattle in South Texas. *Journal of Economic Entomology* 96: 1608-11.
- Miller, J. R., R. S. Cowles. 1990. Stimulo-deterrrent diversion: a concept and possible application to onion maggot control. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1367-1382.

- Muigai, S. G., D. J. Schuster, J. C. Snyder, J. W. Scott, M. J. Bassett, H. J. McAuslane. 2002. Mechanisms of resistance in *Lycopersicon* germplasm to the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica* 30: 347-360.
- Mullens, B. A., K. S. Lii, Y. Mao, J. A. Meyer, N. G. Peterson, C. E. Szijj. 2006. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 122-137.
- Nalyanya, G., C. B. Moore, C. Schal. 2000. Integration of repellents, attractants, and insecticides in a “push-pull” strategy for managing *German cockroach* (Dictyoptera: Blattellidae) populations. *Journal of Medical Entomology* 37: 427-434.
- Owens, W. E., S. P. Oliver, B. E. Gillespie, C. H. Ray, S. C. Nickerson. 1998. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research* 59: 1122-4.
- Oyarzún, M. P., A. Quiroz, M. A. Birkett. 2008. Insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae): alternative control strategies. *Medical and Veterinary Entomology*. *In Press*.
- Pickett, J. A., L. J. Wadhams, C. M. Woodcock. 1998. Insect supersense: mate and host location by insects as model systems for exploiting olfactory interactions. *The biochemist* August: 8-13.
- Presley, S. M., F. W. Knapp, J. A. Boling, J. G. Burg. 1996. Effects of the horn fly (Diptera: Muscidae) on physiological and nutritional responses of beef steers: continuous fly population levels. *Journal of Economic Entomology* 89: 138-43.
- Prior, A., S. Torr. 2002. Host selection by *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* feeding on cattle in Zimbabwe. *Medical and Veterinary Entomology* 16: 207.
- Pruett, J. H. 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites-a review. *International Journal for Parasitology* 29: 25.-32.
- Pruett, J. H., C. D. Steelman, J. A. Miller, J. M. Pound, J. E. George. 2003. Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. *Veterinary Parasitology* 116: 251-258.
- Quiroz, A., J. Pettersson, J. A. Pickett, L. J. Wadhams, H. M. Niemeyer. 1997. Semiochemicals mediating spacing behavior of bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* feeding on cereals. *Journal of Chemical Ecology* 23: 2599-2607.

- Quisenberry, S. S., D. R. Strohbehn. 1984. Horn fly (Diptera: Muscidae) control on beef cows with permethrin-impregnated ear tags and effect on subsequent calf weight gains. *Journal of Economic Entomology* 77: 422-4.
- Quisenberry, S. S., J. A. Lockwood, R. L. Byford, H. K. Wilson, T. C. Sparks. 1984. Pyrethroid resistance in the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 77: 1095–1098.
- Riley, P. J., R. L. Byford, D. M. Hallford, J. W. Campbell, E. Perez-Eguia. 1994. Serum constituent profiles of beef heifers infested with horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 1564-8.
- Sanson, D. W., A. A. DeRosa, G. R. Oremus, L. D. Foil. 2003. Effect of horn fly and internal parasite control on growth of beef heifers. *Veterinary Parasitology* 117: 291-300.
- Schmidt, C. D., S. E. Kunz, H. D. Petersen, J. L. Robertson. 1985. Resistance of horn flies (Diptera: Muscidae) to permethrin and fenvalerate. *Journal of Economic Entomology* 78: 402-6.
- Schofield, S., S. Torr. 2002. A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Medical and Veterinary Entomology* 16: 177-185.
- Schofield, S., A. Cork, J. Brady. 1995. Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odor. *Physiological Entomology* 20: 273-280.
- Schofield, S., C. Witty, J. Brady. 1997. Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the activity of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Physiological Entomology* 22: 256-260.
- Schreiber, E. T., J. B. Campbell. 1986. Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host color and time of day. *Environmental Entomology* 15: 1307-1309.
- Schreiber, E. T., J. B. Campbell, S. E. Kunz, D. C. Clanton, D. B. Hudson. 1987. Effects of horn fly (Diptera: Muscidae) control on cows and gastrointestinal worm (Nematode: Trichostrongylidae) treatment for calves on cow and calf weight gains. *Journal of Economic Entomology* 80: 451-4.
- Schwabe, A. F. 2002. Comparacion de las aplicaciones tradicional y precoz de insecticidas para controlar *Haematobia irritans* en el sur de Chile., pp. 31, Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia.

- Shaw, S. A., I. A. Sutherland. 2006. The prevalence of *Stephanofilaria* sp. in buffalo fly, *Haematobia irritans exigua*, in Central Queensland. Australian Journal of Entomology 45: 198-201.
- Sheppard, D. C. 1983. Fenvalerate and flucythrinate resistance in horn fly population. Journal of Agricultural Entomology 1: 305-310.
- Sheppard, D. C., J. A. Joyce. 1992. High levels of pyrethroid resistance in horn flies (Diptera: Muscidae) selected with cyhalothrin. Journal of Economic Entomology 85: 1587-93.
- Sheppard, D. C., J. A. Joyce. 1998. Increased susceptibility of pyrethroid resistant horn flies (Diptera: Muscidae) to chlorfenapyr. Journal of Economic Entomology 91: 398-400.
- Silva, J. J., J. Mendes. 2002. Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlandia, State of Minas Gerais, Brazil. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz 97: 679-82.
- Sparks, T. C., S. S. Quisenberry, J. A. Lockwood, R. L. Byford, R. T. Roush. 1985. Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans*. Journal of Agricultural Entomology 2: 217-233.
- Stear, M. J., M. J. Newman, F. W. Nicholas, S. C. Brown, R. G. Holroyd. 1984. Tick resistance and the major histocompatibility system. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 62: 47.
- Steelman, C. D., A. H. Brown, Jr., E. E. Gbur, G. Tolley. 1991. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. Journal of Economic Entomology 84: 1275-82.
- Steelman, C. D., E. E. Gbur, G. Tolley, A. H. Brown, Jr. 1993. Individual variation within breeds of beef cattle in resistance to horn fly (Diptera: Muscidae). Journal of Medical Entomology 30: 414-20.
- Steelman, C. D., M. A. Brown, E. E. Gbur, G. Tolley. 1997. The effects of hair density of beef cattle on *Haematobia irritans* horn fly populations. Medical and Veterinary Entomology 11: 257-64.
- Steelman, C. D., R. W. Mcnew, M. A. Brown, G. Tolley, J. M. Phillips. 1994. Efficacy of Brahman breeding in the management of insecticide resistant horn flies (Diptera, Muscidae) on beef-cattle. Journal of Economic Entomology 87: 7-14.

- Steelman, C. D., C. J. Brown, R. W. McNew, E. E. Gbur, M. A. Brown, G. Tolley. 1996. The effects of selection for size in cattle on horn fly population density. *Medical and Veterinary Entomology* 10: 129-36.
- Steelman, C. D., R. W. McNew, R. B. Simpson, R. W. Rorie, J. M. Phillips, C. F. Rosenkrans. 2003. Evaluation of alternative tactics for management of insecticide resistant horn flies (Diptera : Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 96: 892-901.
- Steenberg, T., J. B. Jespersen, K. M. V. Jensen, B. O. Nielsen, R. A. Humber. 2001. Entomopathogenic fungi in flies associated with pastured cattle in Denmark. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 186-197.
- Torr, S. J., T. N. C. Mangwiyo, D. R. Hall. 2006. The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and Stomoxys (Diptera: Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research* 96: 71-84.
- Torres, P. R., A. C. Cicchino, A. H. Abrahamovich, J. L. Nuñez. 1993. Damage in the skin and leather caused by the horn fly (Diptera: Muscidae). pp. 543-550, Annals of the 22nd Congress of the International Union Leather Technologists and Chemists Societies, Porto Alegre, Brazil.
- Untalan, P. M., J. H. Pruett, H. N. Atteberry, C. D. Steelman. 2006. Thrombostasin isoform frequency in a Central Texas field population of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Veterinary Parasitology* 142: 359-366.
- Vale, G. A. 1980. Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bulletin of Entomological Research* 70: 563-570.
- Vale, G. A., D. R. Hall. 1985. The role of 1-octen-3-ol, acetone and carbon dioxide in the attraction of tsetse flies, *Glossina* spp (Diptera:Glossinidae), to ox odour. *Bulletin of Entomological Research* 75: 209-217.
- Vanzini, G. L., R. Tourni, L. Llovet. 1997. Daños ocasionados por ectoparaásitos en la industria del cuero. *Therios* 26: 84-88.
- Velasco, R., J. González, G. Morales, E. Ortega. 2001. Daño económico y costos de control en bovinos: mosca de los cuernos. *Informativo agropecuario.Bioleche - INIA Quilamapu* 14: 4-7.

- Vogt, R. G. 2002. Odorant binding protein homologues of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*; Possible orthologues of the OS-E and OS-F OBPs of *Drosophila melanogaster*. Journal of Chemical Ecology 28: 2371-2376.
- Wang, J. W., A. M. Wong, J. Flores, L. B. Vosshall, R. Axel. 2003. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. cell 112: 271-282.
- Watrelot-Virieux, D., D. Pin. 2006. Chronic eosinophilic dermatitis in the scrotal area associated with stephanofilariasis infestation of Charolais bull in France. Journal of Veterinary Medicine Series B 53: 150-152.
- Way, M. J., H. F. van Emden. 2000. Integrated pest management in practice -- pathways towards successful application. Crop Protection 19: 81-103.
- Willadsen, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. Veterinary Parasitology 71: 209-222.
- Xavier, J. A. 2003. Comparación de la efectividad de una trampa eléctrica con el tratamiento convencional con insecticidas frente al ataque estival de *Haematobia irritans* en bovinos, pp. 103, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Xu,P. 2005. Eppendorf 2005 winner. A *Drosophila* OBP required for pheromone signaling. Science 4;310(5749):798-9.
- Zaramati, M. V. 2002. Determinación de la efectividad de cipermetrina 6% (pour on), Cipermetrina 15% (baño de aspersión), cipermetrina 5% / ethion 15% (pour on) y cipermetrina 10% / ethion 40% (baño de aspersión) sobre *Haematobia irritans* en bovinos, pp. 40, Instituto de ciencias clínicas, Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Zhang, D., M. S. Cupp, E. W. Cupp. 2002. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 321-330.
- Zyzak, M. D., R. L. Byford, M. E. Craig, J. A. Lockwood. 1996. Behavioral responses of the horn fly (Diptera:Muscidae) to selected insecticides in contact and noncontact environments. Environmental Entomology 25: 120-129.

9 ANEXOS

REVIEW ARTICLE

Insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae): alternative control strategies

M. P. OYARZÚN¹, A. QUIROZ² and M. A. BIRKETT³

¹Departamento de Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de la Frontera (Department of Natural Resources Sciences, University of La Frontera), Temuco, Chile, ²Laboratorio Química Ecológica, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera (Chemical Ecology Laboratory, Department of Chemical Sciences, University of La Frontera), Temuco, Chile and

³Centre for Sustainable Pest and Disease Management, Biological Chemistry Department, Rothamsted Research, Harpenden, U.K.

Abstract. The horn fly, *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Diptera: Muscidae) is one of the most widespread and economically important pests of cattle. Although insecticides have been used for fly control, success has been limited because of the development of insecticide resistance in all countries where the horn fly is found. This problem, along with public pressure for insecticide-free food and the prohibitive cost of developing new classes of compounds, has driven the investigation of alternative control methods that minimize or avoid the use of insecticides. This review provides details of the economic impact of horn flies, existing insecticides used for horn fly control and resistance mechanisms. Current research on new methods of horn fly control based on resistant cattle selection, semiochemicals, biological control and vaccines is also discussed.

Key words. *Haematobia irritans*, control strategies, insecticide resistance, organophosphates, pyrethroids, semiochemicals.

Introduction

In livestock production systems, parasites are a major cause of economic loss (Corwin, 1997; Willadsen, 2006). Over the last few decades, a number of control strategies for endo- and ectoparasites have been developed. However, these strategies have not been able to prevent the constant development of resistance to antiparasitic treatments.

The horn fly, *Haematobia irritans*, is an obligate bloodsucking ectoparasite of pastured cattle. Biting and annoyance caused by adult flies to cattle results in reduced weight gain and less milk production. Because of the production losses and consequent economic costs associated with this pest, cattle owners have primarily used insecticidal control measures. However, in each country where the fly has arrived, insecticides have lost their effectiveness after a few years. To overcome fly resistance to insecticides, new non-insecticidal approaches need to be integrated into alternative control strategies. If a control strategy against a parasite is to be developed or improved, it is imperative to know as much as possible about the critical factors involved in the development of resistance by the parasite (Byford *et al.*, 1999).

This paper reviews the available information on the biology of the horn fly, its economic importance and its resistance to insecticides, as well as current research on alternative control methods. The aim is to provide a starting point for new investigations that will broaden the stock of available tools for *H. irritans* control.

Biology and epidemiology of the horn fly

There are two sub-species of *Haematobia irritans*, *H. irritans exigua* de Meijere, the buffalo fly, which is found in Australia, and *H. irritans irritans* (henceforth cited as *H. irritans*), the horn fly, which is now present on almost all continents except Australia and Asia (Romano & Ferrari, 1993; Cupp *et al.*, 2004; Urech *et al.*, 2005). *Haematobia irritans* was introduced into North America from Europe between 1884 and 1886 (McLintock & Depner, 1954). It arrived in Venezuela, South America, in 1937 (Vogelsang & De Armas, 1940) and spread to Brazil in 1980 (Valério & Guimarães, 1983), Argentina (Luzuriaga *et al.*, 1991; Anziani *et al.*, 1993) and Uruguay in 1991 (Carballo & Martínez, 1991) and Chile in 1993 (Campano & Avalos, 1994).

Correspondence: Dr A. Quiroz, Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera Casilla 54-D, Temuco, Chile. Tel.: + 56 45 325422; Fax: + 56 xxx; E-mail: aquiroz@ufro.cl

Cattle are continuously annoyed by the feeding activity of horn flies. Both male and female flies spend their entire life on the host, feeding 24–38 times/day, using their piercing, sucking proboscis (Artigas, 1994; Foil & Hogsette, 1994).

Horn fly development is highly correlated with environmental temperatures, rather than with photoperiod (Lysyk, 1992a). Larval exposure to declining temperatures in autumn initiates pupal diapause, with the emergence of adults in temperate areas beginning the following spring (Thomas & Kunz, 1986; Lysyk, 1992a, 1992b; Lysyk & Moon, 1994). In Chile, flies are found on cattle from the beginning of November until the end of May (summer), with two peaks of activity in December and March (Kramm, 2000). In temperate areas of Mexico and Argentina, diapause does not occur (Guglielmone *et al.*, 1997; Maldonado-Simán *et al.*, 2006), but in some other temperate, subtropical areas of Brazil, diapausing pupae have been found during colder months (Mendes & Linhares, 1999).

On the second day after emergence, females are able to oviposit, laying between nine and 24 eggs on freshly deposited cattle manure (Harris *et al.*, 1968; Hogsette & Farkas, 2000; Kuramochi, 2000a). Egg hatching occurs after 1–2 days (Foil & Hogsette, 1994), and the larvae pass through three instar stages, after which they form pupae underneath the manure at days 4–8, depending upon environmental temperature (Lysyk, 1991, 1992b). In summer, adults emerge 6–8 days later (Foil & Hogsette, 1994). Newly emerged *H. irritans* must quickly find a host to obtain their first bloodmeal.

Cattle are the preferred host for horn flies, but they will occasionally feed on other domestic animals such as horses (Jones *et al.*, 1988) and dogs (Kuramochi, 2000b). The degree of host specificity is modulated by intrinsic biological properties of both host and parasite, as well as their ecological and co-evolutionary relationships (Dick & Patterson, 2007). Host specificity in the horn fly relies on physiological adaptation to blood-feeding. *Haematobia irritans* has two forms of a trypsin-like enzyme and an aminopeptidase in the midgut (Hori *et al.*, 1983; Hatano & Hori, 1989). It has been demonstrated that aminopeptidase activity is lower in flies fed with blood from other animals than in flies fed with cattle blood (Kuramochi, 2000b), thereby indicating that they may not be able to digest blood proteins from hosts other than cattle. Other explanations for host specificity suggest the presence of trypsin inhibitors, or inadequate supplies of essential nutrients in other types of blood that would lead to diets that are quantitatively or qualitatively deficient for horn fly survival and reproduction (Kuramochi, 2000b).

One factor that contributes to the wide distribution of horn flies is their ability to disperse over great distances. *Haematobia irritans* is able to migrate to herds at a distance of 6–8 km (Kunz *et al.*, 1983) and physical barriers, such as trees, do not prevent migration to new herds (Byford *et al.*, 1987a). Moreover, migration is apparently undertaken by younger females rather than by older females and males (Guillot *et al.*, 1988), although no differences in age between immigrant and resident populations of flies on a given herd have been found (Marley *et al.*, 1991).

Economic impact

Economic losses in cattle production systems are the result of the extreme irritation and annoyance generated by *H. irritans* biting, which cause reductions in daily weight gain, milk production and feed efficiency (Byford *et al.*, 1992). The economic injury level for the horn fly (i.e. the threshold where economic impact begins) is considered to be ≥ 200 flies/animal (Haufe, 1979, 1986a; Kunz *et al.*, 1984; Schreiber *et al.*, 1987). In the U.S.A., annual production losses attributed to horn flies have been estimated at nearly \$1 bn (Kunz *et al.*, 1991; Cupp *et al.*, 1998). Similarly, Latin American countries such as Brazil, Argentina and Chile have estimated annual losses of several million dollars in the beef and dairy industries (Vera, 1995; Velasco *et al.*, 2001; Grisi *et al.*, 2002), as well as in the leather industry (Torres *et al.*, 1993; Bulman *et al.*, 1999; Guglielmone *et al.*, 1999a).

The impact of horn fly biting on weight gain in beef cattle has been widely studied. However, reports are conflicting and there are inconsistencies in the quantification of horn fly damage. Studies on cow-calf systems, which were either untreated or treated for control of horn flies, have demonstrated minimal increases in weaning weights or no increase at all (Schreiber *et al.*, 1987; Sanson *et al.*, 2003), even when infestation levels were above the economic threshold (Hogsette *et al.*, 1991; Foil & Hogsette, 1994). By contrast, other studies have reported significant weight differences, thereby demonstrating weight-increasing advantages of treatments for cow-calf pairs (Campbell, 1976; Quisenberry & Strohbehn, 1984; Haufe, 1986b) and growing cattle (Harvey & Brethour, 1979; Haufe, 1982; Kunz *et al.*, 1984; De Rouen *et al.*, 2003). Moreover, a reduction of 8.1 kg in calf weaning weight for each 100 flies/cow has been reported (Steelman *et al.*, 1991). Taking into account the variation in beef prices and cost of insecticide treatments, several studies in the U.S.A. have reported additional incomes of \$1.16–25.60/animal when horn flies are controlled (Harvey & Brethour, 1979; Kunz *et al.*, 1984; Foil *et al.*, 2000; De Rouen *et al.*, 2003), although other reports have shown no economic benefits (Schreiber *et al.*, 1987; Hogsette *et al.*, 1991). Because of the difficulty in assessing the effects of horn fly infestation upon weight gain in cattle, some researchers have attempted to obtain objective data by measuring the physiological and nutritional responses of beef cattle to horn fly infestations, but without consistent results (Riley *et al.*, 1994; Presley *et al.*, 1996). Although the economic benefits of controlling horn flies has not been unequivocally demonstrated, this pest still remains a major concern for livestock industries in countries where it is present because of its nuisance behaviour. Table 1 shows a summary of reported weight advantages for weaning weights or average daily gain (ADG) increases in cattle treated for horn flies in comparison with those in untreated cattle.

Although there are fewer studies of horn fly infestation effects on milk production compared with beef production, it has been estimated, using mathematical models, that counts of 200 flies/cow reduced milk production by 520 mL/day/cow (Jonsson & Mayer, 1999). Others studies estimated that cows under horn fly stress reduce milk production by 4–12%, depending on the horn fly infestation level (Guglielmone *et al.*, 1998;

Table 1. Increase in total weaning weights and average daily weight gain in cattle treated against horn flies compared with untreated cattle.

Author(s)	Increase in weaning weight (kg)	Increase in average daily weight gain (kg)
Harvey & Brethour, 1979	10	—
Haufe, 1982	2	—
Kunz <i>et al.</i> , 1984	12.5*	0.04*
De Rouen <i>et al.</i> , 1995	12*	0.12*
De Rouen <i>et al.</i> , 2003	7*	0.04*
Sanson <i>et al.</i> , 2003	10	0.09*

* $P \leq 0.05$.

Velasco *et al.*, 2001). Furthermore, an indirect effect of *H. irritans* on milk production concerns its role as a vector of the bacterium *Staphylococcus aureus*, a causative agent for mastitis (Owens *et al.*, 1998; Gillespie *et al.*, 1999).

Another important impact of horn fly biting concerns skin damage, which leads to a reduction in hide quality. Hide damage includes fibre separation and scars caused by fly biting activity, which reduce hide value (Bulman *et al.*, 1999). Other defects reported include black spots and pits, where most of the damage appears to be the result of dermal inflammatory responses (Torres *et al.*, 1993; Guglielmone *et al.*, 1999a). After the introduction of *H. irritans* into Uruguay, an increase in hide damage was reported (Vanzini *et al.*, 1997). In Argentina, a survey of > 1 million hides indicated that the highest incidence of damage occurs in the summer months. The degree of damage was influenced by gender and age/size, and affected, in descending order, bulls, cows, steers, heifers and calves (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1995). There is a significant but low correlation (< 0.6) between hide damage and fly infestation level, which suggests that other factors not directly related to levels of infestation are involved, such as individual variations in tissue reaction to bites (Guglielmone *et al.*, 1999a).

The horn fly is a vector for the filarial nematode, *Stephanofilaria stilesi* (Filaroidea: Filiidae: Stephanofiliinae) in the U.S.A. and Canada (Watrelot-Virieux & Pin, 2006), as is the buffalo fly in Australia (Shaw & Sutherland, 2006). Furthermore, the horn fly has been reported to act as a porter for eggs of the human bot fly, *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) (Leite *et al.*, 1998).

Insecticide control

Organophosphates

Organophosphate (OP) insecticides interfere with normal nerve function by inactivating enzyme acetylcholinesterase (AChE), which catalyses the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (Mutero *et al.*, 1994). Organophosphates have been used for horn fly control since the early 1960s, when fenchlorphos, malathion and stirophos were introduced. Currently, the most utilized compound in this class is diazinon, which provides adequate control of pyrethroid-resistant popula-

tions under field conditions (Cilek *et al.*, 1991, 1995; Crosby *et al.*, 1991; Byford *et al.*, 1999; Guglielmone *et al.*, 2000a; Barros, 2002; Li *et al.*, 2003, 2007) (see below). Another OP insecticide currently used is ethion, which has also proved effective in the control of pyrethroid-resistant populations (Anziani *et al.*, 2000). There are no scientific reports on the efficacy of insecticides in Chile, but information obtained from cattle owners and the agrochemical industry indicates that the situation is almost identical to that in Argentina and other South American countries.

Insect growth inhibitors and growth regulators

Insects exposed to insect growth inhibitors (IGIs), such as diflubenzuron, are unable to form normal cuticles because the polymerization of *N*-acetylglucosamine is blocked (Bloomquist, 1996). Diflubenzuron has been demonstrated to be effective in preventing horn fly emergence (Kunz *et al.*, 1977; Silva & Mendes, 2002). However, it has been found that some horn flies are able to survive sub-lethal doses by reducing their size, possibly as an adjustment response that allows phenotype compensation (Silva *et al.*, 2004).

Insect growth regulators (IGRs), such as methoprene and fenoxy carb, mimic the action of juvenile hormones on a number of physiological processes, such as moulting and reproduction, resulting in the production of insects with mixed larval/pupal or larval/adult morphologies. Juvenile hormone analogues were shown to inhibit horn fly development completely at post-treatment day 10 (Harris *et al.*, 1973). Their efficacy is greater if they are applied on early pupal stages when levels of juvenile hormone are higher (Silva & Mendes, 2002).

Synthetic pyrethroids

Synthetic pyrethroids disrupt normal nerve impulse transmissions in insects, specifically by interfering with the closing of a portion of the sodium channels that induces changes in axonic membrane permeability (Lund & Narahashi, 1983). When they were first introduced in the early 1980s, ear tags impregnated with this insecticide were an effective approach for horn fly control (Williams & Westby, 1980), often providing season-long control, and rapidly gained widespread acceptance among cattle producers throughout North America. However, fly resistance to pyrethroids soon developed in the U.S.A. (Sheppard, 1983a), and is now widespread, including in countries such as Canada (Mwangala & Galloway, 1993a), Argentina (Guglielmone *et al.*, 1999b), Australia (Schnitzerling *et al.*, 1982) and Brazil (Torres *et al.*, 1996).

Macrocyclic lactones

Macrocyclic lactone (ML) parasiticides have a broad spectrum of activity against parasites, including arthropods. This class is comprised of two families, the avermectins (e.g. ivermectin, doramectin and eprinomectin) and the milbemycins

(e.g. moxidectin) (Shoop *et al.*, 1995), which have been used for parasite control in cattle since 1981 (Shoop *et al.*, 1995, 1996). Macrocylic lactones interact irreversibly with γ -amino butyric acid (GABA) and glutamate-gated chloride channel receptors, increasing membrane conductance that leads to paralysis of the somatic musculature (Bloomquist, 1996; Danaher *et al.*, 2006). Because of their ability to kill both endo- and ectoparasites, MLs are known collectively as endectocides (Mehlhorn, 2001). Both avermectins (Marley *et al.*, 1993; Guglielmone *et al.*, 1999c; Andress *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2003) and milbemycins (Miller *et al.*, 1994) may be effective against adult horn flies for up to 4 weeks (Uzuka *et al.*, 1999) and may also affect the fecundity of flies in the process (Miller *et al.*, 1986). Because MLs are excreted unaltered, they affect larval stages developing in the dung of treated animals (Miller *et al.*, 1981, 1994; Schmidt, 1983; Fincher, 1992; Marley *et al.*, 1993; Zulalian *et al.*, 1994; Lysyk & Colwell, 1996). A ranking of MLs based on horn fly larvicidal activity in dung reported that doramectin was most effective, followed by ivermectin and eprinomectin, which were equally effective, and moxidectin, which was least effective (Floate *et al.*, 2001). Moreover, larvicidal effects of moxidectin were lower than those of another avermectin, abamectin, on *H. i. exigua* (Doherty *et al.*, 1994). The excretion of these compounds into milk is an important disadvantage to their use in lactating animals, with the exception of eprinomectin (Shoop *et al.*, 1996), which is found in concentrations lower than the established maximum residue limit (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (World Health Organization/Food & Agriculture Organization, 2000), even when administrated subcutaneously (Baoliang *et al.*, 2006).

Pyrrole derivatives

Pyrrole derivatives, a class of compounds not previously used for fly control, have recently been developed for use against horn flies. These compounds operate by uncoupling oxidative phosphorylation at the mitochondrial level and have been studied as a more suitable insecticide compared with OPs and pyrethroids. Chlorfenapyr is the only member of this class approved for use against horn flies, with ear tags containing 30% chlorfenapyr providing 9–18 weeks of protection (Barros *et al.*, 1999a; Guglielmone *et al.*, 2000b). Negative cross-resistance between chlorfenapyr and pyrethroids led to a five-fold increase in the toxicity of chlorfenapyr in pyrethroid-resistant horn flies compared with susceptible flies, which also represents an additional advantage over other insecticides (Sheppard & Joyce, 1998).

Insecticide resistance

Insecticide resistance is expected to develop rapidly in a pest population that has been intensively treated with an insecticide for several generations. The rate of resistance development depends on a complicated interaction between intrinsic factors relating to genetic traits, and extrinsic factors such as insecticide management or incorrect use (Denholm & Rowland, 1992;

Byford *et al.*, 1999). Because of the high costs and technical difficulties associated with developing new classes of insecticide, an understanding of the mechanism by which insecticide resistance develops in the target species is required so that appropriate control strategies that minimize resistance can be developed (Byford *et al.*, 1999; Foil *et al.*, 2000).

Organophosphate resistance

Despite their initial promise in controlling horn flies, resistance to OP insecticides developed just a couple of years after their introduction during the 1960s (Harris *et al.*, 1966). The introduction of new ear tag devices impregnated with stirophos led to a reduction in horn fly infestation for longer periods, providing 80% control of horn flies for 14 weeks (Ahrens, 1979). However, resistance again appeared after 1–2 years of usage (Sheppard, 1983b). Although there are few reports of resistance to diazinon, (Guerrero *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2001; García *et al.*, 2004), it is thought that resistance will become more frequent as its general use increases (Li *et al.*, 2007). Similarly, resistance to ear tags impregnated with ethion has been reported (Farnsworth *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2001).

Pyrethroid resistance

Investigators across the U.S.A. and Australia reported resistance to pyrethroids by *H. irritans* and *H. i. exigua* in the early 1980s (Schnitzerling *et al.*, 1982; Sheppard, 1983a; Quisenberry *et al.*, 1984; Byford *et al.*, 1985; Schmidt *et al.*, 1985). Resistance to decamethrin and permethrin ear tags developed within 3 years in Georgia, U.S.A. (Williams & Westby, 1980) and the protection provided by λ -cyhalothrin tags decreased from 14 to 4 weeks within a few years (Sheppard & Joyce, 1992). In Canada, protection by permethrin and fenvalerate ear tags was reduced from 8 to 6 weeks in 1 year, whereas resistance levels in populations increased (Mwangala & Galloway, 1993a, 1993b). Cypermethrin and permethrin resistance in horn fly populations was reported in Argentina and Mexico (Guglielmone *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Combinations containing cyhalothrin-K appear to have potential, but it should be noted that, once resistance has developed to one of its components, the use of a mixture will not represent any advantage for pest control (Sparks & Byford, 1988). Cross-resistance among pyrethroids has greatly diminished the usefulness of this class of insecticide for horn fly control (Table 2).

Scott *et al.* (1997) established that homozygous pyrethroid-resistant horn fly strains showed a lower biotic potential, compared with a homozygous pyrethroid-susceptible population. It was suggested that resistance gene frequencies might decline in the absence of pyrethroid usage, with alternating use of OPs possibly resulting in partial reversion of susceptibility to permethrin (Byford *et al.*, 1999). However, evidence from several studies has demonstrated the inefficacy of this strategy, even after the suspension of pyrethroid use for a few years (Weinzierl *et al.*, 1990; Barros *et al.*, 1999b; Guglielmone *et al.*, 2002; Foil *et al.*, 2005).

Table 2. Maximum resistance ratio (Rr) to pyrethroids of insecticide-resistant horn fly populations in the field.

Authors	Insecticide	Rr
Byford <i>et al.</i> (1985)*	Cypermethrin	86
Sheppard & Joyce (1992)	λ -Cyathothrin	482
	Fenvalerate	92 000
	Permethrin	54 000
	Cypermethrin	8000
Guglielmone <i>et al.</i> (2001)	Cypermethrin	3560
Li <i>et al.</i> (2003)*	Permethrin	28

Rr = LC₅₀ of resistant population/LC₅₀ of susceptible population (*values were approximated). LC₅₀ = concentration of the insecticide required to kill 50% of the insect population.

Insecticide resistance mechanisms

Development of insecticide resistance in the horn fly, as in other insects, results from a combination of biochemical, physiological and behavioural mechanisms (Sparks *et al.*, 1985), such as target site insensitivity, detoxification and escape behaviour. Horn fly mobility over an individual animal and between cattle ensures insecticide exposure of the entire horn fly population within a herd and across broad regions. As a result, the reduction of untreated areas, where susceptibility may be maintained in a pest population (refugia), contributes to the development of resistance (Georghiou & Taylor, 1977). Additionally, the ability of horn flies to migrate several kilometres can result in resistant horn flies entering a susceptible horn fly population and adding resistant genes to a susceptible pool. By contrast, it is unlikely that migrating susceptible flies can contribute to the removal of resistant alleles from a resistant population because of their immediate mortality following insecticide exposure (Byford *et al.*, 1999).

Target site insensitivity

The major mechanism for resistance to pyrethroids appears to be target site insensitivity, commonly referred to as knockdown resistance (*kdr*). This mechanism most commonly involves the replacement of the amino acid leucine by phenylalanine in the sodium channel protein, resulting in a reduction of sensitivity to pyrethroids (Soderlund & Knipple, 2003; Davies *et al.*, 2007). A further resistance mechanism, known as *super-kdr*, involves the replacement of a methionine by threonine in the sodium channel protein (Guerrero *et al.*, 1998). However, this has only been found in the presence of *kdr* mutation (Jamroz *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 2002; Foil *et al.*, 2005).

Horn fly resistance to pyrethroids is not completely recessive as most *kdr*-resistant individuals have been found to be heterozygous flies (Guglielmone *et al.*, 2002). These individuals have the potential to act as a reservoir of resistant *kdr* alleles once pyrethroid concentrations diminish, thus increasing the chances of producing resistant homozygous individuals (Guglielmone *et al.*, 2002). Super-resistant strains developed in the laboratory

showed a high frequency of both *kdr* and *super-kdr* mutation, whereas more resistant wild populations had lower *super-kdr* mutation frequency (Jamroz *et al.*, 1998). Because of the increase of susceptible *kdr* alleles in horn fly populations after suspension of pyrethroid usage (Guerrero *et al.*, 2002), along with a decrease in the biotic fitness of horn flies bearing a target-site pyrethroid resistance trait (Kunz, 1991; Scott *et al.*, 1997), it was suggested that there is a fitness cost associated with resistant *kdr* alleles. However, both wild and laboratory resistant strains exhibited high frequencies of *kdr* alleles, even 6 or 7 years after pyrethroid usage stopped (Jamroz *et al.*, 1998; Guerrero *et al.*, 2002; Foil *et al.*, 2005). It is possible that there are different selection pressures on female and male flies, as females have higher proportions of homozygous *kdr* allele individuals than males and most males have resistant heterozygous *kdr* alleles. This may be related to their different feeding behaviours (Li *et al.*, 2003).

Alterations in certain amino acids at the active site of AChE in OP-resistant insects are known to result in a decreased sensitivity to inhibition of the enzyme by these insecticides (Fournier & Mutero, 1994; Hemingway & Ranson, 2000; Walsh *et al.*, 2001). Although AChE insensitivity has been studied in depth in several Diptera, especially mosquitoes such as *Culex* sp. (Bourguet *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2006), *Anopheles* sp. (Ayad & Georghiou, 1975; Hemingway *et al.*, 2004) and house flies (Walsh *et al.*, 2001), there are very few equivalent studies in *H. irritans*.

Detoxification

A second insecticide resistance mechanism involves their inactivation of the compound by enzymes such as multi-function oxidases (MFOs), esterases and glutathione S-transferases (Guerrero & Barros, 2006). The activity of MFOs, combined with target site insensitivity, is a major mechanism of horn fly resistance to pyrethroids (Bull *et al.*, 1988; Sheppard, 1995; Guerrero *et al.*, 1997). It is possible to synergize pyrethroid effects by adding an MFO inhibitor, such as piperonyl butoxide (PBO) (Byford *et al.*, 1987b; Farnsworth *et al.*, 1997). However, horn flies are able to develop resistance to insecticides used in conjunction with PBO and this strategy will not be effective in combating target site (*kdr/super-kdr*) resistance (Bull *et al.*, 1988; Sheppard & Joyce, 1992; Guerrero *et al.*, 1997; Guglielmone *et al.*, 1999b).

Detoxification is also a mechanism of resistance to OP insecticides. Resistant horn flies differ qualitatively and quantitatively from susceptible flies in their esterase activity profiles (Guerrero *et al.*, 1999). Mechanisms include changes in esterase specific expression (α E7) (Guerrero, 2000), as well as overexpression of normal metabolic esterases (Castiglioni-Ruiz *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 1999; Barros *et al.*, 2001). Enhanced MFO activity in pyrethroid-resistant horn flies has also been shown to increase sensitivity to certain OPs which are activated by MFOs (Cilek & Knapp, 1993; Cilek *et al.*, 1995). Thus, the addition of PBO to OPs was thought to inhibit insecticide effects. The addition of PBO to diazinon treatments was found to decrease diazinon toxicity at high concentration (5%), but to

have a synergistic effect at lower doses (0.125%, 0.5% and 1%), suggesting there are isozymes with different degrees of sensitivity to PBO inhibition for both metabolic detoxification of diazinon and diazinon activation (Li *et al.*, 2007).

Behavioural modification

Pyrethroid-resistant horn flies are more repelled by pyrethroids than susceptible flies (Zyzak *et al.*, 1996). Resistant flies avoid insecticide contact either by moving away after a pyrethroid treatment, only to return when insecticide concentrations on cattle skin decay below a threshold value (Guglielmone *et al.*, 2002), or by aggregating in ventral parts of the animal where insecticide concentrations are at their lowest (Foil & Hogsette, 1994).

Alternative control strategies

Because of the rapid development of insecticide resistance and other issues related to the use of insecticides, it has become necessary to find alternative methods of horn fly control (Willadsen, 1997; Pruett, 1999; Rodríguez & Niemeyer, 2005). The most promising of these involves the selection of horn fly-resistant cattle and the use of semiochemicals (behaviour- or development-modifying compounds) that are involved in conferring such host resistance. Biological control approaches and novel vaccines have also been investigated.

Cattle resistance to horn flies

Breeding cattle that are resistant to horn flies has been proposed as a sustainable management method. *Bos indicus* breeds are less susceptible to ectoparasites than *Bos taurus* (Wharton, 1974; Bianchin *et al.*, 2006). *Bos indicus* has been well documented as resistant to *H. i. exigua*, *H. irritans* and buffalo ticks (Steelman *et al.*, 2003). *Bos indicus* cattle are used in countries such as Australia to supplement insecticidal control (Steelman *et al.*, 1994). In addition, there are significant differences in horn fly density among different breeds of *Bos taurus*: for example, European Chianina are more resistant than British Angus, Hereford, Polled Hereford, Red Polland and European Charolais breeds (Steelman *et al.*, 1991). In Argentina, Criolla (Iberian *Bos taurus*) cattle have been reported to be more resistant than other breeds to infestation by horn flies. This finding has been attributed to the small size of Criolla, which is known to be a factor involved in host preference (Guglielmone *et al.*, 2000c).

Similarly, certain phenotypes within breeds are more resistant to horn flies. Several studies have shown the existence of low-carrier phenotypes, manifested by individuals with low horn fly levels in the field (Doube, 1984; Schreiber & Campbell, 1986; Pruett *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2004), and this trait appears to have good heritability (Brown *et al.*, 1992). Another Diptera species that bites animals, tsetse flies (Diptera: Glossinidae), also displays intraspecific host preference (Torr *et al.*,

2001). The selection of horn fly-resistant cattle has been studied with a view to improving cattle resistance to the stable fly, *Stomoxys calcitrans* L., and the face fly, *Musca autumnalis* de Geer (Brown *et al.*, 1994). However, results suggested that selection of heifers which are simultaneously resistant to a number of fly species would be too difficult to achieve (Guglielmone *et al.*, 2004).

The factors underlying inter- and intra-breed differences in cattle resistance include phenotypic traits such as colour (Steelman *et al.*, 1991; Pruett *et al.*, 2003), body size (Steelman *et al.*, 1996) and individual immune systems (Stear *et al.*, 1984). Another possible explanation for differential resistance is that horn fly distribution may depend on the feeding success of individual horn flies on a particular host, possibly relating to the success of the anticoagulation mechanisms of the fly against the coagulation systems of that particular host (Pruett *et al.*, 2003; Untalan *et al.*, 2006).

Cattle odours play a role in determining horn fly host preference. Host hormones and other factors affect the physiology of sebaceous glands, so that changes in skin odour alter the attractiveness of cattle to horn flies (Christensen & Dobson, 1979). It has been demonstrated that bulls have higher fly loads than steers and heifers (Brown *et al.*, 1992). Furthermore, recent studies showed that horn fly infestation levels within herds of dairy cattle can be manipulated by interchanging attractive and unattractive heifers between herds (Jensen *et al.*, 2004) and that this differential attractiveness is related to volatile semiochemicals released from the cattle body (Birkett *et al.*, 2004). Birkett *et al.* (2004) identified 23 compounds in the volatile profile of selected heifers. Of these, 1-octen-3-ol, 6-methyl-5-hepten-2-one and 3-octanol were identified in laboratory assays as attractants to cattle flies, whereas naphthalene, propyl butanoate and linalool were identified as repellents. Compounds were used in a field assay to confirm their biological activity against horn flies using small herds of heifers ranked according to fly load. A slow-release formulation of 6-methyl-5-hepten-2-one was attached to high fly-load heifers, resulting in a reduction of fly loads, not only for the treated individuals, but also for the whole herd (Birkett *et al.*, 2004).

The finding that horn fly populations can be manipulated by the deployment of volatile semiochemicals presents opportunities for the development of semiochemical-based strategies for horn fly control, whereby semiochemicals are deployed as part of a 'push-pull strategy', also known as the stimulo-deterrant diversionary strategy (SDDS) (Agelopoulos *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 2007; Logan & Birkett, 2007). This approach uses repellents for host location interference, and traps with attractants to draw flies away from cattle. Evidence for successful deployment of semiochemicals in controlling biting flies has been provided by extensive studies conducted with tsetse flies in sub-Saharan Africa, which, although they differ from horn flies in terms of feeding biology, also utilize volatile, host-derived semiochemicals in host location and selection (Vale & Hall, 1985a, 1985b; Torr *et al.*, 1995, 1996, 1997, 2006; Späth, 1997; Gikonyo *et al.*, 2002). Where field studies have been conducted with cattle flies that are closely related to horn flies, these have relied on the deployment of tsetse fly attractants. For *S. calcitrans*, olfactory and behavioural responses to tsetse kairomones

such carbon dioxide, 1-octen-3-ol, acetone and cattle odour were observed (Vale, 1980; Vale *et al.*, 1985a; Schofield *et al.*, 1995, 1997; Schofield & Brady, 1997). 1-Octen-3-ol has been shown to increase catches of *Stomoxys* (Holloway & Phelps, 1991; Mihok *et al.*, 1995), and mixtures of 1-octen-3-ol, 3-n-propylphenol and 4-methylphenol significantly increased collection of *S. calcitrans* (Cilek, 1999).

Biological control

Interactions with dung-associated arthropods can have a significant impact on the survival of horn fly larvae and reportedly reduce horn fly populations in the U.S.A. (Hu & Frank, 1996), Canada (Macqueen & Beirne, 1975) and Australia (Fay *et al.*, 1990). Therefore, biological control approaches have been evaluated for management of larval stages in dung, including intentional mass increases of dung-burying and predatory beetles (Coleoptera), as well as parasitic wasps (Hymenoptera).

The effects of dung beetles *Ontherus sulcator* Fabricius and *Onthophagus hirculus* Mannerheim (Coleoptera: Scarabaeidae) in Argentina and *Onthophagus* (= *Digitonthophagus*) *gazella* Fabricius (Coleoptera: Scarabaeidae) in the U.S.A., Australia and Brazil on larval populations have been variable. The Afro-Asian species *O. gazella* was officially introduced into several countries, including the U.S.A. (Blume & Aga, 1978; Fincher *et al.*, 1983), Australia (Bornemissza, 1970), Brazil (Bianchin *et al.*, 1992), Uruguay (Kohlmann, 1994) and Chile (Ripa *et al.*, 1995), with the aim of improving the assimilation of dung into the soil, and, at the same time, controlling dung-breeding parasites. The emergence of *H. irritans* and *H. i. exigua* from dung buried in the soil by the action of *O. gazella* decreased considerably (Bornemissza, 1970; Miranda *et al.*, 1990), although it was demonstrated that this reduction might not be sufficient to reduce infestations in cattle grazing in flood-irrigated pastures (Legner & Warkentin, 1991). In Argentina, the native American species *O. sulcator* and *O. hirculus* were effective in controlling horn fly populations by removing dung (Mariategui *et al.*, 2001).

Other Coleoptera, including members of the Staphylinidae and Histeridae, are important predators of larval horn flies in dung (Thomas & Morgan, 1972). *Phylontus* spp. (Staphylinidae) has reportedly decreased horn fly populations in the U.S.A. (Roth *et al.*, 1983; Fincher, 1995; Hu & Frank, 1997). *Aleochara* spp. decreased the population of several fly species developing on bovine faeces, including *H. i. exigua* (Wright *et al.*, 1989) in Australia and *H. irritans* in Brazil (Guimarães & Mendes, 1998; Koller *et al.*, 2002; Mariategui *et al.*, 2004). Together with coprophagous coleopterans, histerids were introduced into Australia (Tyndale-Biscoe, 1996) and the U.S.A. (Fincher, 1995) to evaluate their potential for horn fly control. Also introduced into Australia in 1983 were African predatory mites of the genus *Macrocheles* (Acari: Macrochelidae), which are phoretic on dung beetles and attack eggs and larvae present in dung, but these did not have significant effects (Wallace & Holm, 1983; Roth *et al.*, 1988; Foil & Hogsette, 1994).

Parasitic wasps (Hymenoptera) have been reported as major parasitoids of horn flies (Harris & Summerlin, 1984), with *Spalangia* spp. (Pteromalidae) the most abundant in horn fly larvae

in the U.S.A. (Lindquist, 1936; Figg *et al.*, 1983; Thomas & Kunz, 1986; Roth, 1989; McKenzie & Richerson, 1993). In Brazil, *Spalangia* spp. is reportedly the most important enemy of the horn fly (Mendes & Linhares, 1999) and, because of its abundance in the field in some areas of Brazil, has been considered for use in controlling horn fly infestations (Mendes & Linhares, 1999; Marchiori *et al.*, 2000, 2002; Sereno, 2000). Survival and biotic parameters were evaluated for members of the Pteromalidae and Chalcididae and results supported previous reports that some of these might be used as biological control agents (Geden *et al.*, 2006). The African red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), was reportedly responsible for 78% mortality in larval horn flies, but had undesirable side-effects in that it also reduced other predator arthropods and crops (Summerlin *et al.*, 1977, 1984; Lemke & Kissam, 1988; Hu & Frank, 1996).

Biological pesticides based on the well known bacterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) are effective against a range of insect pests (Gingrich & Eschle, 1966, 1971; Temeyer, 1984) and have been studied as potential horn fly control agents. A screening of *Bt* toxic strains showed promising results, with the identification of nine isolates toxic to *H. i. exigua* larvae (Gough *et al.*, 2002). Fungal pathogens have also been studied for their impact on horn flies, showing very low fungal prevalence in flies (Steenberg *et al.*, 2001).

Recently, a screening on entomopathogenic nematodes as potential candidates for future biological control methods was carried out, but with inconclusive results (Rodríguez *et al.*, 2004).

Vaccines

Vaccines have advantages over chemical control methods because they can provide long periods of protection and have high species specificity, thereby reducing the development of resistance (Pruett *et al.*, 1999). Although there is very little experimental information regarding host immunological responses to horn flies, it is known that cattle do not develop acquired immunological resistance to *H. irritans*, because although cattle develop antibodies in response to feeding by the horn fly and buffalo fly (Baron & Lysyk, 1995), this response is not deleterious to the flies (Kerlin & Allingham, 1992).

Several different potential antigens that might interfere with the horn fly lifecycle have been investigated. These include trypsin-like enzymes (East *et al.*, 1995; Dametto *et al.*, 2000), serine protease inhibitors (Azzolini *et al.*, 2004, 2005) and anti-haemostatic molecules (Zhang *et al.*, 2002; Cupp *et al.*, 2004). Results of immunization against a trypsin-like enzyme of *H. i. exigua* were unsuccessful because buffalo flies supplied with those specific antibodies were unaffected (East *et al.*, 1995). Allingham *et al.* (1998) evaluated the survival of antibodies in the alimentary tract of *H. i. exigua* fed with blood of immunized sheep and demonstrated that the binding activity of IgG was lost within an hour of feeding, and < 0.1% of IgG reached either the hind-gut or the haemolymph. The response of *H. irritans* to trypsin-like enzyme immunization has not been evaluated yet, although the protein has been purified and characterized (Dametto *et al.*, 2000).

Serine proteinase inhibitors participate in insect immunity, and thus are involved in host interactions (Gorman & Paskewitz, 2001; Azzolini *et al.*, 2004). The serine proteinase inhibitor from *H. irritans* is probably localized in the haemolymph, has an inhibitory activity on the *H. irritans* trypsin-like protein, and would play a role in haemolymph coagulation control (Azzolini *et al.*, 2004).

The most recent approach has focused on concealed horn fly antigens that are not normally 'seen' by the host immune system, but which produce a strong antibody response when presented in a vaccine formulation (Pruett, 1999; Dalton & Mulcahy, 2001). Future use of these vaccines against the horn fly, either alone or in concert with integrated pest management programmes, is a promising longterm strategy.

26 Blood-feeding arthropods possess multiple salivary components that regulate host haemostasis. The saliva of horn flies, unlike that of most other blood-feeding arthropods, has no vasodilatory or apyrase activity (Cupp *et al.*, 1998), but possesses a unique anti-clotting factor, identified as thrombostasin (TS) (Cupp *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). This single anti-haemostatic factor is considered to represent the best opportunity for developing a vaccine that will cause blood-feeding to be interrupted by blocking a species-specific molecule (Zhang *et al.*, 2002). It has been demonstrated that horn flies fed on TS-immunized cattle took smaller bloodmeals, resulting in delayed egg development, which could therefore impact on reproductive potential and horn fly population growth (Cupp *et al.*, 2004). Polymorphisms in the TS gene coding sequence have been reported, as illustrated by the number of TS isoforms found in field and laboratory populations (Zhang *et al.*, 2001; Untalan *et al.*, 2006). Currently, TS genotype frequencies in different horn fly populations are under investigation because of the genotype's potential as a tool for examining molecular evolution and its possible role in determining host selection for feeding (Zhang *et al.*, 2001, 2002; Untalan *et al.*, 2006).

There have been other approaches to developing possible vaccine antigens. Wijffels *et al.* (1999) carried out extensive bio-assays on the feasibility of vaccination with peritrophins from the peritrophic matrix of adult *H. i. exigua*, but without success. Buffalo flies fed on blood or sera from vaccinated hosts did not experience detrimental effects during any stage of their life cycle (Wijffels *et al.*, 1999). Aquaporins, which are water channels that regulate rapid movement of water through cell membranes, were identified in *H. i. exigua* (Elvin *et al.*, 1999) and were initially investigated as potential vaccine antigens. However, no further work leading to their development has been reported.

Conclusions

In this paper, the economic losses caused by horn flies in the beef, milk and leather production industries have been reviewed. Until now, control methods against horn flies have largely relied on the use of insecticides. However, it is clear that horn flies, like other insect species, possess an effective battery of resistance mechanisms which enable them to develop insecticide resistance rapidly. Intrinsic features in horn flies, such as their

high biological potential, allow them to mutate rapidly and, because of the heterozygote dominance of resistance, once resistance is built up, it is difficult to reverse the process and restore original population susceptibility. Therefore, a longterm control strategy based exclusively on chemical products that act by toxic modes of action is unsustainable. The problem of insecticide resistance, combined with increasing consumer concern regarding the potential effects of low-level exposure to insecticides on human health and the high cost of developing new insecticide compounds, have driven the search for novel technologies for control of the horn fly. Strategies such as horn fly-resistant cattle selection (in terms of both breed and individual resistance) have been demonstrated to be effective, but there are still some issues relating to objective cattle selection that need to be resolved. Biological control of pupal and larval stages of *H. irritans* is advanced in some areas, but local research is required in other countries to validate the possible use of this approach. Owing to the effectiveness of tick vaccines, scientists are investigating the possibility of exploiting horn fly concealed antigens as a longterm approach. Currently, the most promising approach for horn fly control in the near future involves the use of volatile semiochemicals that mediate host location and selection, which can be deployed as part of push–pull strategies and incorporated into integrated pest management programmes. All these investigations will lead to the development and implementation of new strategies that could provide a wide range of tools against *H. irritans*, one of the most economically damaging fly pests of cattle worldwide.

References

- Agelopoulos, N., Birkett, M.A., Hick, A.J. *et al.* (1999) Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide Science*, **55**, 225–235.
- Ahrens, E.H. (1979) Horn fly control with an insecticide impregnated ear tag. *Southwestern Entomologist*, **2**, 8–10.
- Allingham, P.G., East, I.J., Kerlin, R.L. & Kemp, D.H. (1998) Digestion of host immunoglobulin and activity of midgut proteases in the buffalo fly *Haematobia irritans exigua*. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 445–450.
- Andress, E.R., DeRouen, S.M. & Foil, L.D. (2000) Efficacy of doramectin 0.5% w/v pour-on for control of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Veterinary Parasitology*, **90**, 327–331.
- Anziani, O.S., Guglielmone, A.A., Signorini, A.R., Aufranc, C. & Mangold, A.J. (1993) *Haematobia irritans* in Argentina. *Veterinary Record*, **132**, 588.
- Anziani, O.S., Zimmermann, G., Guglielmone, A.A., Forchieri, M. & Volpogni, M.M. (2000) Evaluation of insecticide ear tags containing ethion for control of pyrethroid-resistant *Haematobia irritans* (L.) on dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, **91**, 147–151.
- Artigas, J. (1994) Mosca de los cuernos. *Entomología Económica: Insectos de Interés Agrícola, Forestal, Médico Veterinario (nativos, introducidos y susceptibles de ser introducidos)* (ed. by University of Concepción), pp. 277–279. University of Concepción, Concepción.
- Ayad, H. & Georgiou, G.P. (1975) Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity to acetylcholinesterase. *Journal of Economic Entomology*, **68**, 295–297.
- Azzolini, S.S., Santos, J.M., Souza, A.F., Torquato, R.J., Hirata, I.Y., Andreotti, R. & Tanaka, A.S. (2004) Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase inhibitor from the ectoparasite

- Haematobia irritans irritans** (Diptera: Muscidae). *Experimental Parasitology*, **106**, 103–109.

Azzolini, S.S., Sasaki, S.D., Campos, I.T.N., Torquato, R.J.S., Juliano, M.A. & Tanaka, A.S. (2005) The role of HiTI, a serine protease inhibitor from *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in the control of fly and bacterial proteases. *Experimental Parasitology*, **111**, 30–36.

Baoliang, P., Yuwan, W., Zhende, P., Lifschitz, A.L. & Ming, W. (2006) Pharmacokinetics of eprinomectin in plasma and milk following subcutaneous administration to lactating dairy cattle. *Veterinary Research Communications*, **30**, 263–270.

Baron, R.W. & Lysyk, T.J. (1995) Antibody responses in cattle infested with *Haematobia irritans irritans* (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **32**, 630–635.

Barros, A.T. (2002) Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **37**, 217–221.

Barros, A.T.M., Andress, E., Doscher, M.E. & Foil, L.D. (1999a) Evaluation of chlорfenapyr ear tag efficacy and susceptibility of horn flies to chlорfenapyr. *Southwestern Entomologist*, **24**, 331–338.

Barros, A.T., Alison, M.W. Jr & Foil, L.D. (1999b) Evaluation of a yearly insecticidal ear tag rotation for control of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*, **82**, 317–325.

Barros, A.T.M., Ottea, J., Sanson, D. & Foil, L.D. (2001) Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. *Veterinary Parasitology*, **96**, 243–256.

Bianchin, I., Honer, M.R. & Gomes, A. (1992) Controle integrado da mosca-dos-chifres na Região Centro-oeste. *A Hora Veterinária Porto Alegre*, **65**, 43–46.

Bianchin, I., Koller, W.W. & Detmann, E. (2006) The seasonality of *Haematobia irritans* in central Brazil. [Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil central.] *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, **26**, 79–86.

Birkett, M.A., Agelopoulos, N., Jensen, K.M.V. et al. (2004) The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 313–322.

Bloomquist, J.R. (1996) Insecticides: chemistries and characteristics. *Radcliffe's IPM World Textbook* (ed. by E. B. Radcliffe & W. D. Hutchison), pp. xxx–xxx. University of Minnesota, St. Paul, MN.

Blume, R.R. & Aga, A. (1978) *Onthophagus gazella*: Progress of experimental releases in South Texas. *Folia Entomologica Mexicana*, **39–40**, 190–191.

Bornemissza, G.F. (1970) Insectary studies on the control of dung breeding flies by the activity of the dung beetle, *Onthophagus gazella* F. (Coleoptera: Scarabaeinae). *Australian Journal of Entomology*, **1**, 31.

Bourguet, D., Capela, R. & Raymond, M. (1996) An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal. *Journal of Economic Entomology*, **89**, 1060–1066.

Brown, A.H. Jr, Steelman, C.D., Johnson, Z.B., Rosenkrans, C.F. Jr & Brasuell, T.M. (1992) Estimates of repeatability and heritability of horn fly resistance in beef cattle. *Journal of Animal Science*, **70**, 1375–1381.

Brown, A.H. Jr, Johnson, Z.B., Simpson, R.B., Brown, M.A., Steelman, C.D. & Rosenkrans, C.F. Jr. (1994) Relationship of horn fly to face fly infestation in beef cattle. *Journal of Animal Science*, **72**, 2264–2269.

Bull, D.L., Harris, R.L. & Pryor, N.W. (1988) The contribution of metabolism to pyrethroid and DDT resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **81**, 449–458.

Bulman, M., Lamberti, J., Margueritte, J.A. & Filippi, J.L. (1999) *Haematobia irritans irritans* (L.1758) y su control en Argentina: pasado, presente y futuro. *Therios*, **28**, 190–198.

Byford, R.L., Quisenberry, S.S., Sparks, T.C. & Lockwood, J.A. (1985) Spectrum of insecticide cross-resistance in pyrethroid-resistant populations of horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **78**, 768–773.

Byford, R.L., Broce, A.B., Lockwood, J.A., Smith, S.M., Morrison, D.G. & Bagley, C.P. (1987a) Horn fly (Diptera: Muscidae) dispersal among cattle herds. *Journal of Economic Entomology*, **80**, 421–426.

Byford, R.L., Lockwood, J.A., Smith, S.M., Sparks, T.C. & Luther, D.G. (1987b) Insecticide mixtures as an approach to the management of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **80**, 111–116.

Byford, R.L., Craig, M.E. & Crosby, B.L. (1992) A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, **70**, 597–602.

Byford, R.L., Craig, M.E., DeRouen, S.M., Kimball, M.D., Morrison, D.G., Wyatt, W.E. & Foil, L.D. (1999) Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *International Journal for Parasitology*, **29**, 125–135.

Campano, S. & Avals, P. (1994) Presencia de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en ganado bovino en Chile. *Parasitología al Día*, **18**, 59–61.

Campbell, J.B. (1976) Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weaning weights of calves. *Journal of Economic Entomology*, **69**, 711–712.

Carballo, M. & Martínez, M. (1991) Hallazgo de *Haematobia irritans* en Uruguay. *Veterinaria*, **27**, 20–21.

Castiglioni-Ruiz, L., Bicudo, H.E.M.D. & Ceron, C.R. (1997) Esterase patterns in four Brazilian populations of *Haematobia irritans*. *Cytobios*, **90**, 81–94.

Christensen, C.M. & Dobson, R.C. (1979) Effects of testosterone propionate on the sebaceous glands and subsequent attractiveness of Angus bulls and steers to horn flies [(*Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae))]. *Journal of Kansas Entomology Society*, **52**, 386.

Cilek, J.E. (1999) Evaluation of various substances to increase adult *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) collections on alsynite cylinder traps in north Florida. *Journal of Medical Entomology*, **36**, 605–609.

Cilek, J.E. & Knapp, F.W. (1993) Enhanced diazinon susceptibility in pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae): potential for insecticide resistance management. *Journal of Economic Entomology*, **86**, 1303–1307.

Cilek, J.E., Steelman, C.D. & Knapp, F.W. (1991) Horn fly (Diptera: Muscidae) insecticide resistance in Kentucky and Arkansas. *Journal of Economic Entomology*, **84**, 756–762.

Cilek, J.E., Dahlman, D.L. & Knapp, F.W. (1995) Possible mechanism of diazinon negative cross-resistance in pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **88**, 520–524.

Cook, S.M., Khan, Z.R. & Pickett, J.A. (2007) The use of push–pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, **52**, 375–400.

Corwin, R.M. (1997) Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. *Veterinary Parasitology*, **72**, 451–460.

Crosby, B.L., Byford, R.L. & Kinzer, H.G. (1991) Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans* (L.), in New Mexico: survey and control. *Southwestern Entomologist*, **16**, 301–309.

Cui, F., Raymond, M., Berthomieu, A., Alout, H., Weill, M. & Qiao, C.L. (2006) Recent emergence of insensitive acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **43**, 878–883.

Cupp, E.W., Cupp, M.S., Ribeiro, J.M.C. & Kunz, S.E. (1998) Blood-feeding strategy of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **35**, 591–595.

- Cupp, M.S., Cupp, E.W., Navarre, C., Wisnewski, N., Brandt, K.S., Silver, G.M., Zhang, D. & Panangala, V. (2004) Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine*, **22**, 2285–2297.
- Dalton, J.P. & Mulcahy, G. (2001) Parasite vaccines: a reality? *Veterinary Parasitology*, **98**, 149–167.
- Dametto, M., David, A.P., Azzolini, S.S. et al. (2000) Purification and characterization of a trypsin-like enzyme with fibrinolytic activity present in the abdomen of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Protein Chemistry*, **19**, 515–521.
- Danaher, M., Howells, L.C., Crooks, S.R.H., Cerkvenik-Flajs, V. & O'Keeffe, M. (2006) Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, **844**, 175–203.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R. & Williamson, M.S. (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, **59**, 151–162.
- Denholm, I. & Rowland, M.W. (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annual Review of Entomology*, **37**, 91–112.
- De Rouen, S.M., Foil, L.D., MacKay, A.J., Franke, D.E., Sanson, D.W. & Wyatt, W.E. (2003) Effect of horn fly (*Haematobia irritans*) control on growth and reproduction of beef heifers. *Journal of Economic Entomology*, **96**, 1612–1616.
- Dick, C.W. & Patterson, B.D. (2007) Against all odds: explaining high host specificity in dispersal-prone parasites. *International Journal of Parasitology*, **37**, 871–876.
- Doherty, W.M., Stewart, N.P., Cobb, R.M. & Keiran, P.J. (1994) *In vitro* comparison of the larvicidal activity of Moxidectin and Abamectin against *Onthophagus gazella* (F) (Coleoptera, Scarabaeidae) and *Haematobia irritans exigua* Demeijere (Diptera, Muscidae). *Journal of Australian Entomologist Society*, **33**, 71–74.
- Doube, B.M. (1984) The effect of breed and coat colour on numbers of the buffalo fly, *Haematobia irritans exigua* (Diptera: Muscidae) on bovine hosts. *Journal of Australian Entomologist Society*, **23**, 39–45.
- East, I.J., Allingham, P.G., Bunch, R.J. & Matheson, J. (1995) Isolation and characterization of a trypsin-like enzyme from the buffalo fly, *Haematobia irritans exigua*. *Medical and Veterinary Entomology*, **9**, 120–126.
- Elvin, C.M., Bunch, R., Liyou, N.E., Pearson, R.D., Gough, J. & Drinkwater, R.D. (1999) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an aquaporin-like gene from adult buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Insect Molecular Biology*, **8**, 369–380.
- Farnsworth, W.R., Collett, M.G. & Ridley, I.S. (1997) Field survey of insecticide resistance in *Haematobia irritans exigua* de Meijere (Diptera: Muscidae). *Australian Journal of Entomology*, **36**, 257–261.
- Fay, H.A.C., Macqueen, A. & Doube, B.M. (1990) Impact of fauna on mortality and size of *Haematobia* spp. (Diptera: Muscidae) in natural dung pads in Australia and South Africa. *Bulletin of Entomological Research*, **80**, 385–392.
- Figg, D.E., Hall, R.D. & Thomas, G.D. (1983) Insect parasites associated with Diptera developing in bovine dung pats on central Missouri pastures. *Environmental Entomology*, **12**, 961–966.
- Fincher, G.T. (1992) Injectable ivermectin for cattle: effects on some dung-inhabiting insects. *Environmental Entomology*, **21**, 871–876.
- Fincher, G.T. (1995) Predation on the horn fly by *Hister bruchi*. *Southwestern Entomologist*, **20**, 423–427.
- Fincher, G.T., Stewart, T.B. & Hunter, J.S. III. (1983) The 1981 distribution of *Onthophagus gazella* Fabricius from releases in Texas and *Onthophagus taurus* Schreber from an unknown release in Florida (Coleoptera: Scarabaeidae). *Coleopterists Bulletin*, **37**, 159–163.
- Floate, K.D., Spooner, R.W. & Colwell, D.D. (2001) Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 117–120.
- Foil, L.D. & Hogsette, J.A. (1994) Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique et Technique*, **13**, 1125–1158.
- Foil, L., Alison, M., DeRouen, S.M., Kimball, M., Morrison, D.G., Sanson, D.W. & Wyatt, W.E. (2000) Controlling horn flies. *Louisiana Agriculture*, **43**, 21–23.
- Foil, L.D., Guerrero, F., Alison, M.W. & Kimball, M.D. (2005) Association of the *kdr* and *super-kdr* sodium channel mutations with resistance to pyrethroids in Louisiana populations of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). *Veterinary Parasitology*, **129**, 149–158.
- Fournier, D. & Mutero, A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **108**, 19–31.
- García, C.A., Covarrubias, A.C., Flores, A.V., Vazquez, Z.G., Kunz, S. & Ledezma, A.M. (2004) Horn fly (*Haematobia irritans*) resistance to cypermethrin and diazinon in the state of Tamaulipa, Mexico: current situation. *Veterinaria México*, **35**, 237–244.
- Geden, C.J., Moon, R.D. & Butler, J.F. (2006) Host ranges of six solitary filth fly parasitoids (Hymenoptera: Pteromalidae, Chalcididae) from Florida, Eurasia, Morocco, and Brazil. *Environmental Entomology*, **35**, 405–412.
- Georghiou, G.P. & Taylor, C.E. (1977) Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, **70**, 319–323.
- Gikonyo, N.K., Hassanali, A., Njagi, P.G., Gitu, P.M. & Midiwo, J.O. (2002) Odour composition of preferred (buffalo and ox) and non-preferred (waterbuck) hosts of some Savanna tsetse flies. *Journal of Chemical Ecology*, **28**, 969–981.
- Gillespie, B.E., Oliver, S.P., Owens, W.E. & Nickerson, S.C. (1999) Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. *Journal of Dairy Science*, **82**, 1581–1585.
- Gingrich, R.E. & Eschle, J.L. (1966) Preliminary report on the larval development of the horn fly, *Haematobia irritans*, in faeces from cattle given fractions of a commercial preparation of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **8**, 285–287.
- Gingrich, R.E. & Eschle, J.L. (1971) Susceptibility of immature horn flies to toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, **64**, 1183–1188.
- Gorman, M.J. & Paskewitz, S.M. (2001) Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**, 257–262.
- Gough, J.M., Akhurst, R.J., Ellar, D.J., Kemp, D.H. & Wijffels, G.L. (2002) New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. *Biological Control*, **23**, 179–189.
- Grisi, L., Massard, L.C., Borja, G.E. & Pereira, J.B. (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitos em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, **125**, 8–10.
- Guerrero, F.D. (2000) Cloning of a horn fly cDNA, HialphaE7, encoding an esterase whose transcript concentration is elevated in diazinon-resistant flies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **30**, 1107–1115.
- Guerrero, F.D. & Barros, A.T.M. (2006) Role of *kdr* and esterase-mediated metabolism in pyrethroid-resistant populations of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 896–901.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D. & Kunz, S.E. (1997) Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *super-kdr*

- point mutations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 745–755.
- Guerrero, F.D., Kunz, S.E. & Kammlah, D. (1998) Screening of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance-associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assay. *Journal of Medical Entomology*, **35**, 710–715.
- Guerrero, F.D., Pruet, J.H., Kunz, S.E. & Kammlah, D.M. (1999) Esterase profiles of diazinon-susceptible and resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **92**, 286–292.
- Guerrero, F.D., Alison, M.W. Jr., Kammlah, D.M. & Foil, L.D. (2002) Use of the polymerase chain reaction to investigate the dynamics of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **39**, 747–754.
- Guglielmone, A.A., Anziani, O.S., Mangold, A.J., Giorgi, R.E., Volpogni, M.M. & Flores, S.G. (1997) Seasonal variation of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, **87**, 55–59.
- Guglielmone, A., Anziani, O., Mangold, A. & Volpogni, M. (1998) Perjuicios económicos provocados por la ‘mosca de los cuernos’ (*Haematobia irritans*). INTA EEA Rafaela. *Información Técnica*, **146**, xxx–xxx.
- Guglielmone, A.A., Gimeno, E., Idiart, J. et al. (1999a) Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 324–329.
- Guglielmone, A.A., Castelli, M.E., Volpogni, M.M., Anziani, O.S. & Flores, S.G. (1999b) Cypermethrin pour-on synergized with piperonyl butoxide: effects on *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) natural populations resistant to cypermethrin. *Veterinary Parasitology*, **83**, 65–72.
- Guglielmone, A.A., Volpogni, M.M., Anziani, O.S. & Flores, S.G. (1999c) Evaluation of injectable abamectin to control natural infestations of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in cattle. *Journal of Medical Entomology*, **36**, 325–328.
- Guglielmone, A.A., Kunz, S.E., Castelli, M.E. et al. (2000a) Susceptibilidad al diazinón de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) de diferentes localidades argentinas y del sur de Brasil. *Revista de Medicina Veterinaria*, **91**, 184–186.
- Guglielmone, A.A., Volpogni, M.M., Scherling, N. et al. (2000b) Chlорfenapyr ear tags to control *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, **93**, 77–82.
- Guglielmone, A.A., Curto, E., Anziani, O.S. & Mangold, A.J. (2000c) Cattle breed-variation in infestation by the horn fly *Haematobia irritans*. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 272–276.
- Guglielmone, A.A., Castelli, M.E., Volpogni, M.M. et al. (2001) Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in its American southern range. *Veterinary Parasitology*, **101**, 67–73.
- Guglielmone, A.A., Castelli, M.E., Volpogni, M.M., Anziani, O.S. & Mangold, A.J. (2002) Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 310–315.
- Guglielmone, A.A., Volpogni, M.M., Quaino, O.R., Anziani, O.S. & Mangold, A.J. (2004) Abundance of stable flies on heifers treated for control of horn flies with organophosphate-impregnated ear tags. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 10–13.
- Guillot, F.S., Miller, J.A. & Kunz, S.E. (1988) The physiological age of female horn flies (Diptera: Muscidae) emigrating from a natural population. *Journal of Economic Entomology*, **81**, 555–561.
- Guimarães, J.A. & Mendes, J. (1998) Succession and abundance of Staphylinidae in cattle dung in Uberlândia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**, 127–131.
- Harris, H.L. & Summerlin, J.W. (1984) Parasites of horn fly pupae in East Central Texas. *Southwestern Entomologist*, **9**, 169–173.
- Harris, R.L., Frazer, E.D. & Graham, O.H. (1966) Resistance to ronnel in a strain of horn flies. *Journal of Economic Entomology*, **59**, 387–390.
- Harris, R.L., Frazer, E.D. & Grossman, P.D. (1968) Notes on the mating habits of the horn fly. *Journal of Economic Entomology*, **61**, 1639–1640.
- Harris, R.L., Frazer, E.D. & Younger, R.L. (1973) Horn flies, stable flies, and house flies: development in faeces of bovines treated orally with juvenile hormone analogues. *Journal of Economic Entomology*, **66**, 1099–1102.
- Harvey, T.L. & Brethour, J.R. (1979) Effect of horn flies on weight gains of beef cattle. *Journal of Economic Entomology*, **72**, 516–518.
- Hatano, Y. & Hori, K. (1989) Comparison of biochemical properties of proteinases from the midgut of two bloodsucking insects, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) and *Stomoxyx calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Applied Entomology and Zoology*, **24**, 245–252.
- Haufe, W.O. (1979) Reduced productivity of beef cattle infested with horn flies. *Research Highlights 1978* (ed. by G. C. R. Croome & N.D. Holmes), pp. 61–63. Agriculture Canada Research Station, Lethbridge, AB.
- Haufe, W.O. (1982) Growth of range cattle protected from horn flies (*Haematobia irritans*) by ear tags impregnated with fenvalerate. *Journal of Animal Science*, **62**, 567–573.
- Haufe, W.O. (1986a) A modelling system for horn flies on cattle. *Modelling and Simulation: Tools for Management of Veterinary Pests* (ed. by J. A. Miller), ARS-46. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
- Haufe, W.O. (1986b) Productivity of the cow-calf unit in range cattle protected from horn flies, *Haematobia irritans* (L.), by pesticidal ear tags. *Canadian Journal of Animal Science*, **66**, 575–589.
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, **45**, 371–391.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. & Ranson, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 653–665.
- Hogsette, J.A. & Farkas, R. (2000) Secretophagous and haematophagous higher Diptera. *Contributions to a Manual of Palearctic Diptera* (ed. by L. Papp & B. Darvas), Vol. 1, pp. 769–792. Science Herald, Budapest.
- Hogsette, J.A., Prichard, D.L. & Ruff, J.P. (1991) Economic effects of horn fly (Diptera: Muscidae) populations on beef cattle exposed to three pesticide treatment regimes. *Journal of Economic Entomology*, **84**, 1270–1274.
- Holloway, M.T.P. & Phelps, R.J. (1991) The responses of *Stomoxyx* spp. (Diptera, Muscidae) to traps and artificial host odours in the field. *Bulletin of Entomological Research*, **81**, 51–55.
- Hori, K., Hori, Y. & Kuramochi, K. (1983) DEAE-cellulose chromatography of trypsin-like enzyme and aminopeptidase in the midgut of the adult horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) and adult stable fly, *Stomoxyx calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Applied Entomology and Zoology*, **18**, 432–435.
- Hu, G.Y. & Frank, J.H. (1996) Effect of the arthropod community on survivorship of immature *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in north central Florida. *Florida Entomologist*, **79**, 497–503.
- Hu, G.Y. & Frank, J.H. (1997) Predation on the horn fly (Diptera: Muscidae) by five species of *Philonthus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Environmental Entomology*, **26**, 1240–1246.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (1995) *Análisis General de Problemas en los Cueros, Presuntamente Provocados por la Haematobia irritans de Acuerdo a la Información Presentada por Empresas Curtidoras*. Servicio Nacional de Sanidad Animal, INTA, Mimeograph, Xxx.

- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M. & Kunz, S.E. (1998) Role of the *kdr* and *super-kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**, 1031–1037.
- Jensen, K.M., Jespersen, J.B., Birkett, M.A., Pickett, J.A., Thomas, G., Wadham, L.J. & Woodcock, C.M. (2004) Variation in the load of the horn fly, *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of individual heifers. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 275–280.
- Jones, C.J., Patterson, R.S., Koehler, P.G., Bloomcamp, C.L., Hagenbuch, B.E. & Milne, D.E. (1988) Horn fly (Diptera: Muscidae) control on horses using pyrethroid tags and tail tapes. *Florida Entomologist*, **71**, 205–207.
- Jonsson, N.N. & Mayer, D.G. (1999) Estimation of the effects of buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*) on the milk production of dairy cattle based on a meta-analysis of literature data. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 372–376.
- Kerlin, R.L. & Allingham, P.G. (1992) Acquired immune response of cattle exposed to buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Veterinary Parasitology*, **43**, 115–129.
- Kohlmann, B. (1994) A preliminary study of the invasion and dispersal of *Digitonophagus gazella* (Fabricius, 1787) in Mexico (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *Acta Zoológica Mexicana*, **61**, 35–42.
- Koller, W.W., Gomes, A., Rodrigues, S.R. & Mendes, J. (2002) Staphylinidae (Coleoptera) associated to cattle dung in Campo Grande, MS, Brazil. *Neotropical Entomology*, **31**, 641–645.
- Kramm, C.A. (2000) Actividad de vuelo de *Stomoxys calcitrans* (L.) y niveles de infestación de *Haematobia irritans* (L.), su relación con factores ambientales e influencia de estas especies sobre el comportamiento de vacas lecheras. Thesis, Universidad Austral de Chile (Southern University of Chile), Valdivia.
- Kunz, S.E. (1991) Dynamics of permethrin resistance in a colony of horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **28**, 63–66.
- Kunz, S.E., Harris, R.L., Hogan, B.F. & Wright, J.E. (1977) Inhibition of development in a field population of horn flies treated with diflubenzuron. *Journal of Economic Entomology*, **70**, 298–300.
- Kunz, S.E., Kinzer, H.G. & Miller, J.A. (1983) Areawide cattle treatments on populations of horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **76**, 525–528.
- Kunz, S.E., Miller, J.A., Sims, P.L. & Meyerhoeffer, D.C. (1984) Economics of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in range cattle management. *Journal of Economic Entomology*, **77**, 657–660.
- Kunz, S.E., Murrell, K.D., Lambert, G., James, L.F. & Terrill, C.E. (1991) Estimated losses of livestock to pests. *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture* (ed. by D. Pimental), pp. 68–69. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kuramochi, K. (2000a) Ovipositional behaviour of the horn fly (Diptera: Muscidae) in the field. *Journal of Medical Entomology*, **37**, 461–466.
- Kuramochi, K. (2000b) Survival, ovarian development and bloodmeal size for the horn fly *Haematobia irritans* reared *in vitro*. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 201–206.
- Legner, E.F. & Warkentin, R.W. (1991) Influence of *Onthophagus gazella* on horn fly, *Haematobia irritans*, density in irrigated pastures. *Entomophaga*, **36**, 547–553.
- Leite, R.C., Rodriguez, Z., Faccini, J.L.H., Oliveira, P.R. & Fernandes, A.A. (1998) First report of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) as vector of *Dermatobia hominis* (L.jr.) (Diptera: Cuterebridae) in Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**, 761–762.
- Lemke, L.A. & Kissam, J.B. (1988) Impact of red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) predation on horn flies (Diptera: Muscidae) in a cattle pasture treated with pro-drone. *Journal of Economic Entomology*, **81**, 855–858.
- Li, A.Y., Guerrero, F.D., Almazan Garcia, C. & George, J.E. (2003) 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*, **40**, 942–949.
- Li, A.Y., Guerrero, F.D. & Pruitt, J.H. (2007) Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **87**, 147–155.
- Lindquist, A.W. (1936) Parasites of horn fly and other flies breeding in dung. *Journal of Economic Entomology*, **29**, 1154–1158.
- Logan, J.G. & Birkett, M.A. (2007) Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest Management Science*, **xx**, xxx–xxx.
- Lund, A.E. & Narahashi, T. (1983) Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroid and DDT analogues. *Pesticide Biochemistry Physiology*, **20**, 203–216.
- Luzuriaga, R., Eddi, C., Caracostantogolo, J., Botto, E. & Pereira, J. (1991) Diagnóstico de parasitación con *Haematobia irritans* (L.) en bovinos de Misiones, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, **72**, 262–263.
- Lysyk, T.J. (1991) Use of life-history parameters to improve a rearing method for horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), on bovine hosts. *Canadian Entomologist*, **123**, 1199–1207.
- Lysyk, T.J. (1992a) Effect of larval rearing temperature and maternal photoperiod on diapause in the horn fly (Diptera, Muscidae). *Environmental Entomology*, **21**, 1134–1138.
- Lysyk, T.J. (1992b) Simulating development of immature horn flies, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), in Alberta. *Canadian Entomologist*, **124**, 841–851.
- Lysyk, T.J. (2000) Comparison of sample units for estimating population abundance and rates of change of adult horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **37**, 299–307.
- Lysyk, T.J. & Colwell, D.D. (1996) Duration of efficacy of diazinon ear tags and ivermectin pour-on for control of horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **89**, 1513–1520.
- Lysyk, T.J. & Moon, R.D. (1994) Diapause induction in the horn fly (Diptera, Muscidae). *Canadian Entomologist*, **126**, 949–959.
- Macqueen, A. & Birne, P. (1975) Influence of other insects on production of horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), from cattle dung in south central British Columbia. *Canadian Entomologist*, **107**, 1255–1264.
- Maldonado-Simán, E., Améndola Massiotti, R., Cadena Meneses, J.A., Bermúdez Villanueva, L. & Kunz, S.E. (2006) Preliminary observations on the seasonal fluctuation of *Haematobia irritans* in Central Mexico. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, **16**, 31–38.
- Marchiori, C.H., Oliveira, A.T. & Linhares, A.X. (2000) Species of *Spalangia* (Hymenoptera: Pteromalidae: Spalangiane) as parasitoid pupa of muscoid dipterous insects in cattle faeces in Goiás State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **52**, 357–359.
- Marchiori, C.H., Caldas, E.R. & Almeida, K.G. (2002) Microhymenopterous parasitoids collected in cattle dung in Itumbiara, Goiás. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **52**, 357–359.
- Mariategui, P.G., Speicys, C., Urretabizkaya, N. & Fernández, E. (2001) Efecto de *Ontherus sulcator* F. (Coleoptera: Scarabaeidae) en la incorporación de estiércol al suelo. *[Ontherus sulcator* F.

42

43

- (Coleoptera: Scarabaeidae) effect in the incorporation of dung from the soil.] *Zootecnia Tropical*, **19**, 131–138.
- Mariategui, P.G., Speics, C. & Urretabizkaya, N. (2004) Evaluación de la dinámica poblacional de *Philonthus flavolimbatus* (Erichson 1753) (Coleoptera, Staphylinidae), en materia fecal bovina: su análisis como potencial biocontrolador de *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Diptera, Muscidae) en campos de la cuenca del Río Salado, Buenos Aires, República Argentina. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, **34**, 233–236.
- Marley, S.E., Lockwood, J.A., Byford, R.L. & Luther, D.G. (1991) Temporal, climatic, and physiological mediation of dispersal in the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae). *Environmental Entomology*, **20**, 1612–1618.
- Marley, S.E., Hall, R.D. & Corwin, R.M. (1993) Ivermectin cattle pour-on duration of a single late spring treatment against horn flies, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Missouri, U.S.A. *Veterinary Parasitology*, **51**, 167–172.
- McKenzie, C.L. & Richerson, J.V. (1993) Parasitoids of the horn fly in rangeland ecosystems of trans-pecos (Texas) *Southwestern Entomologist*, **18**, 57–59.
- McLintock, J. & Depner, K.R. (1954) A review of the life-history and habits of the horn fly, *Siphona irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Canadian Entomologist*, **86**, 20–33.
- Mehlhorn, H. (ed.) (2001) *Encyclopaedic Reference of Parasitology*, 2nd edn, pp. xxx–xxx. Springer-Verlag, Berlin.
- Mendes, J. & Linhares, A.X. (1999) Diapause, pupation sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**, 185–190.
- Mihok, S., Kangethe, E.K. & Kamau, G.K. (1995) Trials of traps and attractants for *Stomoxys* spp. (Diptera, Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, **32**, 283–289.
- Miller, J.A., Kunz, S.E., Oehler, D.D. & Miller, R.W. (1981) Larvicidal activity of Merck MK-933, an avermectin, against the horn fly, stable fly, face fly, and house fly. *Journal of Economic Entomology*, **74**, 608–611.
- Miller, J.A., Oehler, D.D., Siebenaler, A.J. & Kunz, S.E. (1986) Effect of ivermectin on survival and fecundity of horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **79**, 1564–1569.
- Miller, J.A., Oehler, D.D. & Scholl, P.J. (1994) Moxidectin: pharmacokinetics and activity against horn flies (Diptera: Muscidae) and trichostrongyle nematode egg production. *Veterinary Parasitology*, **53**, 133–143.
- Miller, J.A., Davey, R.B., Oehler, D.D., Pound, J.M. & George, J.E. (2003) Efficacy of the ivermectin SR bolus for control of horn flies (Diptera: Muscidae) on cattle in South Texas. *Journal of Economic Entomology*, **96**, 1608–1611.
- Miranda, C.H.B., Nascimento, Y.A. & Bianchin, I. (1990) Desenvolvimento de um programa integrado de controle dos nematódeos e a mosca-dos-chifres na região dos Cerrados. Fase 3. Potencial de *Onthophagus gazella* no enterro de fezes bovinas. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte. *Pesquisa em Andamento* **42**, 5.
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.M. & Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 5922–5926.
- Mwangala, F.S. & Galloway, T.D. (1993a) Susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), to Pyrethroids in Manitoba. *Canadian Entomologist*, **125**, 47–53.
- Mwangala, F.S. & Galloway, T.D. (1993b) Dynamics of pyrethroid resistance in horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), populations on tagged and untagged cattle in Manitoba. *Canadian Entomologist*, **125**, 839–845.
- Owens, W.E., Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Ray, C.H. & Nickerson, S.C. (1998) Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, **59**, 1122–1124.
- Presley, S.M., Knapp, F.W., Boling, J.A. & Burg, J.G. (1996) Effects of the horn fly (Diptera: Muscidae) on physiological and nutritional responses of beef steers: continuous fly population levels. *Journal of Economic Entomology*, **89**, 138–143.
- Pruett, J.H. (1999) Immunological control of arthropod ectoparasites: a review. *International Journal for Parasitology*, **29**, 25–32.
- Pruett, J.H., Steelman, C.D., Miller, J.A., Pound, J.M. & George, J.E. (2003) Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. *Veterinary Parasitology*, **116**, 251–258.
- Quisenberry, S.S. & Strohbehn, D.R. (1984) Horn fly (Diptera: Muscidae) control on beef cows with permethrin-impregnated ear tags and effect on subsequent calf weight gains. *Journal of Economic Entomology*, **77**, 422–424.
- Quisenberry, S.S., Lockwood, J.A., Byford, R.L., Wilson, H.K. & Sparks, T.C. (1984) Pyrethroid resistance in the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **77**, 1095–1098.
- Riley, P.J., Byford, R.L., Hallford, D.M., Campbell, J.W. & Perez-Eguia, E. (1994) Serum constituent profiles of beef heifers infested with horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **87**, 1564–1568.
- Ripa, R.S., Rojas, P.S. & Velasco, G. (1995) Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean). *Entomophaga*, **40**, 427–440.
- Rodríguez, L.C. & Niemeyer, H.M. (2005) Integrated pest management, semiochemicals and microbial pest-control agents in Latin American agriculture. *Crop Protection*, **24**, 615–623.
- Rodríguez, R., Almazán, C. & Armendáriz, I. (2004) Estudios preliminares con nemátodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae). *Veterinaria México*, **35**, 339–350.
- Romano, A. & Ferrari, O. (1993) Mosca de los Cuernos. (ed. by Brouwer), pp. 11–49. Xxx, Xxx.
- Roth, J.P. (1989) Some effects of methoprene on *Spalangia cameroni*, a parasitoid of horn fly pupae. *Southwestern Entomologist*, **14**, 91–96.
- Roth, J.P., Fincher, G.T. & Summerlin, J.W. (1983) Competition and predation as mortality factors of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), in a Central Texas pasture habitat. *Environmental Entomology*, **12**, 106–109.
- Roth, J.P., Macqueen, A. & Bay, D.E. (1988) Predation by the introduced phoretic mite, *Macrocheles peregrinus* (Acari, Macrochelidae), on the buffalo fly, *Haematobia irritans exigua* (Diptera, Muscidae), in Australia. *Environmental Entomology*, **17**, 603–607.
- Sanson, D.W., DeRosa, A.A., Oremus, G.R., Foil, L.D. (2003) Effect of horn fly and internal parasite control on growth of beef heifers. *Veterinary Parasitology*, **117**, 291–300.
- Schmidt, C.D. (1983) Activity of an avermectin against selected insects in ageing manure. *Environmental Entomology*, **12**, 455–457.
- Schmidt, C.D., Kunz, S.E., Petersen, H.D. & Robertson, J.L. (1985) Resistance of horn flies (Diptera: Muscidae) to permethrin and fenvalerate. *Journal of Economic Entomology*, **78**, 402–406.
- Schnitzerling, H.J., Noble, P.J., Macqueen, A. & Dunham, J. (1982) Resistance of the buffalo fly, *Haematobia irritans exigua* (DeMejere), to two synthetic pyrethroids and DDT. *Journal of the Australian Entomological Society*, **21**, 77–80.
- Schofield, S. & Brady, J. (1997) Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel. *Physiological Entomology*, **22**, 380–386.

- Schofield, S., Cork, A. & Brady, J. (1995) Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to components of host odour. *Physiological Entomology*, **20**, 273–280.
- Schofield, S., Witty, C. & Brady, J. (1997) Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol on the activity of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Physiological Entomology*, **22**, 256–260.
- Schreiber, E.T. & Campbell, J.B. (1986) Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host colour and time of day. *Environmental Entomology*, **15**, 1307–1309.
- Schreiber, E.T., Campbell, J.B., Kunz, S.E., Clanton, D.C. & Hudson, D.B. (1987) Effects of horn fly (Diptera: Muscidae) control on cows and gastrointestinal worm (Nematode: Trichostrongylidae) treatment for calves on cow and calf weight gains. *Journal of Economic Entomology*, **80**, 451–454.
- Scott, J.A., Plapp, F.W. & Bay, D.E. (1997) Pyrethroid resistance associated with decreased biotic fitness in horn flies (Diptera: Muscidae). *Southwestern Entomologist*, **22**, 405–410.
- Sereno, F.T. (2000) Pupae of horn fly, *Haematobia irritans*, collected in faeces of nelore breed in the Brazilian Pantanal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **35**, 1685–1688.
- Shaw, S.A. & Sutherland, I.A. (2006) The prevalence of Stephanofilaria sp. in buffalo fly, *Haematobia irritans exigua*, in Central Queensland. *Australian Journal of Entomology*, **45**, 198–201.
- Sheppard, D.C. (1983a) Fenvalerate and flucythrinate resistance in horn fly population. *Journal of Agricultural Entomology*, **1**, 305–310.
- Sheppard, D.C. (1983b) Stirofos resistance in a population of horn flies. *Journal of Georgia Entomologist Society*, **18**, 370–376.
- Sheppard, D.A. (1995) Oxidative metabolic resistance to cyanopyrethroids in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **88**, 1531–1535.
- Sheppard, D.C. & Joyce, J.A. (1992) High levels of pyrethroid resistance in horn flies (Diptera: Muscidae) selected with cyhalothrin. *Journal of Economic Entomology*, **85**, 1587–1593.
- Sheppard, D.C. & Joyce, J.A. (1998) Increased susceptibility of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae) to chlорfenapyr. *Journal of Economic Entomology*, **91**, 398–400.
- Shoop, W.L., Mrozik, H. & Fisher, M.H. (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139–156.
- Shoop, W.L., Egerton, J.R., Eary, C.H. et al. (1996) Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. *International Journal for Parasitology*, **26**, 1237–1242.
- Silva, J.J. & Mendes, J. (2002) Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlandia, State of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 679–682.
- Silva, J.J., Mendes, J. & Lomônaco, C. (2004) Developmental stress by Diflubenzuron in *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Neotropical Entomology*, **33**, 249–253.
- Soderlund, D.M. & Knipple, D.C. (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 563–577.
- Sparks, T.C. & Byford, R.L. (1988) Pyrethroid-synergist mixtures: toxicity, resistance and field efficacy toward pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **81**, 1567–1574.
- Sparks, T.C., Quisenberry, S.S., Lockwood, J.A., Byford, R.L. & Roush, R.T. (1985) Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Journal of Agricultural Entomology*, **2**, 217–233.
- Späth, J. (1997) Natural host odours as possible attractants for *Glossina tachinoides* and *G. longipalpis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, **68**, 149–158.
- Stear, M.J., Newman, M.J., Nicholas, F.W., Brown, S.C. & Holroyd, R.G. (1984) Tick resistance and the major histocompatibility system. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **62**, 47.
- Steelman, C.D., Brown, A.H. Jr, Gbur, E.E. & Tolley, G. (1991) Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. *Journal of Economic Entomology*, **84**, 1275–1282.
- Steelman, C.D., McNew, R.W., Brown, M.A., Tolley, G. & Phillips, J.M. (1994) Efficacy of Brahman breeding in the management of insecticide-resistant horn flies (Diptera: Muscidae) on beef cattle. *Journal of Economic Entomology*, **87**, 7–14.
- Steelman, C.D., Brown, C.J., McNew, R.W., Gbur, E.E., Brown, M.A. & Tolley, G. (1996) The effects of selection for size in cattle on horn fly population density. *Medical and Veterinary Entomology*, **10**, 129–136.
- Steelman, C.D., McNew, R.W., Simpson, R.B., Rorie, R.W., Phillips, J.M. & Rosenkrans, C.F. (2003) Evaluation of alternative tactics for management of insecticide-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 892–901.
- Steenberg, T., Jespersen, J.B., Jensen, K.M.V., Nielsen, B.O. & Humber, R.A. (2001) Entomopathogenic fungi in flies associated with pastured cattle in Denmark. *Journal of Invertebrate Pathology*, **77**, 186–197.
- Summerlin, J.W., Olson, J.K., Blume, R.R., Aga, A. & Bay, D.E. (1977) Red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): effects on the *Oncophagous gazella* and the horn fly. *Environmental Entomology*, **6**, 440–442.
- Summerlin, J.W., Petersen, H.D. & Harris, R.L. (1984) Red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): effects on the horn fly (Diptera: Muscidae) and coprophagous scarabs. *Environmental Entomology*, **13**, 1205–1210.
- Temeyer, K.B. (1984) Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the dipteran *Haematobia irritans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 952–955.
- Thomas, D.B. & Kunz, S.E. (1986) Diapause survival of overwintering populations of the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in South-central Texas. *Environmental Entomology*, **15**, 44–48.
- Thomas, G.D. & Morgan, C.E. (1972) Field-mortality studies of the stages of the horn fly in Missouri. *Environmental Entomology*, **1**, 453–459.
- Torr, S.J., Hall, D.R. & Smith, J.L. (1995) Responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to natural and synthetic ox odours. *Bulletin of Entomological Research*, **85**, 157–166.
- Torr, S.J., Mangwiyo, T.N.C. & Hall, D.R. (1996) Responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to synthetic repellents in the field. *Bulletin of Entomological Research*, **86**, 609–616.
- Torr, S.J., Hall, D.R., Phelps, R.J. & Vale, G.A. (1997) Methods for dispensing odour attractants for tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **87**, 299–311.
- Torr, S.J., Wilson, P.J., Schofield, S., Mangwiyo, T.N.C., Akber, S. & White, B.N. (2001) Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 78–86.
- Torr, S.J., Mangwiyo, T.N.C. & Hall, D.R. (2006) The effects of host physiology on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) to cattle. *Bulletin of Entomological Research*, **96**, 71–84.
- Torres, P.R., Cicchino, A.C., Abrahamovich, A.H. & Nuñez, J.L. (1993) Damage in the skin and leather caused by the horn fly (Diptera: Muscidae). *Annals of the 22nd Congress of the International Union Leather Technologists and Chemists Societies*, pp. 543–550. Porto Alegre, Brazil.
- Torres, P.R., Balbi, A., Sheppard, D.C., Prieto, O.H. & Nuñez, J.L. (1996) Resistencia de la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* (L. 1758) al fenvalerato en la provincia Corrientes, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, **77**, 136–140.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
- Tyndale-Biscoe, M. (1996) *Australia's Introduced Dung Beetles: Original Releases and Redistributions*. Technical Report 62, pp. xxx–xxx. CSIRO Division of Entomology, Xxx.
- Untalan, P.M., Pruitt, J.H., Atteberry, H.N. & Steelman, C.D. (2006) Thrombostasin isoform frequency in a Central Texas field population of the horn fly, *Haematobia irritans*. *Veterinary Parasitology*, **142**, 359–366.
- Urech, R., Brown, G.W., Moore, C.J. & Green, P.E. (2005) Cuticular hydrocarbons of buffalo fly, *Haematobia exigua*, and chemotaxonomic differentiation from horn fly, *H. irritans*. *Journal of Chemical Ecology*, **31**, 2451–2461.
- Uzuka, Y., Yoshioka, T., Tanabe, S. et al. (1999) Chemical control of *Haematobia irritans* with 0.5% topical ivermectin solution in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, **61**, 287–289.
- Vale, G.A. (1980) Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. *Bulletin of Entomological Research*, **70**, 563–570.
- Vale, G.A. & Hall, D.R. (1985a) The role of 1-octen-3-ol, acetone and carbon dioxide in the attraction of tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae), to ox odour. *Bulletin of Entomological Research*, **75**, 209–217.
- Vale, G.A. & Hall, D.R. (1985b) The use of 1-octen-3-ol, acetone and carbon dioxide to improve baits for tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Bulletin of Entomological Research*, **75**, 219–231.
- Valério, J.R. & Guimarães, J.R. (1983) Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae) no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **1**, 417–418.
- Vanzini, G.L., Tourni, R. & Llovet, L. (1997) Daños ocasionados por ectoparásitos en la industria del cuero. *Therios*, **26**, 84–88.
- Velasco, R., González, J., Morales, G. & Ortega, E. (2001) Daño económico y costos de control en bovinos: mosca de los cuernos. *Informativo Agropecuario Boleche – INIA Quilamapu*, **14**, 4–7.
- Vera, V.D. (1995) La calidad del cuero vacuno está afectada por una nueva plaga de la ganadería: la mosca de los cuernos. *Revista Cuero*, **xx**, 20–27.
- Vogelsang, E.G. & De Armas, J.C. (1940) La mosquilla del ganado, *Hyperosia irritans* (L.) en Venezuela. *Revista de Medicina Veterinaria y Parasitología*, **2**, 95–98.
- Wallace, M.M. & Holm, E. (1983) Establishment and dispersal of the introduced predatory mite, *Machrocoleus peregrinus* Krantz, in Australia. *Journal of Australian Entomological Society*, **22**, 345–348.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. & Williamson, M.S. (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemistry Journal*, **359**, 175–181.
- Watrelot-Virieux, D. & Pin, D. (2006) Chronic eosinophilic dermatitis in the scrotal area associated with stephanofilariasis infestation of Charolais bull in France. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, **53**, 150–152.
- Weinzierl, R.A., Schmidt, C.D., Faulkner, D.B., Cmarik, G.F. & Zinn, G.D. (1990) Chronology of permethrin resistance in a southern Illinois population of the horn fly (Diptera: Muscidae) during and after selection by pyrethroid use. *Journal of Economic Entomology*, **83**, 690–697.
- Wharton, R.H. (1974) Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. *Control of Arthropods of Medical and Veterinary Importance* (ed. by R. Pal & R. H. Warthon), pp. xxx–xxx. Plenum, New York.
- Wijffels, G., Hughes, S., Gough, J., Allen, J., Don, A., Marshall, K., Kay, B. & Kemp, D. (1999) Peritrophins of adult dipteran ectoparasites and their evaluation as vaccine antigens. *International Journal for Parasitology*, **29**, 1363–1377.
- Willadsen, P. (1997) Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*, **71**, 209–222.
- Willadsen, P. (2006) Vaccination against ectoparasites. *Parasitology*, **133**(Suppl.), 9–25.
- Williams, R.E. & Westby, E.J. (1980) Evaluation of pyrethroids impregnated in cattle ear tags for control of face flies and horn flies. *Journal of Economic Entomology*, **73**, 791–792.
- World Health Organization/Food & Agriculture Organization (2000) *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Residues of some Veterinary Drugs in Animals and Foods*, p. 118. WHO, Rome.
- Wright, E.J., Muller, P. & Kerr, J.D. (1989) Agents for biological control of novel hosts: assessing an Aleocharine parasitoid of dung-breeding flies. *Journal of Applied Ecology*, **26**, 453–461.
- Zhang, D., Cupp, M.S. & Cupp, E.W. (2001) Polymorphism of the thrombostasin gene in the horn fly (*Haematobia irritans*) revealed in a cDNA library and in genomic DNA. *Molecular Genetics and Genomics*, **266**, 296–302.
- Zhang, D., Cupp, M.S. & Cupp, E.W. (2002) Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**, 321–330.
- Zyzak, M.D., Byford, R.L., Craig, M.E. & Lockwood, J.A. (1996) Behavioural responses of the horn fly (Diptera: Muscidae) to selected insecticides in contact and non-contact environments. *Environmental Entomology*, **25**, 120–129.

Accepted 31 January 2008

1 Oyarzún et al.: Horn Fly and Cattle Semiochemicals Andrés Quiroz
2 Laboratorio Química
3 Journal of Medical Entomology Ecológica, Universidad de la
4 Behavior, Chemical ecology Frontera, Temuco, Chile,
5 Box 54-D, Temuco, Chile
6 Phone: +56 45 325441
7 E-mail: aquiroz@ufro.cl
8
9

10 **New Semiochemicals Involved in Cattle Selection by the Horn Fly**
11 **(Diptera: Muscidae)**

12
13 ¹M P. Oyarzún, ¹R. Palma, ¹E. Alberti, ²E. Hormazabal, ¹F. Pardo, ³M. Birkett and ²A.
14 Quiroz

15
16
17 ¹Doctorado Ciencias Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile,
18 Box 54-D, Temuco, Chile. ² Laboratorio de Química Ecológica, Departamento de
19 Ciencias Químicas, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.
20 ³Chemical Ecology Group, Biological Chemistry Division, Rothamsted Research,
21 Harpenden, Herts, AL AL5 1LG, United Kingdom.

22 **Abstract**

23 The horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), causes important economic
24 damage to the cattle industry. Because the horn fly is becoming increasingly resistant to
25 insecticides, odor-based fly traps may provide an alternative method for pest control.
26 We studied the response of *H. irritans* to odors emitted by Holstein Friesian heifers with
27 different individual horn fly loads. A number of volatile 2-ketoalkanes were identified
28 from the gas chromatograph profiles of odor samples taken from cattle attracting both
29 above and below average fly loads. The semiochemical properties of these compounds
30 were then investigated further through behavioral bioassays. Horn fly behavioral
31 responses to semiochemical compounds were tested using a Y-tube olfactometer.
32 Based on the behavioral data, 2-decanone was identified as an repellent, while 2-
33 undecanone was identified as an attractant. This new semiochemicals add new
34 information to the fully understanding of the host selection process of the horn fly and
35 its possible application for developing new odor-based. control methods.

36

37 **Key words:** *Haematobia irritans*, cattle, host, semiochemicals, 2-ketones.

38 The horn fly, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae), is a major haematophagous
39 pest cattle worldwide (Byford et al. 1992). The horn fly's biting and nuisance
40 behaviour results in large annual economic losses in milk and beef production industries
41 (Kunz 1991, Guglielmone et al. 1998, DeRouen et al. 2003).

42

43 Currently, horn fly pest control is primarily achieved with insecticides. However,
44 because the organism has developed resistance to these chemicals, alternative methods
45 of control have become necessary (Byford et al. 1999, Steelman et al. 2003). One novel
46 approach is based on behavior-based methods that involve traps baited with natural horn
47 fly attractants.

48

49 Previous studies have demonstrated that the host selection process of haematophagous
50 flies is mediated by a variety of long- and short-rang host cues, such as color (Ernst and
51 Krasfur 1984), size (Guglielmone et al. 2000), hair density (Steelman et al. 1997), and
52 odor (Christensen and Dobson 1979, Brown et al. 1992). Specifically, host odor plays
53 an important role in the host selection processes of many haematophagous flies.

54 Efforts have been made to elucidate the role of volatile semiochemicals in the process of
55 identifying a suitable host not only from a variety of different species, but also from a
56 group of animals within a single species (Torr & Mangwiyo 2000; Birkett et al. 2004,
57 Torr et al. 2006; Logan and Birkett 2007). Previous studies regarding the effects of
58 host-derived semiochemicals on the host selection habits of cattle flies have been
59 concentrated on a few Diptera species of epidemiological importance. In these studies it
60 was demonstrated that both *Glossina sp.* (Diptera: Glossinidae) (Gikonyo et al. 2002)
61 and *Stomoxys* (Diptera: Muscidae) (Torr et al. 2006) discriminate between potential

62 hosts based on an individual host's odor, although the semiochemicals involved have
63 not yet been identified.

64

65 Information regarding the host selection behavior of *H. irritans* is scarce. One study
66 attempted to identify semiochemicals involved in discriminatory host selection within a
67 herd (Birkett et al. 2004). Experiments demonstrated that the antenna of *H. irritans*
68 respond to several volatile compounds, which are emitted differentially by 'attractive'
69 and 'non-attractive' cattle. These compounds included both 6-methyl-5-hepten-2-one
70 and 1-octen-3-ol, but their roles as either kairomones or allomones were not elucidated.

71

72 In Chile, *H. irritans* is a major pest to cattle and detrimentally affects animal production
73 during the summer months. Horn fly biting induces the stress response in cattle and
74 leads to annual economic losses of US\$ 24.3 million in the beef and milk industries
75 (Velasco et al. 2001). Like almost all other countries where the horn fly is present, in
76 Chile, the methods of controlling this pest exclusively rely on organophosphate and
77 pyrethroid insecticides. Farmers over-apply these chemicals, and this has led to
78 reductions in the insecticides' effectiveness. For that reason, research aimed at
79 developing alternative control methods, such as those involving olfactory attractants, is
80 required.

81

82 The semiochemicals released by the horn fly's natural hosts may have great potential as
83 bait for fly traps, so information regarding the role of these semiochemicals in
84 mediating the relationship between horn fly and cattle may prove useful for the
85 development of alternative pest control methods.

86

87 Herein we identify new semiochemicals of differing attractiveness to *Haematobia*
88 *irritans* that are released by Holstein Friesian cattle and might be useful in alternative
89 horn fly control strategies.

90

91 **Materials and methods**

92 **Study site.** Field studies were conducted at Centro Experimental Maquehue,
93 Universidad de La Frontera, Chile, South America (38° 75' south latitude, 72 ° 6' west
94 longitude). This region receives an annual average rainfall of 2,000 mm, but has a
95 relative dry summer season. During the period of investigation, average temperatures
96 oscillated 5 C°. Average temperature was 8.0°C during the coldest months and 15°C in
97 the warmest months. Cattle grazed upon a permanent pasture, which was mainly
98 composed of gramineous *Ballica sp.* and *Festuca sp.*

99

100 **Cattle.** Holstein Friesian heifers were studied because this cattle variety is the most
101 common breed raised by Chilean milk producers. The test herd consisted of 29 heifers,
102 which were all born in 2004 and were of similar color and weight. All cows grazed in
103 the same plot with an average separation of 500 m from the other cows. All heifers were
104 marked with visible ear tags. No treatment against ectoparasites was applied before or
105 during the study period.

106

107 **Identifying hosts of differing attractiveness within the herd.** In Chile, the horn fly
108 season occurs only during the summer months (November to April). *H. irritans* is
109 typically the only insect visible on grazing animals in southern farms and is easily
110 recognized by its small size and down-head position on the host animals. Because it has
111 not been established whether differences in fly-load among host animals is exclusively

112 the result of differential attractiveness or is rather the result of several related host-pest
113 factors, we decided to identify individuals as ‘high-carriers’ and ‘low-carriers’ rather
114 than as ‘more attractive’ and ‘less attractive’ respectively, in accordance with the
115 suggestion of Pruett et al. (2003). Flies were counted on 12 occasions between
116 10:00AM-12:00PM from 21 November to 16 December 2005. The counting method
117 employed was that described by Jensen et al. (2004). Any and all flies presents on the
118 heifer were counted at a distance of 1-2 m while the animal grazed. Individual counts
119 were standardized by dividing number of flies per heifer by the total herd fly count for
120 that day, and the data were analyzed by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) to identify any
121 differences among groups (StatsDirect Ltd. Cheshire, United Kingdom). When
122 differences were significant, the groups were further assessed using a Conover-Inman
123 test. The heifers were numerically ranked from lowest to highest carrier each day
124 based on each animal’s percentage of the daily total herd fly count. The three lowest-
125 ranked and the three highest-ranked heifers were selected for volatile air entrainment
126 experiments. The selected animals’ daily rankings were correlated at different times
127 during the observation period in order to determine whether or not the low- and high-
128 carrier traits were persistent over time. Once at the beginning of the observation period
129 and once at the end, the six selected cows’ day ranks were compared using a two-sided
130 test of correlations different from zero ($P < 0.05$) (GenStat 9.1, VSN International,
131 United Kingdom).

132

133 **Volatile air entrainment.** Volatile emitted by the heifers were trapped using a
134 variation of the method reported by Jensen et al. (2004). Heifers were kept in an
135 individual chute, and the animal was almost completely immobilized. The air
136 surrounding the animals was circulated (1.2 L min^{-1}), and any volatile emissions were

137 trapped on Porapak Q (50 mg) contained in two glass tubes (0.4 cm by 8 cm) positioned
138 near the animal's neck. The tubes were attached to a rope with a pulley to allow for the
139 mobility of the tubes. Volatile entrainment was performed on each animal twice for 9
140 hours on different days. After entrainment, the Porapak Q was washed with 500 µL of
141 redistilled diethyl ether to desorb any analytes. The resulting solution was concentrated
142 to 50 µL under a gentle stream of nitrogen and stored at -4°C until analysis was
143 performed. Volatile air entrainment was also performed in an empty stall to serve as
144 experimental blanks.

145

146 **Insect collection.** The three high-carrier and the three low-carrier heifers previously
147 selected were placed in a chute. Horn flies feeding on these hosts were then trapped in
148 1-L glass flasks (30 to 40 insects per flask), which were subsequently sealed with pieces
149 of entomological net. The flies were transported to the laboratory in a cooler maintained
150 at 8-10°C with the aid of ice packs. Once in the laboratory, flies were maintained in a
151 bioclimatic chamber programmed to 12°C and 16L:8D and were fed sucrose solution
152 (Schmidt et al. 1976). Under these conditions, the flies typically survived 3 to 4 days.

153

154 **Chemical Analyses .** Gas chromatography (GC) of air entrainment samples was
155 conducted using a Hewlett-Packard 5880 CG equipped with a 50 m x 0.32 mm i.d. HP-
156 1 non-polar column and an FID. For each chromatograph run, the temperature was
157 maintained at 40°C for 2 min and then increased at a rate of 10 C° min⁻¹ to 250°C. The
158 carrier gas was hydrogen. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was
159 performed using a Hewlett-Packard 5890 GC, which was equipped with an HP-1
160 column, coupled to a VG Autospec mass spectrometer (Fisons, Manchester, U.K.)
161 equipped with an electron impact ionizer set to 70 eV and 250°C. The GC oven was

162 programmed to maintain an initial temperature of 30°C for 5 min and then to heat at the
163 rate of 5 C° min⁻¹ before maintaining a constant temperature of 250°C. Compounds
164 tentatively identified by GC-MS were confirmed by co-injection of authentic samples
165 during GC and by the determination of Kovats indices (KI). Quantification was
166 achieved by comparison to external standards.

167

168 **Chemicals.** Chemicals used for identification by the GC peak enhancement method
169 (Merck, Germany) and for olfactometric bioassays (Merck, Germany) were diluted in
170 distilled hexane. Samples of the C7-C17 alkanes (Aldrich Chemical Company, U.K.)
171 were used as external reference standards for the determination of Kovats indices.

172

173 **Olfactometer bioassays.** A small, glass, dual-choice Y-tube olfactometer (stem 110
174 mm, arms 90 mm at a 130° angle, 10 mm i.d.) was used to evaluate the response of *H.*
175 *irritans* to the volatiles collected from the heifers. Each arm of the Y-tube was
176 connected to one of two 20 mL glass vials, each containing either test or control
177 volatiles. The base of the stem was connected to a vacuum pump, which produced
178 airflow through the arms and stem of the tube at a rate of 1,250 mL min⁻¹. A white light
179 (20 W) was placed at the junction of the arms.

180

181 Because previous work (Birkett et al. 2004) demonstrated no difference between males
182 and females in electrophysiology response, we used both sexes for preliminary
183 bioassays. The Y- tube was placed in a white box in a dark room at 25° C.

184

185 In order to test the biological activity of cattle odor extracts on *H. irritans* behavior,
186 flies were forced to choose between pure odor extracts from either high- or low-carrier

187 cows and hexane (control). Chemical standards were also tested in doses ranging from
188 10^{-8} g to 10^{-5} g, with the exception of cresols and 1-octen-3-ol, which were irritant at
189 higher doses. Compounds were spread on two strips of filter paper (10 μ L) and placed
190 into clean glass vials.

191 After 10 individual tests, the Y-tube was replaced with a clean one, and the treatment
192 and control arms were alternated. Y-tubes and vials were cleaned with neutral detergent,
193 rinsed with water, distilled water, and acetone to remove any organic residue, and then
194 dried in the oven at 100°C.

195 Preliminary experiments were performed to determine the horn flies' ability to walk
196 against increasing air flows and to establish any possible bias in their tube arm choice.

197 For the bioassays, individual horn flies were introduced into the Y-tube through a hole
198 in the base of the stem, which was immediately sealed with a rubber cap once the fly
199 had been introduced. The tube's small internal diameter prevented the flies from flying
200 within the tube (Koschier et al., 2000). Flies walked up the tube guided by the airflow
201 and light. In accordance with the scoring system outlined by Koschier et al. (2000),
202 once the fly reached the end of one arm of the tube, the choice was scored, and the fly
203 was removed from the tube. If the fly failed to make any choice within 3 min, the fly
204 was discarded. All compounds were tested at each dose with 30 different flies. Flies'
205 responses to stimulus vs. control were analyzed using a Chi square test at an error level
206 of 5%.

207

208 **Results**

209 The distribution of *H. irritans* within a herd of Holstein Friesian heifers, which were of
210 similar age and physiological condition, was uneven. A few heifers were found to be
211 high-carriers and others were low-carriers (Fig. 1). Based on statistical examination of

212 the horn fly load data, h3404, h8104, and h6904 heifers were selected as low carrier-
213 heifers, and h5804, h2304, and h1404 were selected as high-carrier heifers. There were
214 significant correlations between the heifer rankings on first day of counting and second
215 ($r=0.932$; $P<0.05$) and between those of the 11th and the 12th counting days ($r=0.973$ and
216 $r=0.929$; $P<0.05$). Thus, the heifers maintained their individual levels of infestation
217 throughout the duration of the study (Fig.2)

218

219 All odor samples obtained via air entrainment were desorbed and concentrated yielding
220 the organic extract so all samples had the same volume, 50 μ L. All concentrated
221 samples were subjected to preliminary analysis by GC, which indicated that all samples
222 shared same components (Table 1). Next, based on sample availability, one sample
223 from a high-carrier (h5804) and one sample from a low-carrier (h8104) were selected
224 for coupled GC-MS analysis. Both those compounds that were more abundant in the
225 chromatograph profile, such as *m*- and *p*-cresol, and those compounds previously
226 reported as semiochemical in other insect species, such as the 2-ketoalkanes (C8-C11)
227 and 6-methyl-5-hepten-2-one (6 MHO), were selected for the olfactometric bioassays.
228 In addition, 1-octen-3-ol was tested because of its established role as a kairomone in
229 haematophagous species.

230

231 Olfactometric bioassays with flies can be performed in both wind-tunnels and Y-tubes,
232 among other experimental setups, depending on the species examined and the objectives
233 of the experiment. Small-diameter Y-tubes are a good option when the effects of group
234 influence are undesirable, and they have been shown to be an effective method for
235 assessing the behaviors of single arthropods in response to stimulation with volatile
236 compounds (Koschier et al. 2000, Skelton et al. 2007). Because there were no previous

237 reports measuring the olfactory responses of the horn fly in a Y-tube, some preliminary
238 experiments were conducted in order to standardize the method. First, flies were tested
239 in Y-tubes equipped with hexane in both arms, and these experiments demonstrated that
240 the horn flies had no inherent preference for either arm, even when the olfactometer was
241 rotated 180°. No sex-related biases were observed in a similar set of experiments. In
242 addition, the air flow rate through the Y-tube was optimized. At higher flow rates, the
243 flies remained attached to the start point in the central stem and did not move. The air
244 flow rate was lowered accordingly to avoid this behavior.

245

246 Olfactometric bioassays showed that both *p*- and *m*-cresol attracted horn flies at the
highest doses and that flies had different responses to different 2-ketoalkanes

262

263 Analysis of the odor extracts revealed high quantities of *m*- and *p*-cresol, which was
264 unsurprising because these compounds are known products of urine decomposition
265 (Warnes 1990, Madubunyi et al. 1996, Birkett et al. 2004). Behavioral assays
266 demonstrated that *m*- and *p*-cresol elicited an attractant response from *H. irritans*. A
267 similar effect has been previously documented for the tsetse fly, *Glossina morsitans*
268 *morsitans* (Hassanali et al. 1986, Bursell et al. 1988). However, previous studies of the
269 antennal responses of *H. irritans* did not indicate sensitivity to cresol compounds
270 (Birkett et al. 2004). This discrepancy contradiction between electroantennographic and
271 behavioral assays results could be attributed either to the perception of cresol by non-
272 olfactory receptors or to differences in dosage between experiments (Vale, 1980, Torr et
273 al. 1996, Gikonyo et al., 2002).

274

275 The 2-ketoalkanes from 2-octanone to 2-undecanone were reported to be EAG-active
276 components of waterbuck odor, which is a non-host of *G. m. morsitans*. This suggested
277 that these compounds might act as allomones (Gikonyo et al. 2002). However, it is not
278 possible to associate any compound with a specific behavioral activity solely on the
279 basis of its EAG activity. In this study, the Y-tube assay results indicated that the 2-
280 ketoalkanes did not follow a consistent patron of semiochemical activity. The repellent
281 effect shown by 2-decanone was similar to those reported by long-chain ketones on
282 tsetse flies (Vale 1980). With regard to behavioral responses to 2-undecanone,
283 contradictory results have been reported for different species. In two haematophagous
284 fly species, *Culex quinquefasciatus* Say and *C. tarsalis* Coquillett, 2-undecanone
285 elicited significant EAG responses from gravid females, but it was not a
286 chemoattractant in behavioral bioassays (Du and Millar 1999). In contrast, Y-tube-

287 based behavioral studies demonstrated that both *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*
288 were significantly attracted by 2-undecanone at an optimal doses of $4 \cdot 10^{-5}$ g (Haas et al.
289 2006). On the other hand, for non-haematophagous species, 2-undecanone was not only
290 repellent but even toxic to *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera:
291 Aleyrodidae), a pest fly of tomatoes (Muigai et al. 2002).

292

293 Six-methyl-5-hepten-2-one has been identified before as component of waterbuck
294 (Gikonyo et al. 2002) and cattle odor (Birkett et al. 2004). In this study, this compound
295 was identified in volatile extracts from high and low-carrier heifers, differing from
296 Birkett et al. (2004) that reported its presence only in the odor from high-carrier heifers.
297 They also reported that 6 MHO had activity in EAG and repelled the flies in field assays
298 but it was not tested in behavioral bioassays for *H. irritans*, thus the compound was
299 selected for the Y-tube experiments showing to be neither attractive nor repellent to *H.*
300 *irritans*.

301

302 The compound 1-octen-3-ol was tested because its role as attractant for several
303 haematophagous species has been well established. Nevertheless, this compound had
304 not been tested with *H. irritans* until this study. The results agree with those of
305 Schofield and Brady (1997), who demonstrated that *Stomoxys calcitrans* responded to
306 concentrations between $0.0002 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ in wind tunnel experiments, but
307 did not respond at either lower or higher concentrations. In field experiment, 1-octen-3-
308 ol increased the number of *Stomoxys* caught, but the dosages were higher than those
309 used in laboratory and certainly higher than those naturally generated by the host
310 (Holloway and Phelps 1991, Mihok et al. 1995).

311

312 The basis of differential host preference by cattle flies has been related to several
313 features of both the host and the flies. Such features include phenotypic factors, such as
314 host immune system (Stear et al. 1984), host behavior, (Mullens et al. 2006), fly feeding
315 success (Pruett et al. 2003, Untalan et al. 2006), among others (Steelman et al. 1996),
316 but the host's odor clearly plays an important role (Torr et al. 2006). In order to
317 minimize the effect of phenotypic characteristics on the fly distribution, a homogeneous
318 herd was selected. All individuals had similar characteristic Holstein Friesian coloring
319 with roughly equal black-to-white ratios. Despite these measures to ensure phenotypic
320 homogeneity, flies were significantly more attracted to certain individuals within the
321 herd. Classification of a substance as either a kairomone or an allomone is not a simple
322 task. Unidentified masking compounds can synergize or interfere within the host (Torr
323 et al. 2006), and it can be difficult to establish appropriate dosages for experimentation
324 both in the laboratory and in field assays (Birkett et al. 2004). The results of this study
325 suggest that the attractiveness of high-carriers might be related to increased cresol and
326 2-undecanone emissions and/or that the repellent effect of 2-decanone, might be masked
327 by cresols or other compounds.

328

329 In conclusion, two 2-ketoalkanes are reported with semiochemical properties for
330 *Haematobia irritans*, adding to the current understanding of the chemical relationship
331 between this pest and cattle. Also, the Y-tube olfactometer was validated as a suitable
332 method for behavioral studies of *H. irritans*. Future work will field test these
333 semiochemicals in order to clarify their roles in the host selection process. Hopefully,
334 these findings will contribute to the development of new methods for horn fly control.

335

336

337 **Acknowledgements**

338 The authors are grateful to Dillman Boero for providing facilities at Centro
339 Experimental Maquehue and to Jorge Saez for the handling of cattle. This work was
340 supported by project DIUFRO 160604 from La Universidad de La Frontera.
341 Rothamsted Research receives grant-aided support from the Biotechnology and
342 Biological Sciences Research Council (BBSRC) of the United Kingdom.

343 **References**

344

345 **Birkett, M. A., N. Agelopoulos, K. M. V. Jensen, J. B. Jespersen, J. A. Pickett, H. J.**

346 **Prijs, G. Thomas, J. J. Trapman, L. J. Wadhams, and C. M. Woodcock.**

347 **2004.** The role of volatile semiochemicals in mediating host location and

348 selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Med. Vet. Entomol.*

349 18: 313-322.

350 **Brown, A. H., Jr, C. D. Steelman, Z. B. Johnson, C. F. Rosenkrans, Jr, and T. M.**

351 **Brasuell. 1992.** Estimates of repeatability and heritability of horn fly resistance

352 in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 1375-1381.

353 **Bursell, E., A. J. E. Gough, P. S. Beevor, A. Cork, D. R. Hall, and G. A. Vale. 1988.**

354 Identification of components of cattle urine attractive to tsetse flies, *Glossina*

355 spp. (Diptera, Glossinidae). *Bull. Entomol. Res.* 78: 281-291.

356 **Byford, R. L., M. E. Craig, and B. L. Crosby. 1992.** A review of ectoparasites and

357 their effect on cattle production. *J. Anim. Sci.* 70: 597-602.

358 **Byford, R. L., M. E. Craig, S. M. DeRouen, M. D. Kimball, D. G. Morrison, W. E.**

359 **Wyatt, and L. D. Foil. 1999.** Influence of permethrin, diazinon and ivermectin

360 treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Int. J.*

361 *Parasit.* 29: 125-135.

362 **Christensen, C. M., and R. C. Dobson. 1979.** Effects of testosterone propionate on the

363 sebaceous glands and subsequent attractiveness of Angus bulls and steers to

364 horn flies [(*Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae))]. *J. Kans. Entomol.* 52:

365 386.

- 366 **De Rouen, S. M., L. D. Foil, A. J. MacKay, D. E. Franke, D. W. Sanson, and W. E.**
- 367 **Wyatt. 2003.** Effect of horn fly (*Haematobia irritans*) control on growth and
- 368 reproduction of beef heifers. *J. Econ. Entomol.* 96: 1612-6.
- 369 **Du, Y.-j., and J. G. Millar. 1999.** Electroantennogram and oviposition bioassay
- 370 responses of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) to
- 371 chemicals in odors from Bermuda grass infusions. *J. Med. Entomol.* 36: 158-
- 372 166.
- 373 **Ernst, C. M., and E. S. Krasfur. 1984.** Horn fly (Diptera: Muscidae): sampling
- 374 considerations of host breed and color. *Environ. Entomol.* 13: 892-894.
- 375 **Gikonyo, N. K., A. Hassanali, P. G. Njagi, P. M. Gitu, and J. O. Midiwo. 2002.**
- 376 Odor composition of preferred (buffalo and ox) and nonpreferred (waterbuck)
- 377 hosts of some Savanna tsetse flies. *J. Chem. Ecol.* 28: 969-81.
- 378 **Guglielmone, A., O. Anziani, A. Mangold, and M. Volpogni. 1998.** Perjuicios
- 379 económicos provocados por la "mosca de los cuernos" (*Haematobia irritans*).
380 INTA EEA Rafaela. Información técnica Nº146.
- 381 **Guglielmone, A. A., E. Curto, O. S. Anziani, and A. J. Mangold. 2000.** Cattle breed-
- 382 variation in infestation by the horn fly *Haematobia irritans*. *Med. Vet. Entomol.*
- 383 14: 272-6.
- 384 **Haas, S., S. Schwab, and M. Geier. 2006.** 2-Undecanon: ein neuartiger Lockstoff für
- 385 anthropophile Stechmücken. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 15: 127-130.
- 386 **Hassanali, A., P. G. Mc Dowell, M. L. A. Owaga, and R. K. Saini. 1986.**
- 387 Identification of tsetse attractants from excretory products of a wild host animal,
- 388 *Synicerus caffer*. *Insect Sci. Applic.* 7: 5-9.

- 389 **Holloway, M. T. P., and R. J. Phelps. 1991.** The responses of *Stomoxys* spp (Diptera,
390 Muscidae) to traps and artificial host odors in the field. Bull. Entomol. Res. 81:
391 51-55.
- 392 **Jensen, K. M., J. B. Jespersen, M. A. Birkett, J. A. Pickett, G. Thomas, L. J.
393 Wadhams, and C. M. Woodcock. 2004.** Variation in the load of the horn fly,
394 *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of
395 individual heifers. Med Vet Entomol 18: 275-80.
- 396 **Koschier, E. H., W. J. De Kogel, and J. H. Visser. 2000.** Assessing the attractiveness
397 of volatile plant compounds to western flower thrips *Frankliniella occidentalis*.
398 J. Chem. Ecol. 26: 2643-2655.
- 399 **Kunz, S. E. 1991.** Dynamics of permethrin resistance in a colony of horn flies (Diptera:
400 Muscidae). J. Med. Entomol. 28: 63-6.
- 401 **Logan, J. G., and M. A. Birkett. 2007.** Semiochemicals for biting fly control: their
402 identification and exploitation. Pest. Manag. Sci. 63: 647-657.
- 403 **Madubunyi, L. C., A. Hassanali, W. Ouma, D. Nyarango, and J. Kabii. 1996.**
404 Chemoecological role of mammalian urine in host location by tsetse, *Glossina*
405 spp. (Diptera: Glossinidae). J. Chem. Ecol. 22: 1187-1199.
- 406 **Mihok, S., E. K. Kangethe, and G. K. Kamau. 1995.** Trials of traps and attractants for
407 *Stomoxys* spp. (Diptera, Muscidae). J. Med. Entomol. 32: 283-289.
- 408 **Muigai, S. G., D. J. Schuster, J. C. Snyder, J. W. Scott, M. J. Bassett, and H. J.
409 McAuslane. 2002.** Mechanisms of resistance in *Lycopersicon* germplasm to the
410 whitefly *Bemisia argentifolii*. Phytoparasitica 30: 347-360.
- 411 **Mullens, B. A., K. S. Lii, Y. Mao, J. A. Meyer, N. G. Peterson, and C. E. Szijj.
412 2006.** Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys*
413 *calcitrans*, in an open field environment. Med Vet Entomol 20: 122-137.

- 414 **Pruett, J. H., C. D. Steelman, J. A. Miller, J. M. Pound, and J. E. George. 2003.**
- 415 Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly
- 416 population. *Vet. Parasitol.* 116: 251-258.
- 417 **Schmidt, C. D., J. M. Dreiss, J. L. Eschle, R. L. Harris, and M. O. Pickens. 1976.**
- 418 Horn fly: modified laboratory rearing methods. *Southwest. Entomol.* 1: 49-51.
- 419 **Schofield, S., and J. Brady. 1997.** Effects of carbon dioxide, acetone and 1-octen-3-ol
- 420 on the flight responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in a wind tunnel.
- 421 *Physiol. Entomol.* 22: 380-386.
- 422 **Skelton, A. C., M. A. Birkett, J. A. Pickett, and M. M. Cameron. 2007.** Olfactory
- 423 responses of medically and economically important mites (Acari:
- 424 Epidermoptidae and Acaridae) to volatile chemicals. *J. Med. Entomol.* 44: 367-
- 425 371.
- 426 **Stear, M. J., M. J. Newman, F. W. Nicholas, S. C. Brown, and R. G. Holroyd. 1984.**
- 427 Tick resistance and the major histocompatibility system. *Aust J Exp Biol Med*
- 428 *Sci* 62: 47.
- 429 **Steelman, C. D., C. J. Brown, R. W. McNew, E. E. Gbur, M. A. Brown, and G.**
- 430 **Tolley. 1996.** The effects of selection for size in cattle on horn fly population
- 431 density. *Med. Vet. Entomol.* 10: 129-36.
- 432 **Steelman, C. D., M. A. Brown, E. E. Gbur, and G. Tolley. 1997.** The effects of hair
- 433 density of beef cattle on *Haematobia irritans* horn fly populations. *Med. Vet.*
- 434 *Entomol.* 11: 257-64.
- 435 **Steelman, C. D., R. W. McNew, R. B. Simpson, R. W. Rorie, J. M. Phillips, and C.**
- 436 **F. Rosenkrans. 2003.** Evaluation of alternative tactics for management of
- 437 insecticide resistant horn flies (Diptera : Muscidae). *J. Econ. Entomol* 96: 892-
- 438 901.

- 439 **Torr, S. J., T. N. C. Mangwiro, and D. R. Hall. 1996.** Responses of *Glossina*
440 *pallidipes* (Diptera: Glossinidae) to synthetic repellents in the field. Bull.
441 Entomol. Res. 86:609–616.

442 **Torr, S.J. and T.N.C Mangwiro. 2000.** Interactions between cattle and biting flies:
443 effects on the feeding rate of tsetse. Med. Vet. Entomol. 14: 400-409.

444 **Torr, S. J., T. N. C. Mangwiro, and D. R. Hall. 2006.** The effects of host physiology
445 on the attraction of tsetse (Diptera: Glossinidae) and *Stomoxys* (Diptera:
446 Muscidae) to cattle. Bull. Entomol. Res. 96: 71-84.

447 **Untalan, P. M., J. H. Pruett, H. N. Atteberry, and C. D. Steelman. 2006.**
448 Thrombostasin isoform frequency in a Central Texas field population of the horn
449 fly, *Haematobia irritans*. Vet. Parasitol.142: 359-366.

450 **Vale, G. A. 1980.** Field studies of the responses of tsetse flies (Glossinidae) and other
451 Diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. Bull. Entomol. Res. 70:
452 563-570.

453 **Velasco, R., J. González, G. Morales, and E. Ortega. 2001.** Daño económico y costos
454 de control en bovinos: mosca de los cuernos. Informativo agropecuario.Bioleche
455 - INIA Quilamapu 14: 4-7.

456 **Warnes, M. L. 1990.** Responses of *Glossina morsitans morsitans* Westwood and *G.*
457 *pallidipes* Austen (Diptera: Glossinidae) to the skin secretions of oxen. Bull.
458 Entomol. Res. 80: 91-97.

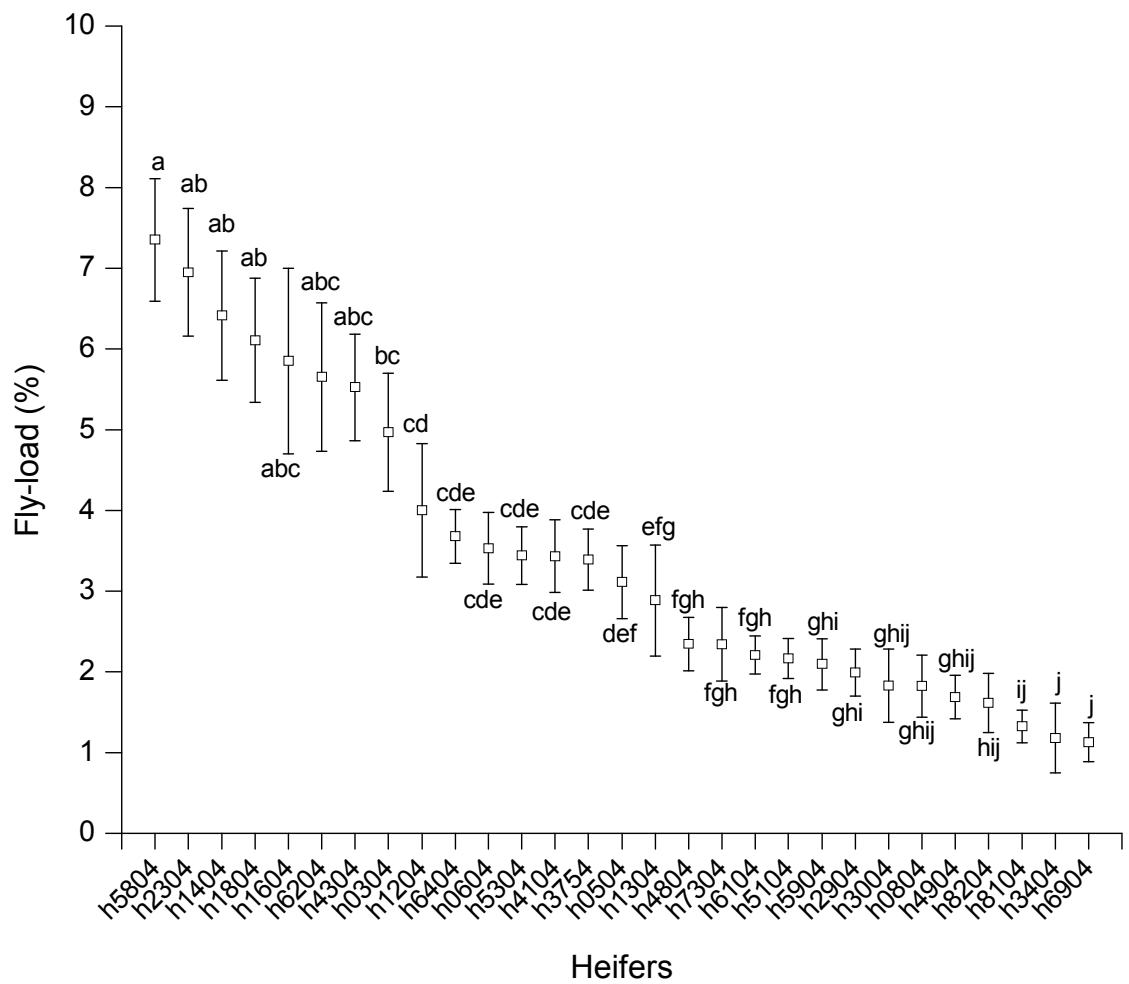
Table 1. List of compounds identified in volatile extracts from a low-carrier (h8104) and a high-carrier (h5804) Holstein Friesian heifer.

Compound	KI	Low carrier (ng uL ⁻¹)	High carrier (ng uL ⁻¹)	High/low
Butanoic acid	789	5.195	78.226	15.1
3-methylbutanoic acid	831	3.148	6.214	2
1-hexanol	861	11.060	6.106	0.6
Pentanoic acid	867	1.472	33.964	23.1
Heptanal	882	5.201	17.150	3.3
2-heptanone	938	0.993	3.788	3.8
Hexanoic acid	962	4.442	17.536	3.9
6-methyl-5-hepten-2-one	965	2.251	1.743	0.8
3-octanone	966	8.669	32.385	3.7
2-octenone	973	0.427	1.837	0.8
<i>m</i> -cresol	1047	2.073	25.953	12.5
<i>p</i> -cresol	1052	335.9	732.4	2.2
2-nonenone	1067	0.214	0.433	2.0
2-decanone	1146	0.067	0.127	1.9
2-undecanone	1278	0.071	0.230	3.2

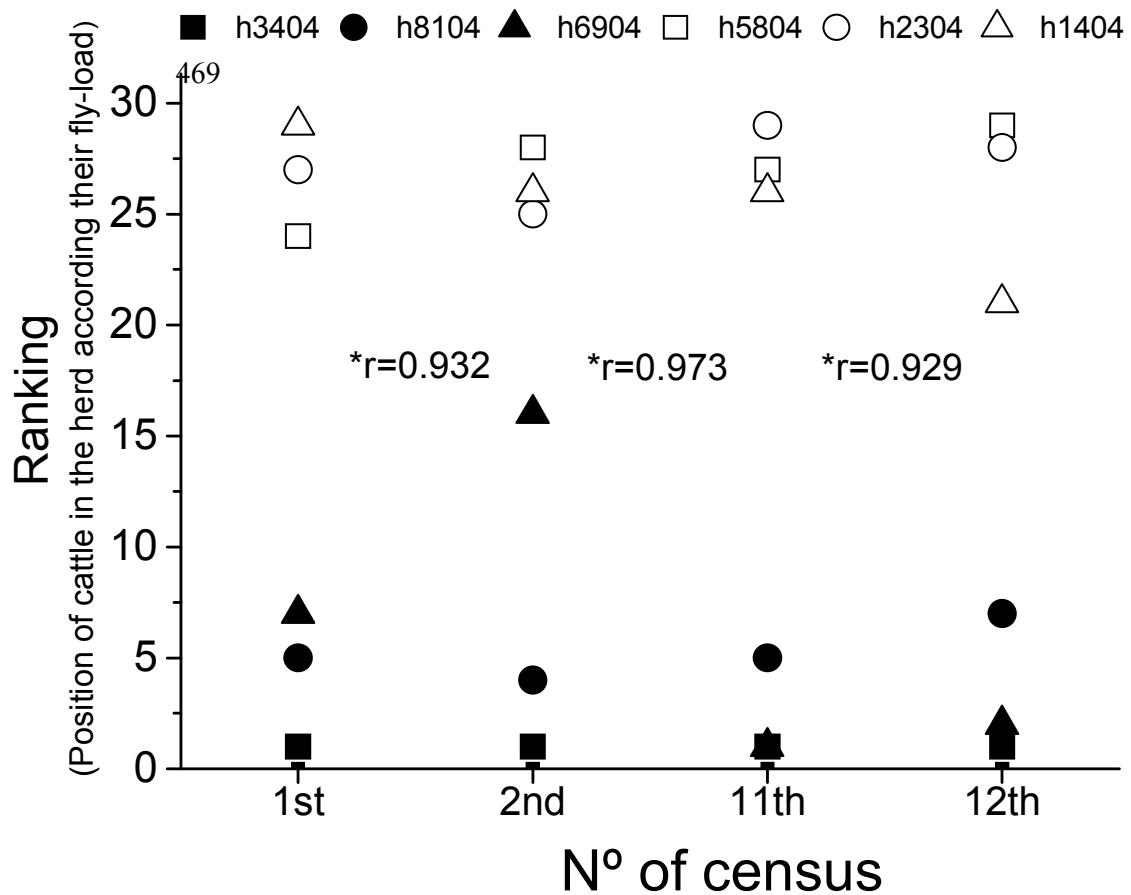
KI: Kovat's indices

High/Low: ratio of compounds in high-carrier (h5804) extract vs. low-carrier (h8104) extract

460 **Fig 1.**

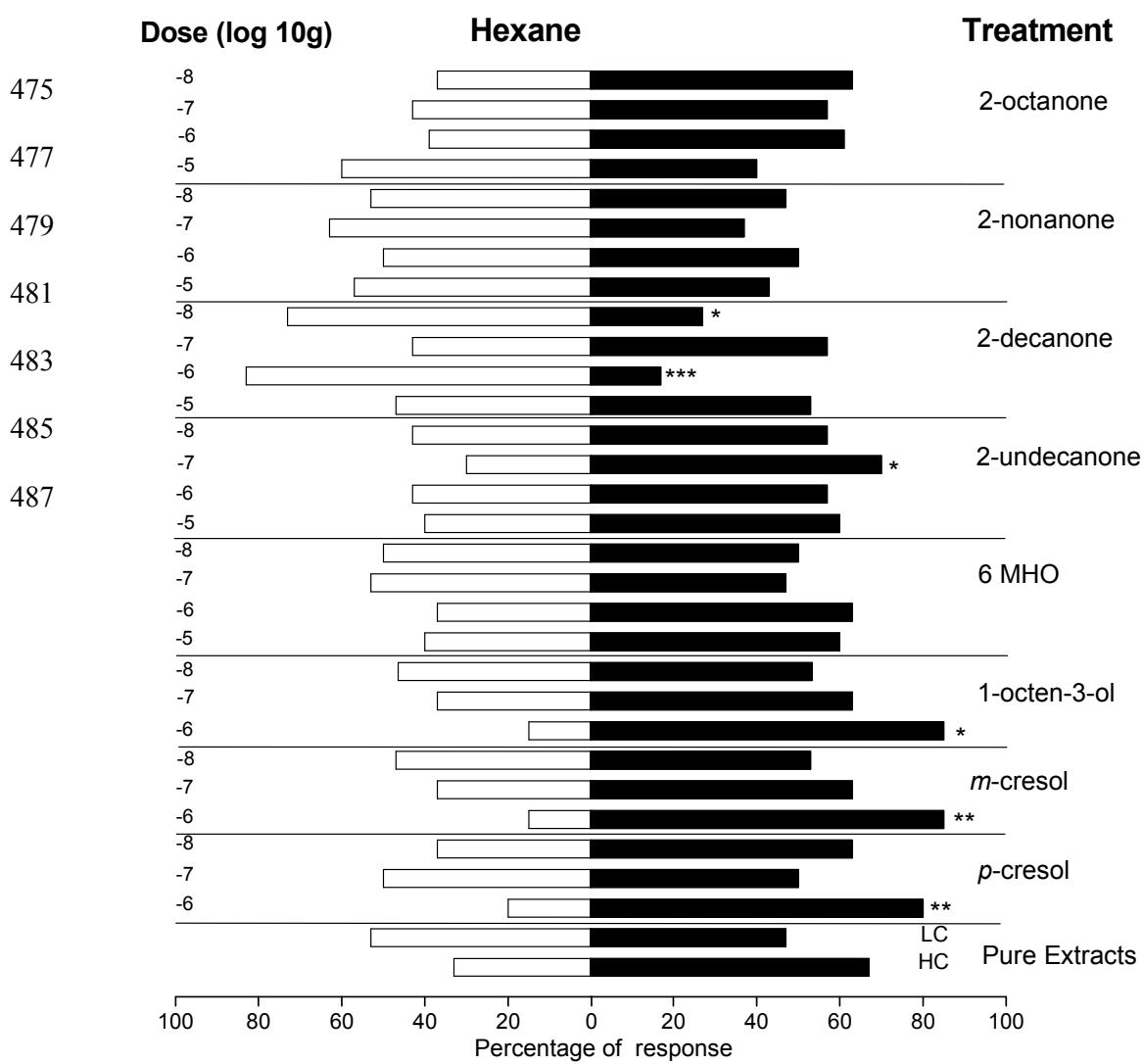


461 Fig 2.
462
463
465



470
472

Fig. 3



488 **Fig. 1** *H. irritans* fly loads of individual Holstein Friesian heifers ($N=29$), expressed in
489 terms of the percentage of the total fly count ($\pm SD$ of mean). Statistical analysis
490 included Kruskal Wallis testing followed by Conover-Inman multiple comparison.
491 Different letters indicate a significant differences between the medians of the rank
492 groups ($P<0.09$).

493

494 **Fig. 2.** Correlation of the fly-load rankings of both the three lowest-carrier heifers
495 (h3404, h8104, 6904) and the three highest-carrier heifers (h1404, h1604, h2304)
496 between 21 November 2005 and 23 November 2005 and between 15 December 2005
497 and 16 December 2005. Statistical analysis was performed via two-sided test of
498 correlations different from zero. *Significant difference ($P<0.05$).

499

500 **Fig. 3.** Response rate (%) of *Haematobia irritans* to the synthetic compounds identified
501 in GC profile of high- and low-carrier heifers odor extracts and 1-octen-3-ol. * $P\leq 0.05$;
502 ** $P\leq 0.005$; *** $P\leq 0.0005$

503

504