

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Análisis de la resistencia a insecticidas piretroides asociada a una
mutación en el gen del canal de sodio sensible a voltaje (*vssc*), en
poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae) en Costa Rica**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biotecnología**

B. Sc. Joyce Estrada Gamboa

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2023**

Este trabajo de graduación fue Aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



Dr. Javier Alvarado Mesén

Representante, Decano, quién preside



M.Sc. Bernal Morera Brenes

Representante de la Dirección de la (ECB)

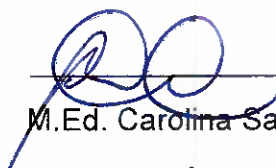


Ph.D. Ruth Castro Vásquez

Tutora

Dra. Stefany Solano González

Asesora



M.Ed. Carolina Sancho Blanco

Asesora

Agradecimiento

Primeramente, agradezco a mi tutora Ruth Castro Vásquez, por sus consejos, enseñanzas, su paciencia y gran apoyo a lo largo de este proyecto. También a mis asesoras Carolina Sancho Blanco y Stefany Solano González por sus recomendaciones y aportes de conocimiento, y por su anuencia a escuchar mis dudas y ayudarme a resolverlas.

A Fabian Castro Vargas y Erick Vargas Carrillo, de la Agencia de Extensión del MAG, en Pital de San Carlos, por su gran apoyo en el muestreo y realización de los bioensayos. Al investigador Arturo Solorzano Arroyo del INTA por sus aportes de conocimiento a la investigación desde su vasta experiencia en esta plaga.

A los profesores Alejandro Vargas de la Escuela de Ciencias Agrarias y Junior Pérez de la Escuela de Ciencias Biológicas por su guía en los análisis de resultados de este trabajo.

A la Dra. Pia Olafson del USDA y al Dr. Phillip E. Kaufman de la Universidad de Texas A&M, por la donación de los cebadores y viales utilizados en el desarrollo de este proyecto, además de su valiosa guía en la investigación.

Al INTA por haberme permitido realizar mi trabajo final de graduación en el marco del proyecto de investigación “Evaluación del desarrollo de resistencia a insecticidas (piretroides) de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans* L.) en condiciones de campo en Costa Rica”, código BO00EE201-4-20, y a la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI) por brindar el financiamiento para la realización del proyecto.

Dedicatoria

“Y todo lo que hagan, sea de palabra o de hecho, háganlo en el nombre del Señor Jesús, dando gracias a Dios el Padre por medio de él” Colosenses 3:17.

A Dios, por guiarme en cada etapa de mi vida y ayudarme a tener la fe y perseverancia necesaria para alcanzar este logro. Por permitirme culminar esta tesis a pesar de la adversidad y las tormentas que abatieron mi mente, corazón y alma. Porque con la culminación de esta tesis nuevos sueños brotan en mí y confío en que me permitirás cumplir los anhelos de mi corazón.

A mi mamá por amarme y sentirse orgullosa de mí. Por ser tan valiente y luchar a pesar de que fue una madre joven, que empezó a soñar a través de mí y por eso me alentó siempre. Te amo inmensamente y deseo que tus sueños se cumplan y yo estaré ahí para apoyarte.

A mis hermanas por inspirarme a ser un ejemplo para ellas. Las amo muchísimo y confío que serán mujeres excepcionales.

A mi abuelito por siempre alentarme a seguir con mis estudios, por las risas que siempre compartimos. A mi abuelita por siempre orar por mí y mis propósitos. Por ser quien sembró en mí la fe y derramar sobre mí el favor de Dios. Los amo, y los llevo siempre en mi corazón.

A mi primita Juli por su cariño incondicional y consejo y a mi ángel por motivarme.

A mis amigos por su apoyo y motivación. A Tefa por siempre estar ahí para mí.

A mi compañero de vida y gran amor Alexander David Marín Obando, mi “mochi”, gracias por ser mi calma en la tormenta y brindarme tu mano para sostenerme aun cuando yo no tenía fuerza, por escucharme siempre y ayudarme a encontrar la respuesta a mis preguntas, por sentirte tan orgulloso de mí y amarme y perdonarme aun siendo tan imperfecta, enserio gracias. Te dedico este logro y una promesa: Amarte, respetarte y honrarte por el resto de mi vida, apoyarte en tus sueños al igual que tú lo haces conmigo, y acompañarte en tu proceso hasta el final, para vivir felices. Anhelo con ansias verte graduado y compartir la alegría que hoy compartes conmigo. En mis anhelos del corazón estás tú, te ama por siempre tu “mocha”, la mujer que está sanando para compartir contigo su mejor versión y construir juntos un AMOR NUEVO.

Con mucho amor, Joy.

Índice

Miembros del tribunal	1
Agradecimiento	2
Dedicatoria	3
Índice	4
Índice de cuadros.....	7
Índice de figuras	8
Índice de anexos	9
Abreviaturas o acrónimos.....	10
Resumen	11
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación	3
1.3. Problema.....	5
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo general	5
1.4.2. Objetivos específicos.....	5
2. Marco Teórico.....	6
2.1. Mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	6
2.1.1. Distribución.....	7
2.1.2. Biología del insecto.....	7
2.1.3. Ciclo de vida.....	8
2.3. Efectos negativos de la mosca	10
2.4. Estrategias de control.....	12
2.4.1. Control biológico.....	12
2.4.2. Control etológico.....	13
2.4.3. Control cultural	13
2.4.4. Control químico.....	14
2.5. Canal de sodio sensible a voltaje y su relación con la resistencia a los piretroides	14

2.5.1.	Función y estructura del canal.....	14
2.5.2.	Sitio diana-acción de los piretroides	16
2.5.3.	Resistencia a los insecticidas piretroides	17
2.5.4.	Gen del canal de sodio sensible a voltaje (<i>vssc</i>) y el alelo <i>kdr-his</i>	17
3.	Marco Metodológico.....	19
3.1.	Sitios de muestreo.....	19
3.2.	Detección del alelo <i>kdr-his</i> en poblaciones en campo de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	20
3.2.1.	Muestreo de adultos en campo	21
3.2.2.	Sexado de individuos	22
3.2.3.	Extracción de ADN	23
3.2.4.	PCR alelo específico	24
3.2.5.	Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas.....	25
3.2.6.	Análisis bioinformático de las secuencias.....	26
3.3.	Bioensayos <i>in vitro</i> de susceptibilidad a permetrina y deltametrina	27
3.3.1.	Muestreo de adultos en campo	27
3.3.2.	Viales de exposición.....	28
3.3.3.	Ejecución de los bioensayos <i>in vitro</i>	29
3.3.4.	Cálculo del grado de susceptibilidad a permetrina y deltametrina.....	32
4.	Resultados	34
4.1.	Frecuencias del alelo mutado <i>kdr-his</i> en poblaciones en campo de <i>Stomoxys calcitrans</i> L. en Costa Rica.....	34
4.2.	Análisis bioinformático de las secuencias	35
4.3.	Susceptibilidad a permetrina y deltametrina en poblaciones de campo de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.....	39
5.	Discusión.....	42
5.1.	Frecuencias de la mutación <i>kdr-his</i> en poblaciones en campo de <i>Stomoxys calcitrans</i> L. en Costa Rica.....	42
5.2.	Análisis bioinformático de las secuencias	44
5.3.	Susceptibilidad a permetrina y deltametrina en poblaciones de campo de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.....	45
6.	Conclusiones	46
7.	Recomendaciones	47

8. Referencias.....47

9. Anexos64

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	6
Cuadro 2. Sitios de muestreo de individuos de la mosca para análisis molecular.....	19
Cuadro 3. Sitios de muestreo de individuos de la mosca para bioensayos <i>in vitro</i>	20
Cuadro 4. Clasificación de individuos como vivos, con ataxia y muertos.	31
Cuadro 5. Grado de susceptibilidad según los porcentajes de mortalidad.....	33
Cuadro 6. Frecuencias de los alelos silvestre y <i>kdr-his</i> en adultos de la mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L. de los distintos sitios.	35

Índice de figuras

Figura 1. Adulto de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.....	6
Figura 2. Estadios de la mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	9
Figura 3. Estados del canal de sodio sensible a voltaje en el potencial de acción	15
Figura 4. Estructura del canal de sodio sensible a voltaje.....	16
Figura 5. Mutaciones asociadas con resistencia a insecticidas piretroides	18
Figura 6. Sitios de muestreo de adultos de la mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L.....	20
Figura 7. Captura en campo de adultos de la mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	22
Figura 8. Sexado de especímenes de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	22
Figura 9. Extracción de ADN a partir de cabezas de <i>Stomoxys calcitrans</i> L.....	23
Figura 10. Captura en campo de adultos de la mosca <i>Stomoxys calcitrans</i> L.	28
Figura 11. Esquema general de la ejecución de los bioensayos <i>in vitro</i>	30
Figura 12. Análisis molecular de las moscas de los bioensayos <i>in vitro</i>	32
Figura 13. Muestras representativas de los genotipos.....	34
Figura 14. Vista del cromatograma de las secuencias parcial <i>forward</i> y consenso de la secuencia código 19-252.....	36
Figura 15. Estructura parcial del gen del canal de sodio en <i>Stomoxys calcitrans</i> L. (<i>vssc</i>).	37
Figura 16. Sitios polimórficos en la región intrónica de la secuencia parcial del gen <i>vssc</i>	38
Figura 17. Topología de posicionamiento taxonómico por máxima verosimilitud (ML).....	39
Figura 18. Porcentajes de mortalidad en adultos de <i>S. calcitrans</i> L.	40
Figura 19. Alelos presentes en moscas sobrevivientes a la dosis 1X de permetrina en los bioensayos del 2020 y 2021.	41

Índice de anexos

Anexo 1. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas de Alajuela.....	64
Anexo 2. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas de Puntarenas.....	65
Anexo 3. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas de Limón.....	66
Anexo 4. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas de Heredia.....	67
Anexo 5. Mortalidad en adultos de <i>S. calcitrans</i> L. expuestos a permetrina.....	68
Anexo 6. Mortalidad en adultos de <i>S. calcitrans</i> L. expuestos a deltametrina.	68
Anexo 7. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas sobrevivientes a la exposición de la dosis 1X de permetrina.	69
Anexo 8. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas no sobrevivientes a la exposición de permetrina.	70
Anexo 9. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado <i>kdr-his</i> (H, histidina) en moscas no sobrevivientes a la exposición de deltametrina.	72

Abreviaturas o acrónimos

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μM	Micro molar
1/s	Hertz
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio, del inglés “Cetyl trimethylammonium bromide”
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético el inglés “ethylenediaminetetraacetic acid”
g	Gravedades
Kb	Kilo bases
kdr	Resistencia al efecto de ataxia, del inglés “knockdown resistance”
<i>kdr</i>	Alelo de resistencia fenilalanina, del inglés “knockdown resistance-phenylalanine”
<i>kdr-his</i>	Alelo de resistencia histidina, del inglés “knockdown resistance-histidine”
Km	Kilómetros
LC ₉₉	Concentración letal a la que el 99% de los individuos de una población control, mueren al ser expuestos a cierto insecticida.
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Número total
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “polymerase chain reaction”
Tris-HCl	Clorhidrato de Tris, del inglés “Tris hydrochloride”
VSSC	Proteína de canal de sodio sensible a voltaje, del inglés “voltage-sensitive sodium channel”
<i>vssc</i>	Gen del canal de sodio sensible a voltaje, del inglés “voltage-sensitive sodium channel”

Resumen

La mosca del establo (*Stomoxys calcitrans* L.) es una plaga de importancia agropecuaria a nivel mundial y Costa Rica no es la excepción. Durante años se han utilizado los insecticidas piretroides para su control, sin embargo, el mal uso de estos químicos ha promovido el desarrollo de resistencia en la mosca. La resistencia a los piretroides se ha relacionado principalmente con cambios genéticos, como mutaciones de resistencia tipo "knockdown". La resistencia representa un desafío significativo en el control de esta mosca, por lo tanto, en este estudio se planteó analizar el estado de la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. del país por medio del estudio del alelo de resistencia *kdr-his* el cual está asociado a la resistencia a insecticidas piretroides en esta mosca. Para lograr esto, se determinó la frecuencia del alelo mutado *kdr-his* y sus distintos genotipos, en poblaciones de la mosca recolectadas en ganaderías aledañas a zonas de cultivos agrícolas y con control químico de la plaga en las localidades de Alajuela (piña), Puntarenas (palma aceitera) y Limón (banano). Además, se analizaron individuos provenientes de una ganadería apartada de campos de cultivos agrícolas en la localidad de Heredia. Asimismo, se evaluó la susceptibilidad a insecticidas piretroides en poblaciones de la mosca de la localidad de Alajuela, mediante bioensayos *in vitro* evaluando permetrina y deltametrina. Los hallazgos revelaron que el alelo mutado *kdr-his* se encontró en todos los sitios investigados, con frecuencias entre 0.35 y 0.51. Este estudio representa el primer informe de la presencia de este alelo de resistencia en poblaciones de moscas de las localidades de Puntarenas, Limón y Heredia. El genotipo más observado fue el heterocigoto, lo cual puede tener implicaciones futuras en términos de resistencia a los insecticidas piretroides en las poblaciones de moscas en nuestro país. La detección de individuos susceptibles en la provincia de Limón y la presencia de la mutación en la población de Heredia sugieren la existencia de un flujo de individuos, lo cual tiene un impacto en el estatus de resistencia de las poblaciones. Además, se concluyó que las poblaciones de moscas analizadas en la localidad de Alajuela no mostraron resistencia al insecticida deltametrina. Sin embargo, se observó una resistencia moderada al insecticida permetrina en estas poblaciones. Es importante destacar que se encontraron individuos homocigotos para el alelo de resistencia entre las moscas que no lograron sobrevivir a la exposición a los insecticidas. Los resultados anteriores ofrecen una visión general del estado de resistencia a los piretroides en las poblaciones de mosca en nuestro país, lo cual proporciona información valiosa para mejorar el control de esta plaga.

1. Introducción

La inadecuada gestión de los residuos orgánicos derivados de las actividades agropecuarias ha fomentado la proliferación de diversas plagas asociadas, como es el caso de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* L., la cual es una plaga de importancia agropecuaria a nivel mundial al ser una mosca hematófaga que se alimenta de la sangre del ganado (Olafson *et al.*, 2019).

En Costa Rica, la presencia de esta mosca ha experimentado un aumento en sus poblaciones, lo que ha ocasionado que cada vez más regiones del país se vean afectadas (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria [SEPSA], 2019; Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2010; Solórzano *et al.*, 2016). Históricamente, para controlar esta plaga, se ha recurrido al uso de insecticidas, entre ellos los insecticidas piretroides. Sin embargo, el uso inadecuado de estos productos químicos ha contribuido al desarrollo de resistencia en esta mosca (Pitzer *et al.*, 2010).

Comúnmente, la resistencia a estos insecticidas está asociada con alteraciones genéticas en el canal de sodio sensible a voltaje, el cual es el sitio diana-activo de estos insecticidas. Entre las alteraciones que modifican la estructura del canal se encuentran las mutaciones de tipo "knockdown resistance" (Scott, 2019), las cuales, debido a su estrecha relación con la resistencia han sido ampliamente utilizadas como marcadores moleculares para investigar la resistencia en esta y otras plagas (Olafson *et al.*, 2011; Scott, 2019).

Actualmente Costa Rica no dispone de un protocolo para evaluar la resistencia a insecticidas piretroides en la mosca del establo. Por lo tanto, resulta de gran interés implementar un protocolo que permita detectar de manera temprana la resistencia y continuar monitoreando los sectores con resistencia confirmada. Esto desempeñaría un papel fundamental en mejorar el control de la plaga.

1.1. Antecedentes

La mosca *Stomoxys calcitrans* L. también conocida como mosca del establo, es una plaga de importancia agropecuaria a nivel mundial y Costa Rica no es la excepción (MAG, 2010; Solórzano y Taylor 2015, Solórzano *et al.*, 2015, Solórzano *et al.*, 2016). Durante años el control de esta plaga ha sido por medio de insecticidas, sin embargo, la exposición continua a estas sustancias ha promovido el desarrollo de resistencia en estos insectos (Pitzer *et al.*, 2010). Esta resistencia muchas veces se ha visto asociada con alteraciones genéticas que provocan cambios conformacionales en el sitio diana-activo del insecticida, lo que dificulta la unión de la molécula y por lo tanto anula el efecto tóxico sobre el insecto (Dong *et al.*, 2014).

Entre los insecticidas más utilizados en el control de esta plaga se encuentran los piretroides, los cuales surten su efecto tóxico al interactuar con uno de los dos receptores para piretroides con los que cuenta el canal de sodio sensible a voltaje de células nerviosas. El receptor PyR2 (PyR, por sus siglas en inglés) específicamente, está conformado por residuos en los segmentos cuatro, cinco y seis del primer dominio, y residuos del segmento seis del segundo dominio (Du *et al.*, 2016), por lo que alteraciones en estas regiones afectan directamente la unión del insecticida al canal. Entre las mutaciones más comunes se encuentra la sustitución del aminoácido leucina (L) en la posición 1014 de la proteína, punto que coincide con el receptor para piretroides PyR2 (Dong, 2007; Du *et al.*, 2015; Yellapu *et al.*, 2017).

El primer alelo de resistencia se identificó en la mosca doméstica (*Musca domestica* L.) (Williamson *et al.*, 1996) y resulta en la sustitución del aminoácido leucina (L) por el aminoácido fenilalanina (F) en la posición 1014 proteína del canal, a este cambio se le denominó como “knockdown resistance” (*kdr*, por sus siglas en inglés), ya que les confiere a los insectos resistencia al efecto tóxico conocido como “knockdown” (ataxia o parálisis).

Esta mutación ha sido identificada en múltiples insectos, por ejemplo, en la mosca del cuerno *Haematobia irritans*, en el pulgón del melón *Aphis gossypii* y en minadores como *Tuta absoluta* (Guerrero *et al.*, 1997; Haddi *et al.*, 2012; Suann *et al.*, 2015; Holderman *et al.*, 2018) cuyo control es mediante el uso de insecticidas tipo piretroides. También han sido reportados otros

alelos en esta posición, como por ejemplo el alelo *kdr-his* el cual consiste en la sustitución del aminoácido leucina (L) por el aminoácido histidina (H), y que ha sido identificado en la mosca doméstica *Musca domestica* L., plagas agrícolas como el gusano del maíz *Helicoverpa zea*, y plagas agropecuarias como *Stomoxys calcitrans* L., entre otros (Hopkins y Pietrantonio, 2010; Olafson, Pitzer y Kaufman, 2011; Roca-Acevedo, Boscaro y Toloza, 2022).

Los primeros reportes de resistencia a piretroides en la mosca *Stomoxys calcitrans* L. indicaban niveles nulos o relativamente bajos de resistencia (Cilek y Greene, 1994; Marcon *et al.*, 1997; Cruz-Vázquez *et al.*, 2005; Pitzer *et al.*, 2010), no obstante, en investigaciones posteriores, ya se reporta la resistencia a permetrina y deltametrina tanto en campo como en laboratorio (Salem *et al.*, 2012; Tainchum *et al.*, 2018; Reissert-Oppermann *et al.*, 2019).

En el año 2018, se llevó a cabo en Costa Rica la reunión anual de expertos en la mosca del establo, evento donde se constató la necesidad de examinar el estado de resistencia de la mosca, por lo que se propuso estudiar la frecuencia de mutaciones del tipo “knockdown resistance” en las poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L. del país; además, se destacó la necesidad de desarrollar un programa de investigación exhaustivo sobre temas como la biología del desarrollo del insecto, la dispersión de los adultos, el comportamiento alimentario, la toxicología y la resistencia a los insecticidas, el control biológico, el control etológico, los repelentes y los atrayentes, las interacciones hospedero-parásito, el bienestar de los animales y las repercusiones económicas en la producción de la mosca del establo (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria [INTA] y Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], 2018). Debido a lo anterior en el INTA surge el proyecto en el que se desarrolla la presente investigación denominado “Evaluación del desarrollo de resistencia a insecticidas (piretroides) de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans* L.) en condiciones de campo en Costa Rica”.

1.2. Justificación

La mosca *Stomoxys calcitrans* L. se ha asociado históricamente a los desechos de la producción pecuaria, como el estiércol animal, sin embargo, se ha visto que los estadios inmaduros

son capaces de desarrollarse con éxito en materia orgánica en descomposición, como los rastrojos de cultivos (Cook *et al.*, 2018; Meyer y Petersen, 1983) como la piña, palma aceitera, banano, entre otros. El incremento de las áreas de siembra de estos cultivos ha impulsado el problema de la proliferación de la mosca del establo (SEPSA, 2017; Grisi *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2012).

En Costa Rica, la situación con respecto a esta plaga se ve agravada debido a la proximidad entre las explotaciones ganaderas y las áreas de producción agrícola. Asimismo, el mal manejo de los residuos agropecuarios ha contribuido a una proliferación de la mosca del establo, con valores de hasta diez veces superiores a los informados en la literatura. Esto ha llevado a infestaciones masivas de hasta un promedio de 700 moscas por animal, lo cual supera entre 30 y 50 veces el umbral para una afectación económica en la producción pecuaria (INTA, 2015; Solórzano *et al.*, 2015; Campbell *et al.* 1987), lo que subraya la necesidad prioritaria de controlar esta plaga.

Los insecticidas han sido ampliamente utilizados en el combate de esta plaga, sin embargo, esta medida ha ejercido presión selectiva sobre las poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L., impulsando la multiplicación de individuos con características genéticas de resistencia (mutaciones de tipo *kdr*) y por consiguiente provocando la disminución de los individuos susceptibles. En el caso de *Stomoxys calcitrans* L., existe la posibilidad de utilizar las mutaciones de tipo “knockdown resistance” como marcadores moleculares en el estudio de la resistencia a insecticidas, permitiendo detectar el problema de manera temprana y precisa, y con esto poder aplicar estrategias de prevención de resistencia en nuevas poblaciones de la mosca y el manejo de la resistencia ya existente en otras poblaciones (Sangster, 2001).

Debido al impacto que tiene la mosca del establo en los sistemas agropecuarios, resulta de gran importancia implementar el monitoreo de la resistencia en este insecto. Por ello, que en el presente trabajo se propuso evaluar la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L. del país, mediante el análisis de la frecuencia del alelo de resistencia *kdr-his* y bioensayos *in vitro* de la susceptibilidad a insecticidas piretroides, contribuyendo con información para una posible mejora en el manejo de la plaga en el país.

1.3. Problema

Existe un vacío en el estudio de la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de mosca del establo en el país. Por esta razón, surge la siguiente interrogante: ¿Cuál es la frecuencia del alelo *kdr-his* en poblaciones de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. en Costa Rica, y cuál es el grado de resistencia a los insecticidas piretroides permetrina y deltametrina?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Analizar la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L., mediante análisis moleculares de la frecuencia alélica y genotípica de la mutación *kdr-his* en el gen del canal de sodio sensible a voltaje (*vssc*) y bioensayos *in vitro* de la susceptibilidad a permetrina y deltametrina, contribuyendo con información para una posible mejora en el manejo de la plaga.

1.4.2. Objetivos específicos

- Estimar la frecuencia alélica y genotípica de la mutación *kdr-his* en el gen del canal de sodio sensible a voltaje mediante PCR alelo-específico, en adultos de poblaciones silvestres de *Stomoxys calcitrans* L., provenientes de distintas localidades del país.

- Evaluar por medio de bioensayos *in vitro*, el grado de susceptibilidad a permetrina y deltametrina en adultos de poblaciones silvestres de *Stomoxys calcitrans* L., provenientes de la localidad de San Carlos.

2. Marco Teórico

2.1. Mosca *Stomoxys calcitrans* L.

Stomoxys calcitrans (Linnaeus, 1758), es un díptero hematófago conocido como la mosca del establo ya que comúnmente se le encuentra en estos sitios parasitando al ganado (Figura 1). En el Cuadro 1 se detalla su clasificación taxonómica.



Figura 1. Adulto de *Stomoxys calcitrans* L. (A Stable Fly in Montgomery Co., Maryland), por Steve Scholnick, 2016, Maryland Biodiversity Project (<https://www.marylandbiodiversity.com/record/367916>).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Stomoxys calcitrans* L. (NCBI:txid35570) (Schoch *et al.*, 2020).

Filo	Arthropoda
Subfilo	Hexápoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Brachycera
Familia	Muscidae
Género	<i>Stomoxys</i>
Especie	<i>Stomoxys calcitrans</i>

2.1.1. Distribución

El género *Stomoxys* cuenta con alrededor de 18 especies (Zumt, 1973). De éstas únicamente *Stomoxys calcitrans* L. presenta una distribución cosmopolita, ya que logra adaptarse a gran variedad de hábitats, excepto a las regiones polares (Bishopp, 1913; Brues, 1913). Además, es una mosca sinantrópica, es decir, que explotan hábitats y fuentes de alimento creados por actividades humanas como la actividad agropecuaria (Kaufman y Weeks, 2016).

El primer reporte de *Stomoxys calcitrans* L. en Costa Rica se dio en Buenos Aires de Puntarenas en el año 1987 (Herrero-Acosta *et al.*, 1991). Actualmente la mosca se distribuye en el país principalmente en zonas con áreas de producción pecuaria, y se agudiza en zonas con mal manejo de los desechos orgánicos como las excretas de los animales, rastros de cosechas y desechos agroindustriales (MAG, 2010).

Según el informe de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA, 2017), las poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L. han aumentado significativamente en los últimos años, asociado con el aumento de las áreas de siembra de cultivos extensivos como la palma aceitera, banano, cítricos, café, arroz y principalmente en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica del país con el cultivo de piña (MAG, INTA y USDA, 2018; SEPSA, 2017).

2.1.2. Biología del insecto

Stomoxys calcitrans L. es un insecto hematófago (que se alimentan de sangre), ectoparásito de grandes ungulados como el ganado bovino y caprino, aunque también puede tener como hospedadores ovejas y burros; incluso cuando hay escasez de alimento, estos insectos pueden parasitar animales domésticos como gatos, perros, cerdos e incluso al humano (Bishopp, 1913; Kaufman y Weeks, 2016; MAG, 2010).

A diferencia del resto de moscas chupadoras de sangre, en la especie *Stomoxys calcitrans* L. tanto machos y hembras se alimentan de sangre para completar su maduración sexual (Bishopp, 1913; Kaufman y Weeks, 2016). Las hembras requieren alimentarse para poder llevar a cabo la

oviposición, ya que de la sangre obtienen proteínas para la producción de huevos fértiles (Kaufman y Weeks, 2016; Foil y Hogsette, 1994). En adultos, también se ha observado que se alimentan de frutas maduras y de la secreción de los nectarios de *Amarantus spinosus*, *Cassia tora*, *Justicia comata*, *Pueraria phaseoloides*, *Scleria melaleuca* y otras plantas, para obtener aminoácidos esenciales que no están en la sangre (MAG, 2010; Müller *et al.*, 2012).

Los ciclos de actividad de estas moscas son durante el día, principalmente durante la mañana y la tarde, cuando las temperaturas son frescas (Kaufman y Weeks, 2016; Masmethathip *et al.*, 2006a; Ramírez *et al.*, 2016). Durante los picos de temperatura, la actividad de adultos disminuye como mecanismo de termorregulación o para realizar la cópula (Buschman y Patterson, 1981). Bajo condiciones lluviosas, la actividad de la mosca tiende a disminuir con respecto a días cálidos y húmedos (Ramírez *et al.*, 2016).

Por lo general, los adultos de esta mosca se encuentran en los establos y sus alrededores (Kaufman y Weeks, 2016), sin embargo, existen reportes que indican puede desplazarse hasta 25 km mediante el vuelo y migrar hasta 225 km desde su origen a través del viento (Hogsette y Ruff, 1985). También puede ser diseminada de un sitio a otro durante el transporte de animales portadores de la plaga y por medio del traslado de abono orgánico contaminado con los estadios inmaduros de la mosca (MAG, 2010).

Esta plaga logra adaptarse a diferentes hábitats, si las condiciones son favorables. De forma esencial requiere la presencia de animales para alimentarse y nichos de reproducción aptos para cumplir su ciclo de vida, como residuos de cultivos en descomposición y estiércol animal (MAG, 2010; Meyer y Petersen, 1983).

2.1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. en condiciones tropicales con altas temperaturas y humedad relativa se acorta significativamente, oscilando entre los 15 y 27 días (Vargas-Chacón y Solórzano, 2015). Esta mosca pasa por cuatro estadios desde la etapa de huevo hasta adulto (Figura 2).

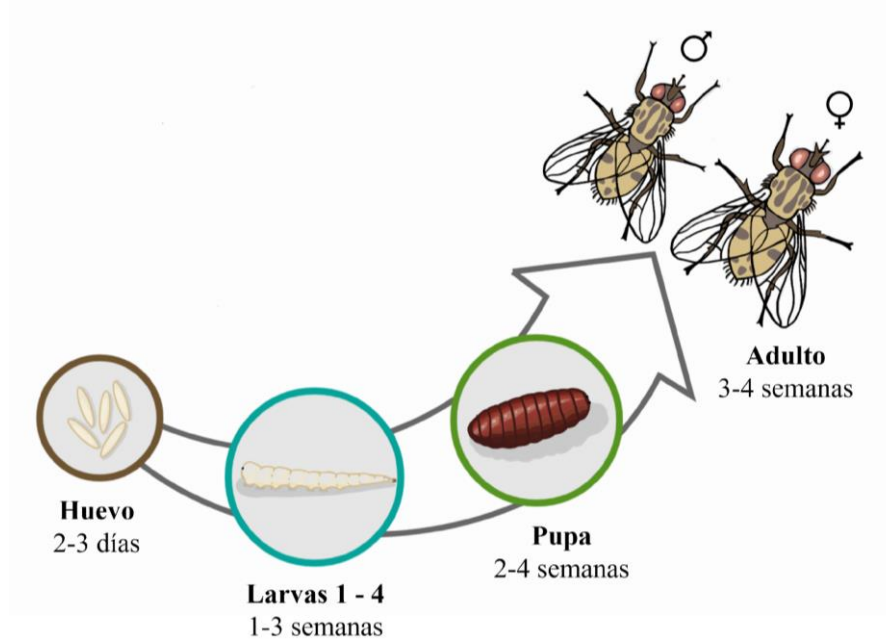


Figura 2. Estadios de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. (Marín y Estrada, 2023).

2.1.3.1. Huevo

Los huevos son de color blanco cremoso, pequeños, miden alrededor de 1 milímetro de largo y tienen forma elíptica (Bishopp, 1920). La hembra durante su tiempo de vida llega a producir aproximadamente 800 huevos (Mitzmain, 1913; Kaufman y Weeks, 2016), de los cuales logra ovipositar entre 300-400 huevos (Parr, 1962; Kaufman y Weeks, 2016). Duran en promedio entre 1 a 3 días después de la postura para eclosionar (James, 1947). Este estadio dura de uno a cuatro días (Bishopp, 1913; INTA, 2011).

2.1.3.2. Larva

Las etapas larvales se desarrollan en materia orgánica en descomposición, húmeda y fermentada, en total son cuatro estadios larvales (Cook *et al.*, 2018; Meyer y Petersen, 1983). Inicialmente, la larva es translúcida debido al poco desarrollo de sus tejidos y estructuras. Cuando completa su desarrollo es de color blanco cremoso y llegan a medir cerca de 15 mm de longitud. El periodo larval puede durar 11 días (Bishopp, 1913; INTA, 2011).

2.1.3.3. Pupa

La pupa de la mosca del establo es inmóvil, mide entre 5 y 7 mm de longitud y 3-4 mm de ancho; es alargada y ovoide, ligeramente más ancha hacia la cabeza (Bishopp, 1920). Durante los primeros días presentan una coloración café claro y luego se torna a café oscuro (Todd, 1964). La etapa de pupa puede durar 6 días (Bishopp, 1913; INTA, 2011).

2.1.3.4. Adulto

La hembra mide cerca de 7 mm de longitud y usualmente el macho es ligeramente más pequeño (Bishopp, 1920). El adulto es de color gris, el tórax tiene cuatro franjas oscuras longitudinales y el abdomen presenta un patrón de manchas oscuras redondeadas en forma de tablero (Zumpt, 1973; INTA, 2011). Su aparato bucal es una probóscide picadora adaptada para perforar la piel de su hospedador y succionar la sangre; es larga, fuerte, de color negro y se proyecta hacia delante de la cabeza (Todd, 1964). La longevidad de los adultos es de 10 días, sin embargo, hay reportes de que pueden alcanzar hasta 100 días con vida (Bishopp, 1913; Monge y Bonilla, 2006).

2.3. Efectos negativos de la mosca

La mosca *Stomoxys calcitrans* L. es considerada una plaga agropecuaria que causa grandes pérdidas económicas en Costa Rica y a nivel mundial, debido a su naturaleza ectoparásita. Esta mosca a través de su constante picadura causa la disminución en la productividad del ganado y además actúa como vector de enfermedades (Baldacchino *et al.*, 2013; Bishopp, 1913; Foil *et al.*, 1983; Zumpt, 1973).

En Costa Rica esta plaga se ha incrementado significativamente, y se estima que un total de 25 insectos al día que parasiten a un bovino pueden provocar una pérdida de peso cercana a 1

kg diario; reduciendo la ganancia de masa corporal y en bovinos lecheros se reduce en hasta un 50 % la productividad (MAG, 2010).

El ataque de la mosca en el ganado puede provocar sintomatologías como cambios en el comportamiento y en última instancia problemas físicos (MAG, 2010). Se ha visto que los animales en su desesperación por escapar del ataque de los insectos llegan a formar paseaderos en los potreros, se vuelven agresivos e incluso en el estrés tienden a romper cercas de alambre, lo que los hace propensos a sufrir accidentes, algunos incluso se desplazan por despeñaderos o se sumergen en cuerpos de agua dejando expuesta únicamente la cabeza (Bishopp, 1913). Por otra parte, la irritabilidad en los animales hace que su apetito disminuya considerablemente y por consecuencia tienden a sufrir abortos (MAG, 2010).

Por otro lado, la naturaleza hematófaga de esta mosca, la convierte es un vector potencial de patógenos como virus, bacterias, protozoos y helmintos, que pueden causar enfermedades zoonóticas transmitidas por la sangre no solo en ganado, sino en otros animales, incluido el ser humano (Baldacchino *et al.*, 2013; Bishopp, 1913).

Se reporta que virus causantes de la anemia infecciosa equina, la peste porcina africana, el virus del Nilo occidental y el virus del Valle del Rift son transmitidos por esta mosca, también puede transmitir enfermedades bacterianas como anaplasmosis causada por bacterias del género *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Coxiella* y Ántrax (*Bacillus anthracis*) (Foil *et al.*, 1983; Spickler, 2009; Mellor *et al.*, 1987; Olesen *et al.*, 2018; Doyle *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2010; Hoch *et al.*, 1985; Turell *et al.*, 2010; Turell y Knudson, 1987; Nelder *et al.*, 2008; Bautista-Garfias, 2018).

Además, parásitos como *Trypanosoma spp.* y *Besnoitia spp.*, helmintos como *Habronema microstoma* y especies de nemátodos como *Onchocerca* y *Dirofilaria* pueden ser transmitidos por esta mosca (Baldacchino *et al.*, 2013; Bishopp, 1913; Sharif *et al.*, 2019; Traversa *et al.*, 2008; Yarmut *et al.*, 2008; Oğuz *et al.*, 2016). Al ser cosmopolita, *Stomoxys calcitrans* L. podría tener un impacto mundial en la transmisión de patógenos humanos y animales (Baldacchino *et al.*, 2013).

Por último, otro impacto negativo de la mosca se debe a la gran inversión económica que deben hacer los productores agropecuarios en la compra de insecticidas para el control de esta plaga (Bernal *et al.*, 2005); en Estados Unidos se estiman pérdidas en la ganadería de hasta \$ 2.2 mil millones por causa de esta plaga (Kaufman y Weeks, 2016).

2.4. Estrategias de control

El control de *Stomoxys calcitrans* L. es crítico ya que esta plaga puede ocasionar efectos negativos importantes sobre la ganadería y la agricultura de manera directa e indirecta. En general, el manejo de esta mosca se basa en el control biológico, cultural, etológico y el control químico principalmente.

2.4.1. Control biológico

Consiste en combatir la plaga utilizando sus enemigos naturales, ya sean patógenos, depredadores y/o parásitos. Es de las prácticas agroecológicas más importantes para el control de esta y otras plagas, ya que es un método completamente natural, selectivo y específico, no afecta la microfauna benéfica, ni presenta problemas de sobredosis y muy importante, no genera resistencia (MAG, 2010; Ruíz-Cancino y Coronado-Blanco, 1999).

Para el control de *Stomoxys calcitrans* L., son utilizados los parasitoides pupales que interrumpen el ciclo de vida de la mosca. Los parasitoides de moscas comúnmente asociados a los sistemas de producción ganadera son los microhimenópteros; lo que hacen estas avispas es depositar sus huevos en el interior de los puparios de la mosca; y posteriormente las larvas del parasitoide se alimentan de la pupa para completar su propio desarrollo, para después emerger destruyendo la pupa de la mosca (Bedoya, 2007; Bishopp, 1920; Pinkus, 1913). Algunos géneros de parasitoides utilizados en Costa Rica para el control de esta mosca son *Spalangia*, *Muscidifurax* y *Pachycrepoideus* (MAG, 2010; Solórzano *et al.*, 2013).

Por otro lado, también se han utilizado hongos para el control de adultos como *Entomophthora muscae*, *E. schizophorae*, *Verticillium lecanii*, *B. bassiana* y *M. anisopliae*, estos

dos últimos también con cierta eficacia en el control de los estadios inmaduros de las moscas (Skovgård y Steenberg, 2002; Watson *et al.*, 1995; De Velasco-Reyes *et al.*, 2019; López-Sánchez *et al.*, 2012; Bernal *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2010, Moraes *et al.*, 2008).

2.4.2. Control etológico

Esté método de control consiste en utilizar trampas para la captura de los adultos de la mosca y con esto reducir la oviposición. Una de las trampas más comúnmente utilizadas son las bolsas blancas con adhesivo colocadas en la periferia de las zonas afectadas. Las moscas son visualmente atraídas hacia las bolsas blancas y mueren en ellas. Sin embargo, este tipo de trampa tiene múltiples problemas asociados como la enorme cantidad de basura generada por las bolsas, la frecuencia de cambio (se cambian cada 3 días) y el elevado costo asociado en materiales (bolsas, adhesivo, mano de obra) (ChemTica, 2019). Es por esto por lo que se han desarrollado trampas de tela como las de tipo Vavoua, las cuales utilizándose con atrayentes de la mosca han probado ser muy eficientes y rentables en el control, aumentando la eficiencia de captura en condiciones de alta incidencia de la mosca en hasta 17,6 veces más respecto a la captura obtenida con trampas de bolsas blancas (INTA y ChemTica, 2019). El método de captura de la mosca con bolsas blancas requiere más de 175 bolsas por hectárea por mes, en comparación con las trampas Vavoua que tan sólo requiere 5 trampas por hectárea con una vida útil de hasta 24 meses. Además, el costo mensual del control de esta plaga con trampas Vavoua y atrayentes es de aproximadamente US\$11,5 por hectárea, mientras que las trampas de bolsas blancas el costo mensual por hectárea es aproximadamente US\$332,5.

2.4.3. Control cultural

La estrategia de control cultural es de las más efectivas en la reducción de las poblaciones de la mosca. Básicamente consisten en el manejo adecuado de los residuos derivados de las cosechas y del estiércol animal, con el fin de reducir el sustrato disponible para la oviposición y el desarrollo de las larvas de la mosca (Greene, 1993). Involucra metodologías convencionales, como el triturado y rastreo del material vegetal para su reincorporación al suelo, la aplicación de desecantes como herbicidas para reducir la humedad del sustrato y evitar la atracción de la mosca,

además de cubrir con lonas los residuos para aumentar la temperatura e inducir la muerte de las larvas por calor (Eddy, 1952; Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2012; Hogsette *et al.*, 1987).

2.4.4. Control químico

Esta es una de las estrategias más utilizadas en el control de la mosca. A pesar de que se recomienda el uso de insecticidas del grupo benzilurea que regulan el crecimiento de los estadios de huevo y larva, mediante la inhibición de la formación de quitina, presentando alta eficacia biológica, es común el uso intensivo de insecticidas de contacto como los piretroides, los cuales aumentan el riesgo de aparición de insectos resistentes y la disminución en la eficiencia del control de la plaga (Solórzano *et al.*, 2013; Salas y Larraín, 2008). Algunos insecticidas piretroides utilizados para el control de la mosca del establo son la permetrina y la deltametrina (Tainchum *et al.*, 2018; Pitzer *et al.*, 2010; WHO, 2017; Schleier y Peterson, 2011).

2.5. Canal de sodio sensible a voltaje y su relación con la resistencia a los piretroides

2.5.1. Función y estructura del canal

Los canales de sodio son esenciales para la señalización celular, estos modulan los potenciales de acción en la sinapsis celular. Los canales tienen cuatro estados mediante los cuales controlan el potencial de acción (Figura 3). El primero es el estado cerrado en el cual no permite el paso de iones por la membrana, luego por un estímulo el canal se activa y pasa a su estado abierto permitiendo el paso de iones al interior de la membrana lo que causa la despolarización de la célula, luego de unos milisegundos el canal pasa a su estado inactivo y causa la repolarización de la membrana, fundamental para la terminación del potencial de acción. Para finalizar, los canales de sodio pasan a su estado desactivado dándose la hiperpolarización, y, por último, el canal vuelve a su estado cerrado, listo para el inicio de un nuevo potencial de acción (Dong, 2014).

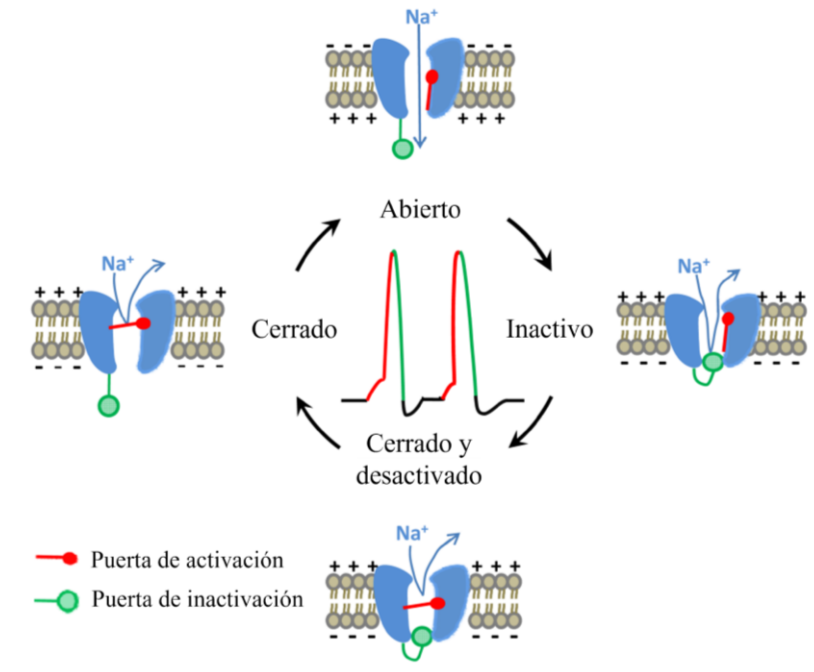


Figura 3. Estados del canal de sodio sensible a voltaje en el potencial de acción (Adaptado de Dong, 2014).

La proteína del canal de sodio es compleja; está formada por una subunidad alfa, la cual es un gran polipéptido que se pliega en la membrana nerviosa para formar el poro del canal (Figura 4A). La subunidad se compone de cuatro dominios repetitivos (I-IV), cada uno conformado por seis segmentos (S1-S6) transmembrana que forman el poro selectivo de sodio (Figura 4B y 4C) (Dong, 2014).

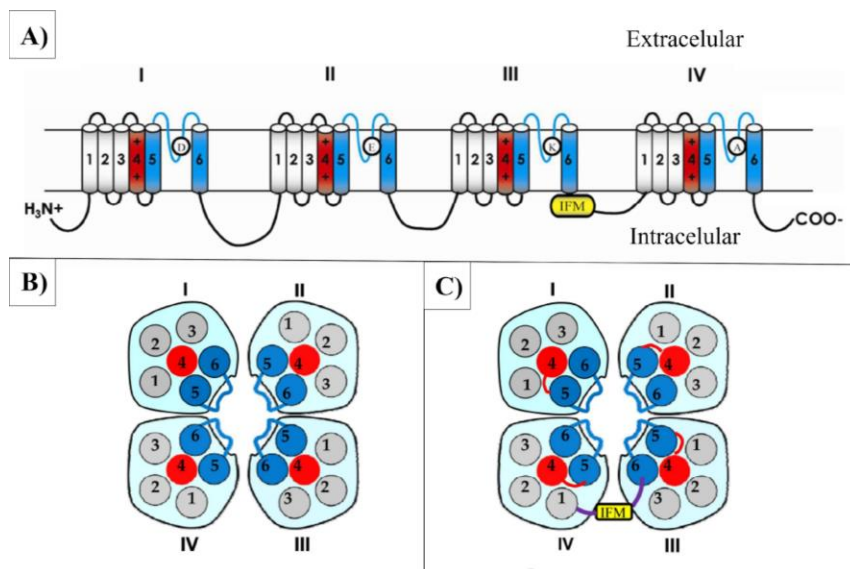


Figura 4. Estructura del canal de sodio sensible a voltaje. A) Dominios (I-IV) y segmentos (1-6) que conforman al canal, B) Vista extracelular del canal. C) Vista intracelular del canal (Adaptado de Dong, 2014).

2.5.2. Sitio diana-acción de los piretroides

Debido a su papel fundamental en la señalización celular, los canales de sodio son objetivos de una gran variedad de compuestos neurotóxicos, entre estos los insecticidas piretroides, los cuales están entre los primeros compuestos sintéticos identificados con capacidad de actuar sobre los canales de sodio (Catterall, 2000; Catterall *et al.*, 2007; Narahashi, 1996, 2000, 2002).

Los piretroides son una clase de insecticidas sintéticos, análogos a las piretrinas naturales extraídas de las flores de *Chrysanthemum* (Burton *et al.*, 2011; Elliott, 1977). Estos compuestos son capaces de unirse a los receptores en el canal de sodio y alterar varias de las propiedades del canal, como la conductancia de los iones, la selectividad de los iones y/o el cierre y apertura del canal (Dong, 2014).

Los piretroides al interactuar con el canal de sodio inhiben el proceso de inactivación y desactivación, y favorece la activación prolongada del canal lo que altera la función nerviosa (Dong, 2014). A nivel celular, esto causa descargas repetitivas, despolarización excesiva de la

membrana y alteraciones sinápticas en los insectos (Narahashi, 1996, 2000; Silver *et al.*, 2014; Soderlund, 2012). A nivel macro causan inquietud, descoordinación e hiperexcitabilidad seguido de ataxia o parálisis en el insecto, conocido como el efecto tóxico “knockdown” (Davies *et al.*, 2007; Soderlund, 2012; Chrustek *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2016, Wickham, Chadwick y Stewart, 1974).

2.5.3. Resistencia a los insecticidas piretroides

Los piretroides han sido ampliamente utilizados en el control de plagas y vectores de enfermedades, debido a su potente capacidad insecticida y su relativamente baja toxicidad en mamíferos, sin embargo, su uso intensivo ha provocado el desarrollo de resistencia en muchas poblaciones de plagas (Dong *et al.*, 2014; Elliott, 1977).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1957), la resistencia se define como la habilidad de ciertos individuos para tolerar dosis de sustancias tóxicas que por lo general causarían la muerte de la mayoría de los individuos sensibles de la misma especie.

La resistencia tiene una base genética, relacionada con mutaciones que ocurren naturalmente en individuos de una población plaga. La exposición continua a los insecticidas ejerce una presión selectiva donde los individuos resistentes se reproducen y heredan sus características a la descendencia. Eventualmente, las poblaciones resistentes serán predominantes y el control con el insecticida fallará (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2012).

En el caso de los piretroides, esta resistencia muchas veces ha estado asociada a cambios en el gen del canal de sodio sensible a voltaje (*vssc*, por sus siglas en inglés), que resultan en cambios en los aminoácidos que conforman la proteína de canal (VSSC, por sus siglas en inglés), alterando la interacción del insecticida con los receptores en el canal (Wickham, Chadwick y Stewart, 1974; Busvine, 1951; Rinkevich *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014; Field *et al.*, 2017; Scott, 2019).

2.5.4. Gen del canal de sodio sensible a voltaje (*vssc*) y el alelo *kdr-his*

A principios de los años 1990, se descubrió que la resistencia en los insectos a algunos insecticidas del tipo piretroides podría estar asociada con cambios en la secuencia del gen del canal de sodio (*vssc*) (Soderlund, 2005; Dong, 2014), y desde entonces múltiples estudios han reportado cambios en la secuencia de este gen principalmente en el segundo dominio del canal (II) (Figura 5) (Dong, 2014; Soderlund y Knipple 2003).

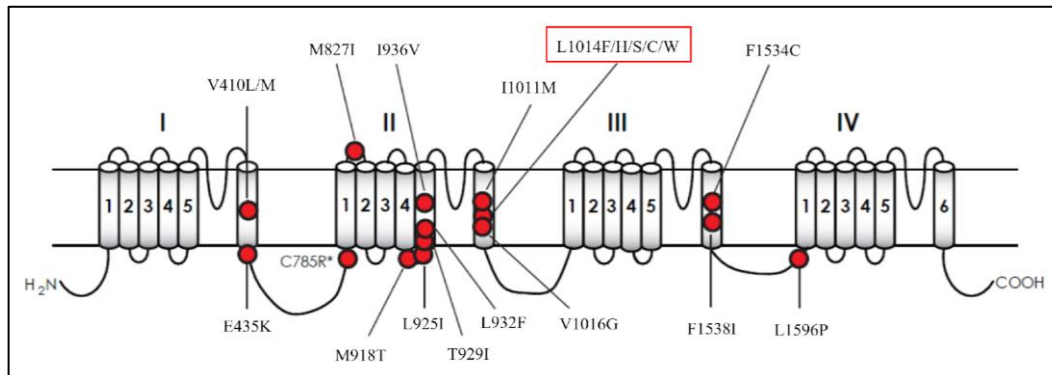


Figura 5. Mutaciones asociadas con resistencia a insecticidas piretroides (Adaptado de Dong, 2014). Señalado en un cuadrado rojo se indican los distintos alelos que ocurren en la posición 1014 de la proteína del canal.

En el año 2011, Olafson y colaboradores dilucidaron la secuencia parcial del gen del canal de sodio de *Stomoxys calcitrans* L. (GenBank ID HQ010280.1), el fragmento de 5280 pb codifica para un marco de lectura abierto de 1759 residuos de aminoácidos, que comprende desde el segmento seis del primer dominio (IS6) hasta el segmento seis del cuarto dominio (IVS6) del canal. Además, entre sus descubrimientos, identificaron la transversión de una timina (T) a una adenina (A) (GenBank IDs: HQ010281.1, HQ010282.1), cambio que designaron como *kdr-his*, ya que esta mutación da lugar a la sustitución del aminoácido leucina (L) por el aminoácido histidina (H) en el residuo 1014 de la proteína del canal, misma posición donde se reportó el primer alelo de resistencia *kdr* en *Musca domestica* L.

En un estudio posterior Olafson *et al.* (2019) determinaron la presencia de otros sitios polimórficos en la región intrónica de la secuencia, no obstante, no detectaron la presencia de polimorfismos como M918T y T929I que se ha reportado dan lugar a los fenotipos *super-kdr* y

super-kdr-like en moscas relacionadas como la mosca doméstica y la mosca del cuerno (Williamson *et al.*, 1996; Guerrero *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2017).

3. Marco Metodológico

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del INTA, en Mata Redonda, San José, y en la Agencia de Extensión del MAG, ubicado en Pital de San Carlos.

3.1. Sitios de muestreo

Para el estudio de la presencia del alelo *kdr-his* en poblaciones en campo de *Stomoxys calcitrans* L. se realizaron muestreos en ganaderías aledañas a zonas de cultivo de piña, palma aceitera y banano con control químico de la plaga. Además, se muestreó una ganadería apartada de campos de cultivos agrícolas, donde la mosca se reproducía en el estiércol de los animales (Cuadro 2, Figura 6).

Cuadro 2. Sitios de muestreo de individuos de la mosca para análisis molecular.

Cultivo-rastrero	Latitud	Longitud	Localidad
Piña	10°30'22.6"N	84°13'06.6"O	Alajuela, Rio Cuarto, Pinar
	10°28'12.5"N	84°17'59.2"O	Alajuela, San Carlos, Pital
Palma aceitera	9°29'32.3"N	84°11'32.5"O	Puntarenas, Parrita, Cerros
Banano	10°04'32.4"N	83°22'00.7"O	Limón, Matina, Batán
Estiércol	10°0'33.56"N	84°8'53.24"O	Heredia, Flores, San Joaquín

Para el estudio de susceptibilidad a insecticidas piretroides, los muestreos se realizaron en los sitios cercanos a producciones de piña, debido a la alta incidencia de la mosca en estas zonas, lo cual fue fundamental para obtener la cantidad de moscas suficientes para realizar los bioensayos (Cuadro 3, Figura 6).

Cuadro 3. Sitios de muestreo de individuos de la mosca para bioensayos *in vitro*.

Cultivo-rastrojo	Latitud	Longitud	Sitio
	10°30'22.6"N	84°13'06.6"O	Alajuela, Rio Cuarto, Pinar
Piña	10°28'24.2"N	84°16'54.4"O	Alajuela, San Carlos, Pital, 4 Esquinas
	10°34'06.2"N	84°11'01.5"O	Alajuela, San Carlos, Pital, Chaparrón

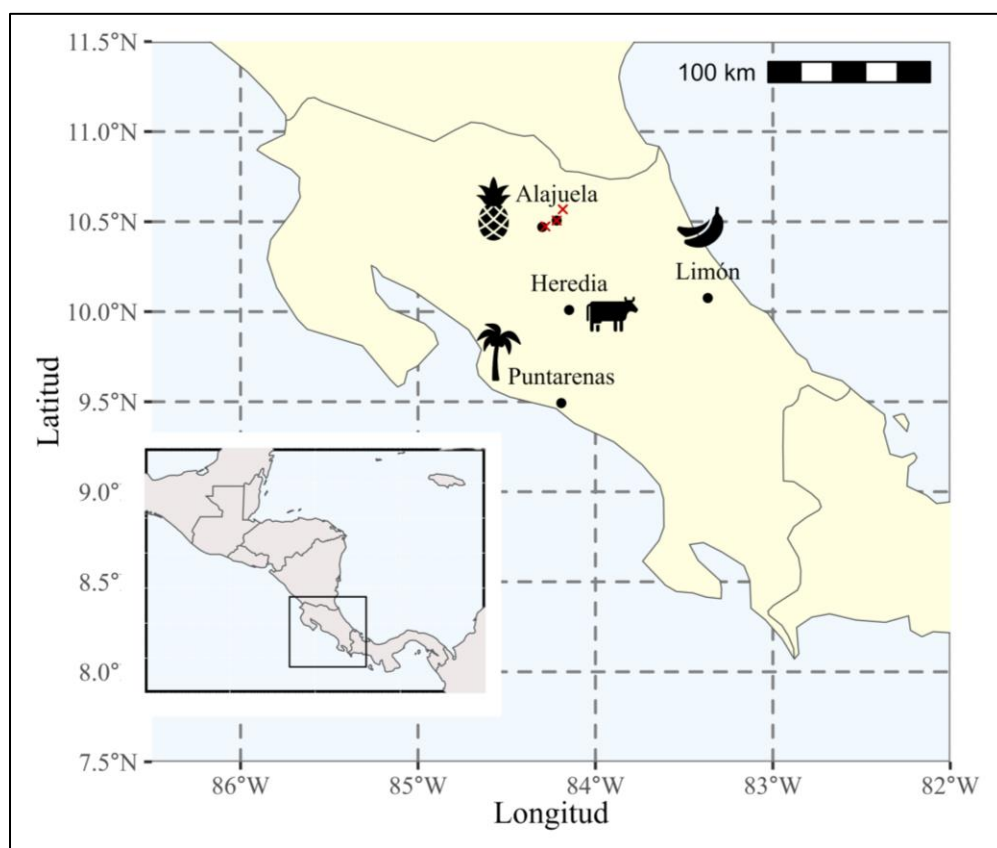


Figura 6. Sitios de muestreo de adultos de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. Los sitios de colecta para los análisis moleculares se indican con un círculo negro; los sitios de colecta para los bioensayos se indican con una equis roja, los íconos indican el tipo de cultivo-rastrojo en la zona (Elaboración propia).

3.2. Detección del alelo *kdr-his* en poblaciones en campo de *Stomoxys calcitrans* L.

3.2.1. Muestreo de adultos en campo

Para el muestreo se utilizaron trampas Vavoua con dos sustancias atrayentes, una con olor similar al sudor de los animales y otra con olor a materia orgánica en descomposición (desarrollados por la empresa ChemTica Internacional S.A.). Las trampas se colocaron en pequeñas ganaderías aledañas a zonas de cultivo cuyos rastrojos son utilizados por la mosca para la oviposición y desarrollo de las larvas (Figura 7A). En cada sitio se determinaron los puntos con focos poblacionales de la mosca. Cada trampa Vavoua se colocó con al menos 10 m de separación una de la otra. Se tomaron los individuos que ingresaron a las botellas colectoras en un período de 24 horas (Figura 7B). En la zona de cultivo de palma aceitera se colocaron trampas Vavoua, pero no se logró la captura de especímenes, por lo que, para obtener las 50 moscas requeridas, se utilizaron pantallas pegajosas blancas y azules y de ahí se tomaron los individuos (Figura 7C y 7D). En total se recolectaron 200 especímenes, 50 individuos en cada sitio.

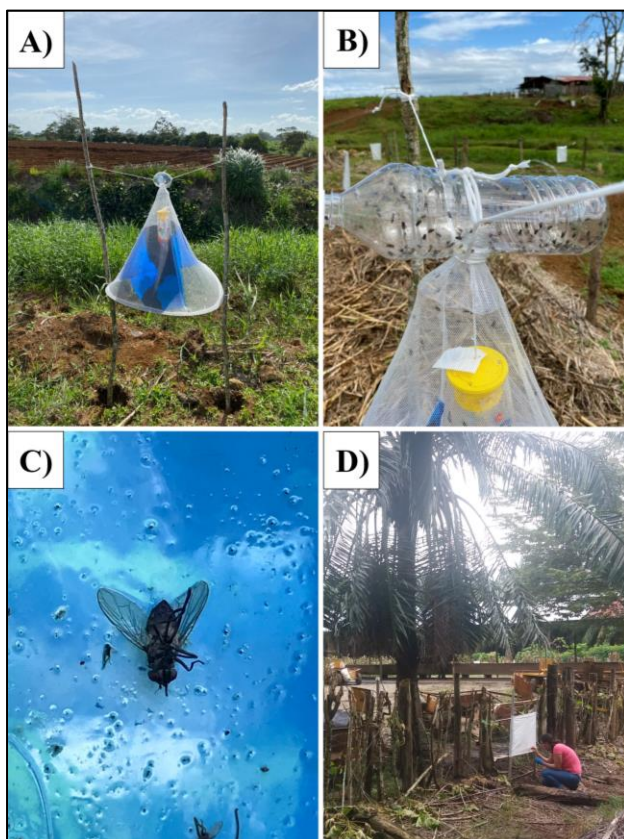


Figura 7. Captura en campo de adultos de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. A) Trampa Vavoua con atrayentes cercana a una zona de cultivo de piña, B) Botella recolectora de especímenes, C) Trampa pegajosa con espécimen de la mosca, D) Colecta de insectos de las trampas pegajosas. (Fotografías por Fabian Castro y Ruth Castro, INTA).

3.2.2. Sexado de individuos

El sexado de los individuos se realizó en el laboratorio utilizando un estereoscopio (Zeiss, Stemi 508), con aumento de 8X, de acuerdo con la metodología descrita por Masmeatathip *et al.* (2006b), la cual se basa en las diferencias del espacio interocular (EO) y la longitud de los ojos (LO) entre machos y hembras (Figura 8A y 8B). Luego, a cada mosca se le cortó la cabeza para almacenarla en 50 μ L de etanol 80% (grado biología molecular), a -80° C, hasta su análisis posterior.

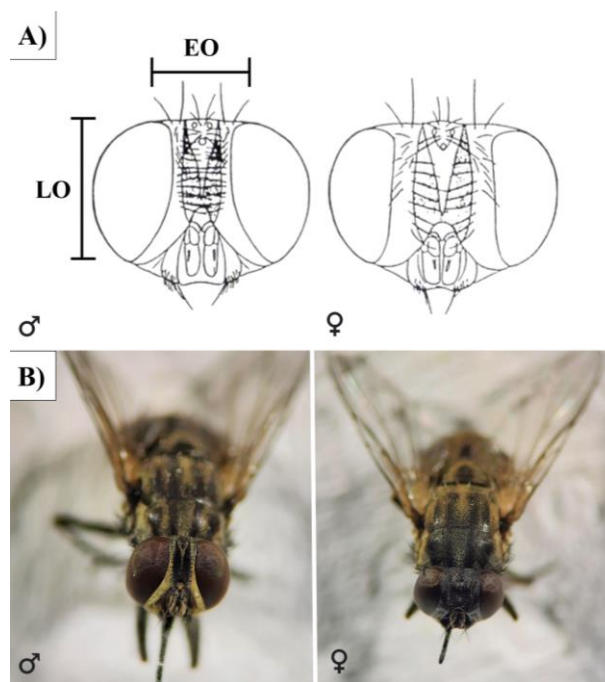


Figura 8. Sexado de especímenes de *Stomoxys calcitrans* L. A) Diferencias en el espacio interocular (EO) y a longitud de los ojos (LO), B) Macho y hembra. (Tomado de Salem, 2012 y adaptadas por Zumpt, 1973; fotografías de fuente propia).

3.2.3. Extracción de ADN

Cada cabeza (1 a 4 mg de tejido aproximadamente) se extrajo individualmente utilizando el siguiente protocolo tampón CTAB al 3% (1.4 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.2% β -mercaptoetanol) (Figura 9A). Las muestras se secaron en papel toalla para eliminar el etanol (Figura 9B). Cada muestra se maceró en 400 μ L de tampón precalentado a 50° C junto con dos balines de tungsteno de 3 mm, durante 5 minutos a una frecuencia de 30 1/s con el TissueLyser II (Qiagen) (Figura 9C). Las muestras se incubaron a 65° C durante una hora, y se eliminó el debris del macerado (Figura 9D).

Luego se agregaron 400 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó a 8154xg durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante (Figura 9E). Luego se agregaron 400 μ L de isopropanol, y la mezcla se incubó a -20° C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 12100xg durante 15 minutos y se eliminó el isopropanol, se agregaron 400 μ L de etanol al 70% al ADN precipitado y se centrifugó a 8154xg durante 5 minutos (Figura 9F). Finalmente, cada botón de ADN se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

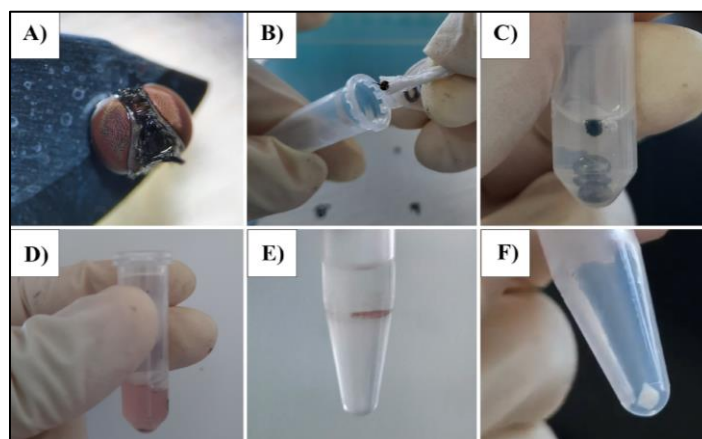


Figura 9. Extracción de ADN a partir de cabezas de *Stomoxys calcitrans* L. A) Cabeza de un espécimen macho, B) Colocación de cabeza en tubo de extracción, C) Cabeza lista para macerar, D) Macerado obtenido, E) Separación de las fases, F) Botón de ADN obtenido. (Fotografías de fuente propia).

La concentración y pureza del ADN se estimó mediante espectrofotometría de microvolúmenes con el equipo NanoDrop2000 (Thermo Scientific). La integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con el intercalante GelRed (GoldBio), y con el buffer de corrida TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.0) la movilidad electroforética se llevó a cabo durante 1 hora y 30 minutos a 90V. Para estimar el peso de la banda se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb (ThermoScientific). Los ADNs se almacenaron a -20° C hasta su uso posterior.

3.2.4. PCR alelo específico

Para cada muestra se realizaron dos reacciones de PCR, una para determinar la presencia del alelo silvestre y la otra para determinar la presencia del alelo *kdr-his*; para esto se utilizaron los cebadores diseñados por Olafson *et al.*, 2011, para la amplificación de la secuencia parcial del segmento seis del segundo dominio del canal (IIS6). La secuencia de los cebadores utilizados es la siguiente, el cebador universal ScNach-R17: 5'-CTAGATGAACCGAAATTGGAC-3', el cebador alelo silvestre 1014L: 5'-TACTGTGGTCATCGGCAATCT-3' y el cebador alelo mutado 1014H: 5'-TACTGTGGTCATCGGCAATCA-3'. Los cebadores se utilizaron en la siguiente combinación según el alelo a detectar, para el alelo silvestre (L) se utilizó el cebador ScNach-R17 con el cebador 1014L, para el alelo *kdr-his* (H) se utilizó el cebador ScNach-R17 con el cebador 1014H.

El ensayo de PCR alelo-específico consistió en 12.5 µL del buffer DreamTaq™ PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific®), 1.5 µL del cebador universal a 10 µM, 1 µL del cebador alelo-específico a 10 µM, 8 µL de agua para PCR y 2 µL de ADN sin diluir a un volumen final de 25 µl. El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95° C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturalización a 95° C por 30 segundos, hibridación de los cebadores a 62° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 30 segundos, con una extensión final de 72 °C por 7 minutos (Mastercycler® Nexus Gradient, Eppendorf).

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con GelRed™ (GoldBio®), se separaron con el buffer TBE 1X durante 2 horas y 30 minutos a un voltaje de 90V. Para estimar el peso del amplicón se utilizó el marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo Scientific®), el tamaño esperado de los productos de PCR fue de 198 pb (Olafson *et al.*, 2011). Adicionalmente, productos de PCR representativas de los distintos genotipos encontrados se visualizaron en el sistema de electroforesis E-Gel™ Power Snap (Invitrogen™), en un gel prefabricado de agarosa al 2% y con SYBR Safe siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.5. Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas

Aquellos individuos que en el PCR alelo específico fueron positivos únicamente para el alelo silvestre se definieron como homocigotos silvestres, aquellos positivos únicamente para el alelo mutado *kdr-his* se definieron como homocigotos mutados; por último, aquellos que fueron positivos para ambos alelos se definieron como heterocigotos.

Las frecuencias genotípicas se calcularon a través de las Ecuaciones 1, 2 y 3 (Cabrero y Camacho, 2002). Donde “LL” fue la frecuencia genotípica para el alelo silvestre, “HH” la frecuencia genotípica para el alelo *kdr-his* y “LH” la frecuencia genotípica para los alelos en condición heterocigota. Mientras que nLL es el número de individuos con un genotipo homocigoto para el alelo silvestre, nHH el número de individuos con un genotipo homocigoto para el alelo *kdr-his*, y nLH el número de individuos con un genotipo heterocigoto. Por último, N es el número total de individuos muestreados.

$$LL = \frac{nLL}{N} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$HH = \frac{nHH}{N} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$LH = \frac{nLH}{N} \quad \text{Ecuación 3}$$

Las frecuencias alélicas se calcularon a través de las Ecuaciones 4 y 5 (Cabrero y Camacho, 2002, con algunas modificaciones). Donde “L” es la frecuencia del alelo silvestre y “H” es la frecuencia del alelo *kdr-his*. Para el cálculo se utilizaron los datos de frecuencias genotípicas calculadas anteriormente.

$$L = LL + \frac{LH}{2} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$H = HH + \frac{LH}{2} \quad \text{Ecuación 5}$$

3.2.6. Análisis bioinformático de las secuencias

Una muestra (código 19-252) fue secuenciada mediante la tecnología Sanger en dos direcciones utilizando los cebadores del ensayo de PCR alelo-específico, según el protocolo descrito en la sección 3.2.3 (Olafson *et al.*, 2011). Por otro lado, se secuenciaron las muestras código: 20-031 y código: 19-418, con los siguientes cebadores ScNaCh-R8 (5'-TACGATTGAAGGCCTCTGCT-3') y ScNaCh-F20 (5'-CCACAGATCACAAGGATAAATTC-3'), los cuales amplifican una región más amplia de la secuencia del segmento seis del segundo dominio (IIS6), con el fin de estudiar la presencia de polimorfismos en otras posiciones de la secuencia del canal adicionales al sitio de mutación *kdr-his* (Olafson *et al.*, 2019).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Geneious versión 2023.0.4 (Biomatters Ltd.) y se analizaron con el programa en línea BLASTn (Altschul *et al.* 1990) disponible en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que brinda una identidad preliminar de las secuencias; luego se compararon contra la base de datos del GenBank (nr/nt) para obtener accesiones potencialmente relacionadas y con estas se construyeron alineamientos múltiples.

Se incluyeron en el análisis de alineamiento múltiple las secuencias código 20-031 y código 19-418 y 14 accesiones obtenidas del GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/joyce.estrada_gamboa.1/collections/62853290/public/). Se seleccionaron los bloques conservados mediante los

parámetros por defecto del programa en línea Gblocks (Castresana, 2000). (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks), y luego con la herramienta ModelFinder (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica para el alineamiento. Seguidamente, con la plataforma en línea IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Nguyen *et al.*, 2015) se obtuvieron las inferencias topológicas de posicionamiento taxonómico por máxima verosimilitud, mediante el cálculo de soporte de nodos con el método UFboot con 1000 permutaciones (Hoang *et al.*, 2018). El árbol obtenido se visualizó y editó con la herramienta en línea iTOL (<https://itol.embl.de/>) (Letunic y Bork, 2021).

3.3. Bioensayos *in vitro* de susceptibilidad a permetrina y deltametrina

3.3.1. Muestreo de adultos en campo

Para la captura de los adultos de mosca se utilizaron trampas tipo Vavoua conjunto con atrayentes (Figura 10A), se colocaron de 3 a 4 trampas a una distancia de 10 m para aumentar la atracción de los insectos a las trampas. Luego de un periodo de aproximadamente 12 a 18 horas se colectaron las botellas colectoras con los adultos capturados. Las botellas contaban con una abertura con malla que permitía la entrada de oxígeno para mantener vivos a los insectos durante el traslado a la Agencia de Extensión del MAG, en Pital de San Carlos, para la ejecución de los bioensayos (Figura 10B).

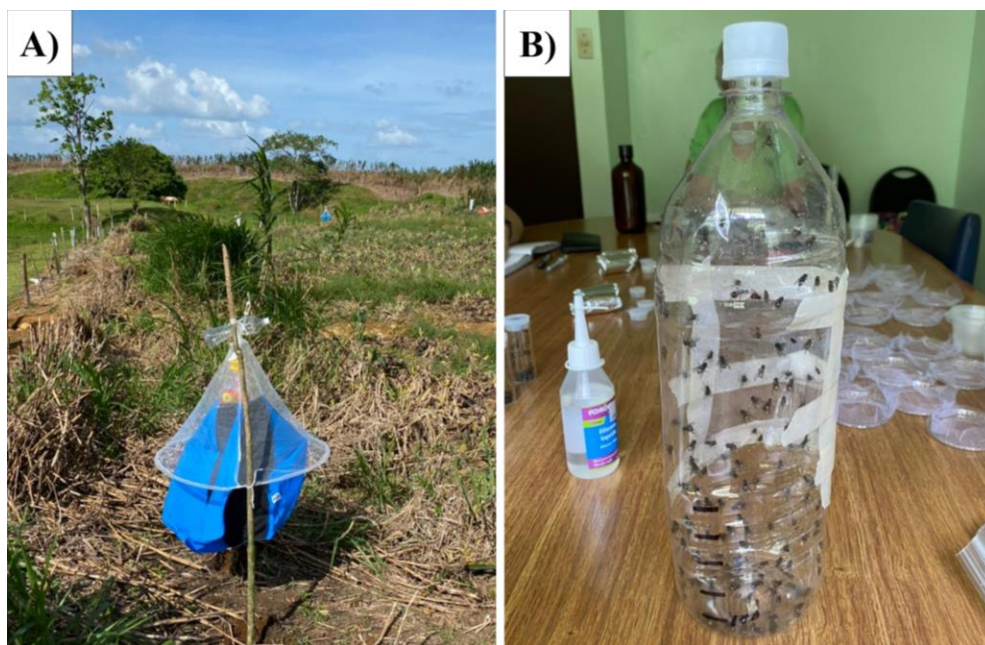


Figura 10. Captura en campo de adultos de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. A) Trampa Vavoua con atrayentes, B) Botella con algunos de los especímenes colectados para realizar los bioensayos (Fotografías por Fabian Castro, INTA).

3.3.2. Viales de exposición

Los viales utilizados en los bioensayos fueron preparados y donados por el Laboratorio Kaufman de los Estados Unidos. Los viales eran de vidrio de 60 mL, con una superficie interna de 67.86 cm^2 (4 cm de diámetro por 4.4 cm de altura), y con una tapa plástica que tenía una abertura de 3.5 cm de diámetro forrada con malla para permitir la ventilación.

Para cada insecticida, se utilizaron tres dosis, cada dosis con tres réplicas. Las dosis fueron control, 1X y 30X, donde la X correspondió al doble del LC_{99} del insecticida permetrina ($0.0035 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Pitzer *et al.*, 2010). La dosis 1X se utilizó como una concentración diagnóstica para determinar la susceptibilidad al insecticida; mientras que la dosis 30X es una concentración muy alta que se conoce como concentración de intensidad y se utilizó para definir la intensidad de la resistencia.

Las dosis se prepararon disolviendo la cantidad requerida de insecticida en una solución de acetona al 0.1%. Luego se dispensó 1 mL de la dosis correspondiente en cada vial y luego se rotaron para que el insecticida se impregnara de forma uniforme las paredes (Pitzer *et al.*, 2010). Los viales se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

3.3.3. Ejecución de los bioensayos *in vitro*

Los bioensayos se realizaron en la Agencia de Extensión del MAG, en Pital de San Carlos, en los años 2019, 2020 y 2021, entre los meses de julio y agosto. Los bioensayos se realizaron utilizando la metodología descrita por Scott *et al.* (2000) y modificada por Pitzer *et al.* (2010).

Como primer paso, los individuos se introdujeron en los viales de exposición, para esto se les adormeció a bajas temperaturas (4 °C) por 1 minuto; en cada vial se colocaron mínimo 10 adultos vivos de la mosca (Figura 11A). Las moscas se expusieron al insecticida durante 2 horas, a temperatura y humedad ambiental (Figura 11B). Pasado el tiempo de exposición, se contabilizó el número de individuos vivos y muertos en las réplicas de cada dosis para el cálculo de la mortalidad (Figura 11C; Cuadro 4).

Luego del periodo de exposición, las moscas se pasaron a recipientes de recuperación los cuales eran recipientes de plástico que también contaban con abertura forrada con malla que permitiera la entrada de oxígeno, además se les colocó un algodón impregnado con sacarosa al 10% como fuente de alimento para los individuos vivos (Figura 11D); el periodo de recuperación fue de 24 horas (Figura 11E). Pasado el tiempo se contabilizó el número de individuos sobrevivientes en los recipientes (Figura 11F).

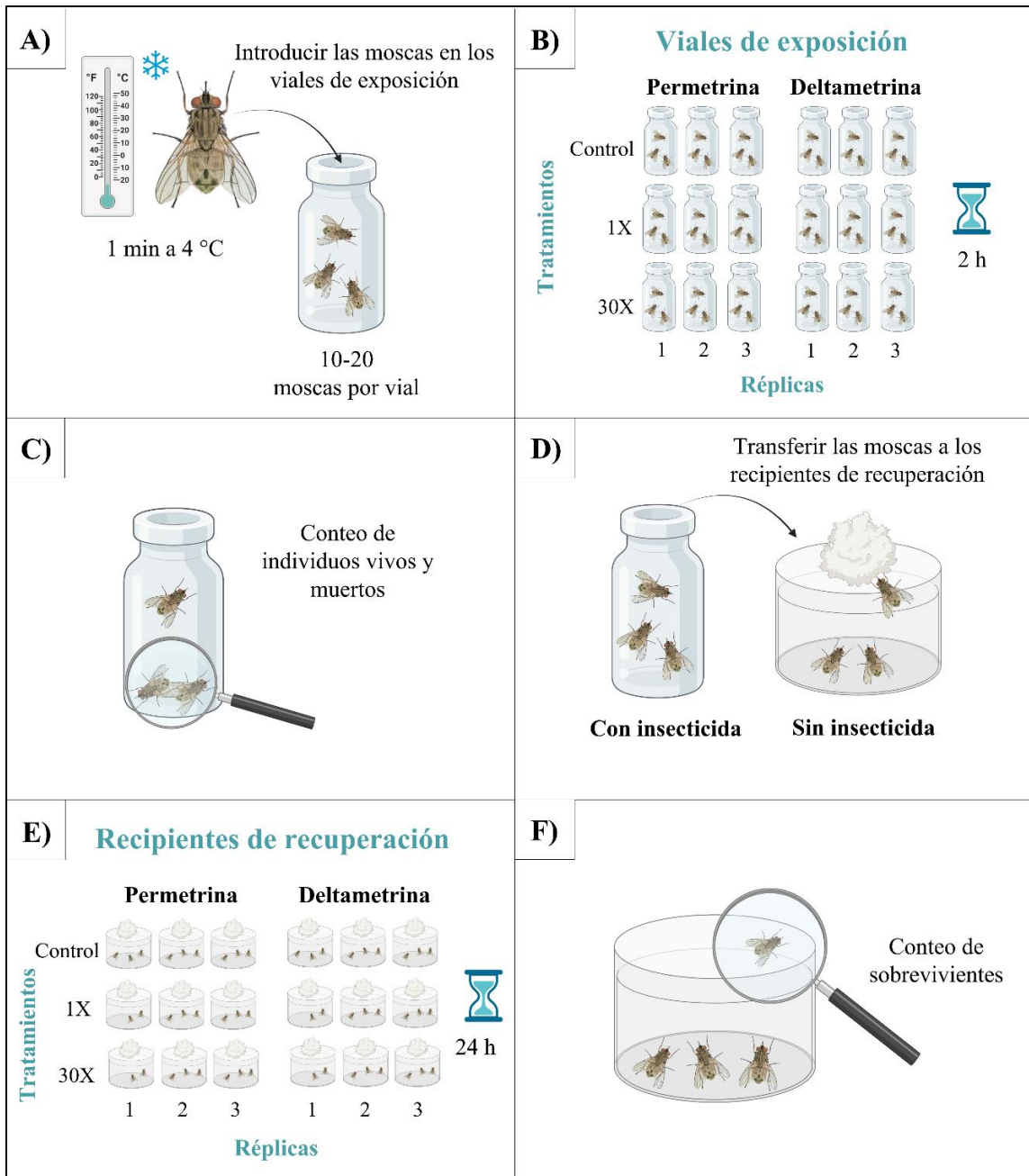


Figura 11. Esquema general de la ejecución de los bioensayos *in vitro*. A) Colocación de las moscas en los viales con insecticidas, B) Periodo de exposición al insecticida, C) Conteo de individuos vivos y muertos, D) Pasaje de las moscas a recipientes de recuperación, E) Período de recuperación, F) Conteo de sobrevivientes (Ilustración creada con BioRender.com).

Cuadro 4. Clasificación de individuos como vivos, con ataxia y muertos (WHO, 2016).

Vivo	“Knockdown” (ataxia o parálisis)	Muerto
	No puede mantenerse sobre sus patas ni volar de forma coordinada.	Sin señales de vida
Puede mantenerse sobre sus patas y volar de manera coordinada	Se tumba, moviendo las patas y las alas, pero no puede despegar Puede ponerse sobre sus patas y despegar brevemente, pero cae con rapidez.	Inmóvil No puede mantenerse sobre sus patas

Al finalizar, las moscas muertas se almacenaron en tubos de 15 mL con etanol al 80%, etiquetados según el insecticida y dosis correspondiente; las moscas sobrevivientes se almacenaron individualmente en tubos de 1.5 mL con etanol al 80% (Figura 12A). Luego en el laboratorio, se realizó el conteo del número total de individuos expuestos, y el número de machos y hembras (Figura 12B). Además, de cada dosis se seleccionaron 5 individuos al azar y se analizaron por PCR para determinar la presencia del alelo mutado; las moscas sobrevivientes también se analizaron por PCR (Figura 12C y 12D).

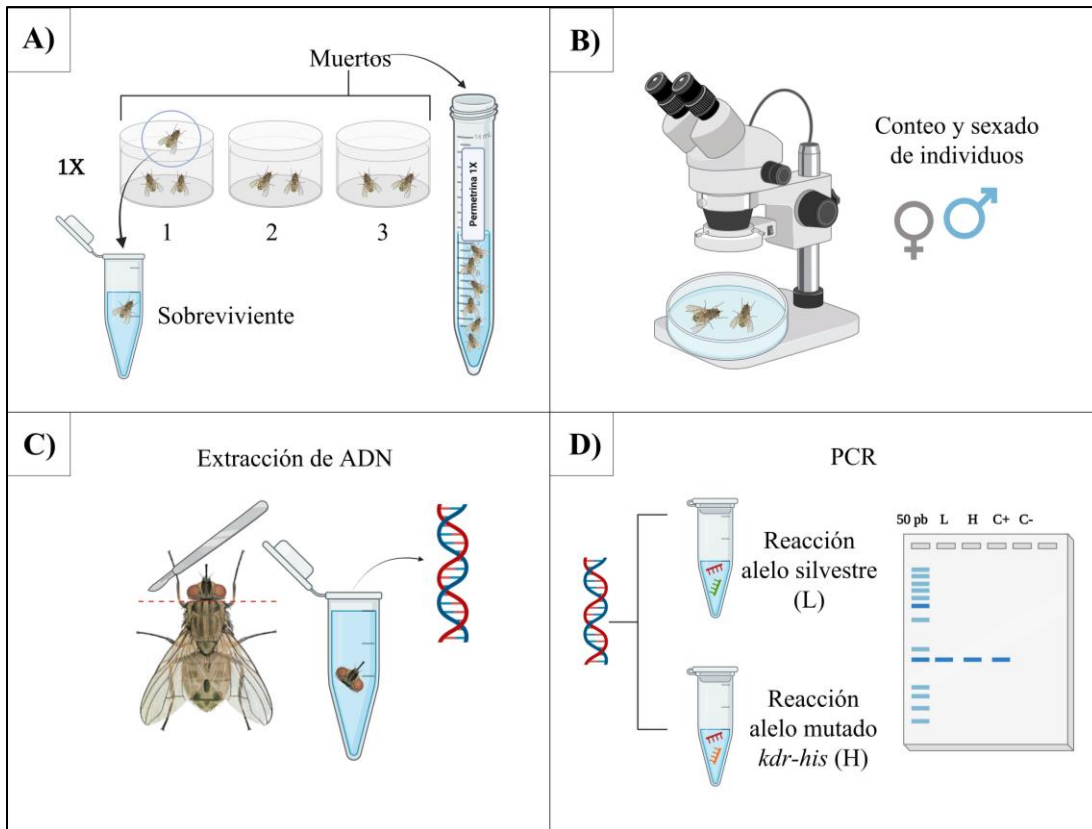


Figura 12. Análisis molecular de las moscas de los bioensayos in vitro. A) Conservación de las moscas, B) Conteo y sexado, C) Extracción de ADN, D) Análisis por PCR alelo específico y visualización del resultado mediante electroforesis de agarosa (Ilustración creada con BioRender.com).

3.3.4. Cálculo del grado de susceptibilidad a permetrina y deltametrina

El grado de susceptibilidad, se evaluó e interpretó siguiendo los criterios establecidos por la WHO (2016, 2022). La mortalidad observada en cada dosis se calculó sumando el número de individuos muertos en todas las réplicas; y expresándose como porcentaje del número total de individuos expuestos en dichas réplicas. Se utilizó la Ecuación 6 (WHO, 2022):

$$Mortalidad\ dosis\ (\%) = \frac{Número\ de\ individuos\ muertos}{Total\ de\ individuos\ expuestos} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

La mortalidad observada en el control se calculó de manera similar utilizando la Ecuación 7 (WHO, 2016):

$$Mortalidad\ control\ (\%) = \frac{Número\ de\ individuos\ muertos}{Total\ de\ individuos\ en\ el\ control} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Cuando la mortalidad en el control fue mayor o igual a 5% y menor o igual a 20%, se corrigió la mortalidad observada utilizando la Ecuación 8 (Abbott, 1925). Se descartó el bioensayo cuando la mortalidad en el control fue mayor o igual a 20%.

$$Mortalidad\ corregida = \frac{(\% Mortalidad\ dosis - \% Mortalidad\ control)}{(100 - \% Mortalidad\ control)} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

La interpretación del grado de susceptibilidad se realizó según los rangos del porcentaje de mortalidad establecidos por la WHO (2016) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Grado de susceptibilidad según los porcentajes de mortalidad (WHO, 2016).

Dosis	Rangos de mortalidad (%)	Grado de susceptibilidad
1X	98-100 %	Susceptible
	90-97 %	Resistencia incipiente
	< 90%	Resistencia confirmada
30X	98-100 %	Resistencia moderada
	< 98 %	Alta resistencia

4. Resultados

4.1. Frecuencias del alelo mutado *kdr-his* en poblaciones en campo de *Stomoxys calcitrans* L. en Costa Rica

El alelo de resistencia *kdr-his* estuvo presente en todos los sitios de estudio (Anexos 1 al 4). Como se observa en la Figura 13, según las combinaciones de cebadores evaluadas: ScNach-R17 - 1014L para la detección del alelo L y ScNach-R17 - 1014H para la detección de alelo H; fue posible identificar distintos genotipos entre los individuos analizados, habiendo individuos homocigotos silvestres (amplificación únicamente para el alelo L), individuos homocigotos mutados (amplificación únicamente para el alelo H) e individuos heterocigotos (amplificación para ambos alelos). La banda obtenida para la región amplificada en ambas combinaciones de cebadores fue de aproximadamente 198 pb, lo cual coincide con lo esperado según Olafson *et al.* (2011).

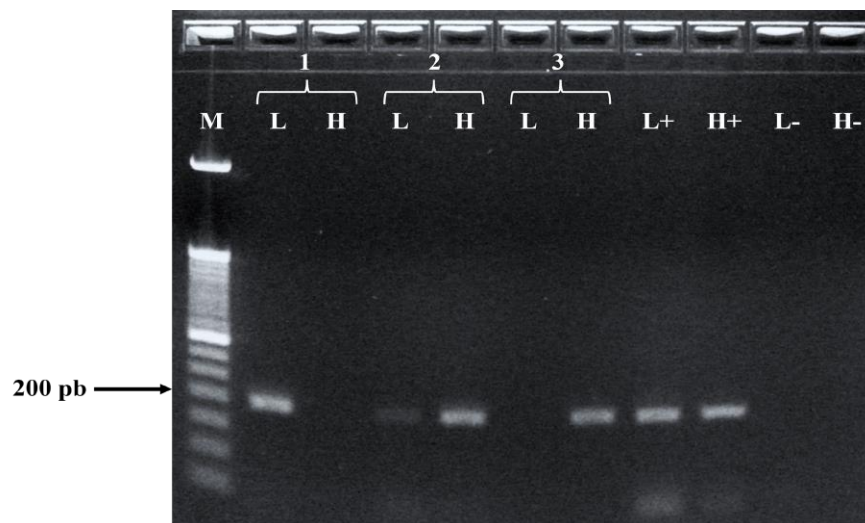


Figura 13. Muestras representativas de los genotipos encontrados entre los individuos analizados. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con SYBR Safe con el E-gel Power Snap. El orden de las muestras corresponde a M: marcador de peso molecular E-Gel 50 pb (Invitrogen), 1: 19-417 (homocigoto silvestre), 2: 20-031 (heterocigoto), 3: 21-167 (homocigoto mutado), L+: 19-252 (control positivo alelo L), H+: 19-252 (control positivo alelo H), L-: agua PCR (control negativo alelo L) y H-: agua PCR (control negativo alelo H) (Elaboración propia).

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron para todos los sitios (Cuadro 6). La frecuencia del alelo *kdr-his* estuvo entre 0.35 y 0.51, siendo las provincias de Heredia y Puntarenas los sitios con mayor frecuencia del alelo mutado con un 0.51 y Limón el de menor frecuencia con un 0.35. Por otro lado, la frecuencia del alelo silvestre rondó entre 0.49 y 0.65, siendo Puntarenas y Heredia los de menor frecuencia con un 0.49 y Limón el sitio con mayor frecuencia del alelo con un 0.65. Alajuela, presentó los alelos en igual frecuencia con 0.50 para cada uno.

Respecto a las frecuencias genotípicas, se determinó que el genotipo heterocigoto fue el más frecuente entre los sitios con valores entre 0.66 y 1.00 (Cuadro 6). Alajuela fue el sitio con mayor frecuencia de heterocigotos con un 1.00 y Limón el de menor frecuencia con un 0.66. El genotipo menos frecuente fue el homocigoto mutado con una frecuencia de 0.02 en los sitios de Puntarenas, Limón y Heredia y estando ausente en Alajuela. Por último, el genotipo homocigoto silvestre se encontró únicamente en Limón con un 0.32 de frecuencia genotípica.

Cuadro 6. Frecuencias de los alelos silvestre y *kdr-his* en adultos de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. de los distintos sitios.

Sitio	Rastrojo	N	Frecuencia alélica*		Frecuencia genotípica**		
			L	H	LL	LH	HH
Alajuela	Piña	50	0.50	0.50	0.00	1.00	0.00
Puntarenas	Palma aceitera	50	0.49	0.51	0.00	0.98	0.02
Limón	Banano	50	0.65	0.35	0.32	0.66	0.02
Heredia	Estiércol	50	0.49	0.51	0.00	0.98	0.02

*L: alelo silvestre, H: alelo mutado *kdr-his*. **LL: homocigoto silvestre, LH: heterocigoto, HH: homocigoto mutado.

4.2. Análisis bioinformático de las secuencias

Los análisis de BLASTn mostraron altos valores de identidad para las secuencias analizadas. La secuencia código 19-252 tuvo un 99.47% de similitud con accesiones del Genbank para el gen parcial del segundo dominio (II) del canal de sodio en *Stomoxys calcitrans* L. (GenBank ID MK002449.1). A través del análisis bioinformático, se determinó que la secuencia código 19-

252 presentó el alelo mutado *kdr-his* en heterocigosis (W) en la posición 103 pb (Figura 14). Por otro lado, las secuencias código 20-031 y código 19-418 mostraron un 100.00% de similitud con accesiones para el mismo gen (GenBank ID MK002450.1 y GenBank ID MK002449.1).

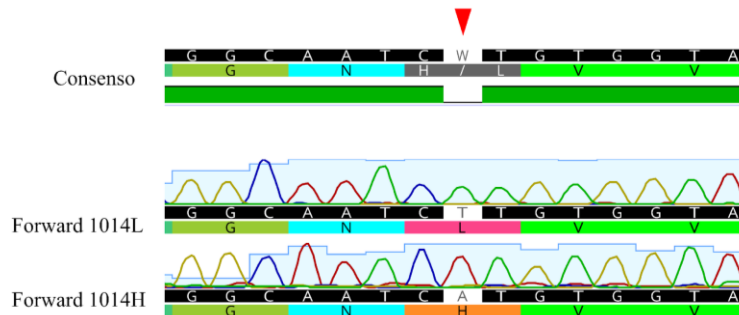


Figura 14. Vista del cromatograma de las secuencias parcial *forward* y consenso de la secuencia código 19-252. Secuencias nucleotídicas (en negro) y proteicas (en color), la flecha roja indica el cambio del nucleótido (Elaboración propia).

La topología de las secuencias código 19-252 y código 20-031 y la accesión de referencia (GenBank ID HQ010283.1), se componían de un intrón de 123 pb y dos exones amplificados parcialmente (Figura 15A), además mostró el sitio de mutación ubicado en la posición 103 pb *downstream* (Olafson *et al.*, 2019), punto donde ocurre la transversión del nucleótido timina por el nucleótido adenina en el ADN y da lugar al cambio del residuo leucina por histidina en la proteína del canal (Olafson *et al.*, 2011) (Figura 15B y 15C).

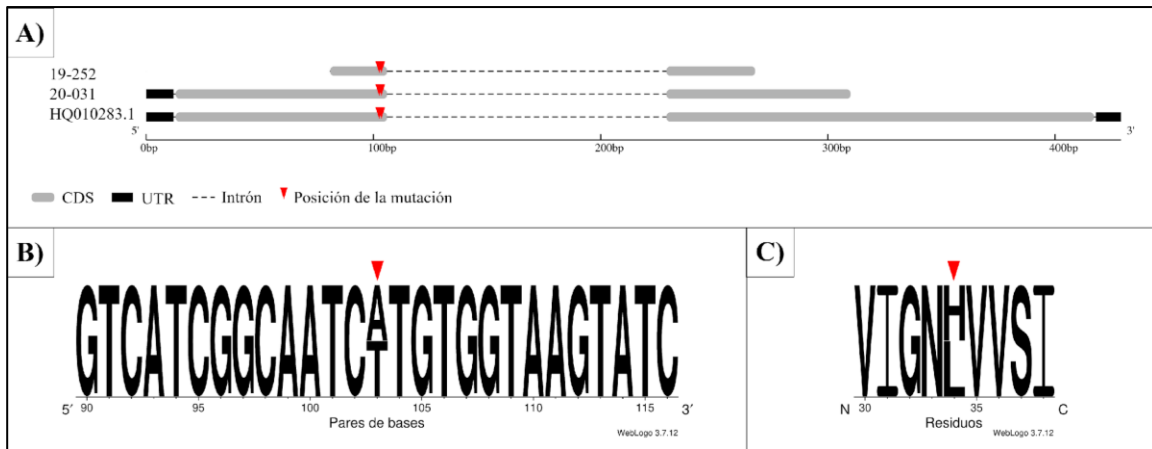


Figura 15. Estructura parcial del gen del canal de sodio en *Stomoxys calcitrans* L. (*vssc*). A) Topología de los distintos fragmentos amplificados del gen parcial *vssc*, indicando la mutación *kdr-his* en la posición 103 pb *downstream*, B) Transversión del nucleótido timina (T) por adenina (A) en la secuencia nucleotídica, C) Cambio del residuo leucina (L) por histidina (H) en la secuencia proteica (Ilustraciones creadas con GSDS 2.0 y WebLogo 3).

Por otro lado, el análisis de las secuencias código 20-031 y código 19-418 mostraron la alta conservación de la secuencia del gen parcial *vssc*, a pesar de que el alineamiento incluye accesiones de distintos países. No obstante, a pesar de la alta conservación se observó la presencia de al menos cuatro polimorfismos en la región intrónica de las secuencias (Figura 16).

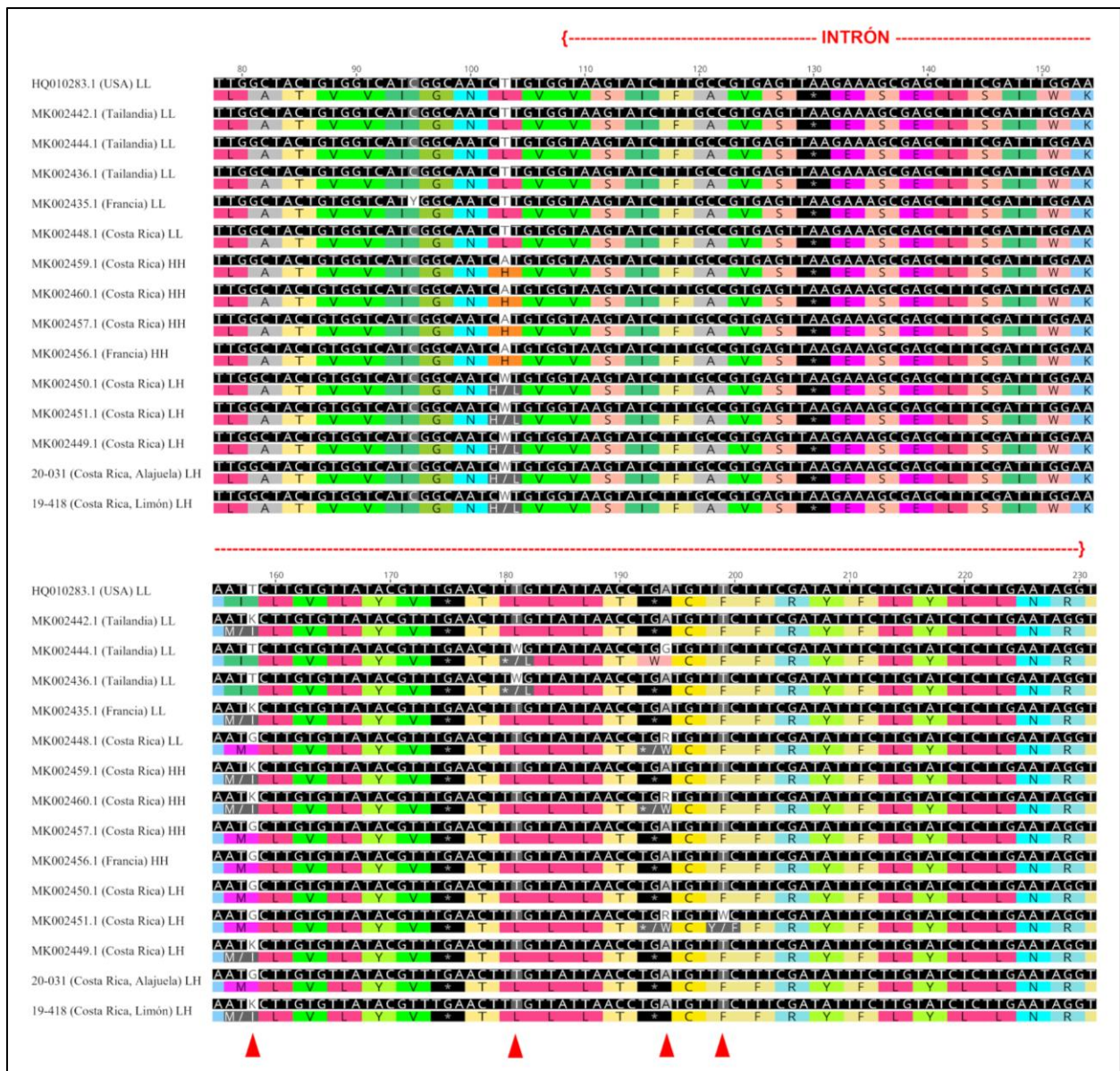


Figura 16. Sitios polimórficos en la región intrónica de la secuencia parcial del gen *vssc*. Se presenta una vista parcial del alineamiento de las secuencias código 20-031 y código 19-418 con accesiones del gen parcial *vssc*, donde se muestran las secuencias nucleotídicas (en negro) y proteicas (a color). Las flechas indican los sitios polimórficos.

(Elaboración propia).

Por último, se verificó la identidad de las secuencias código 20-031 y código 19-418 mediante un análisis de posicionamiento taxonómico, el cual mostró el agrupamiento de las secuencias en estudio junto con accesiones mayoritariamente de Costa Rica; aunado a lo anterior las secuencias se agruparon con accesiones heterocigotas para el alelo, donde el soporte de la rama fue de 55% (Figura 17).

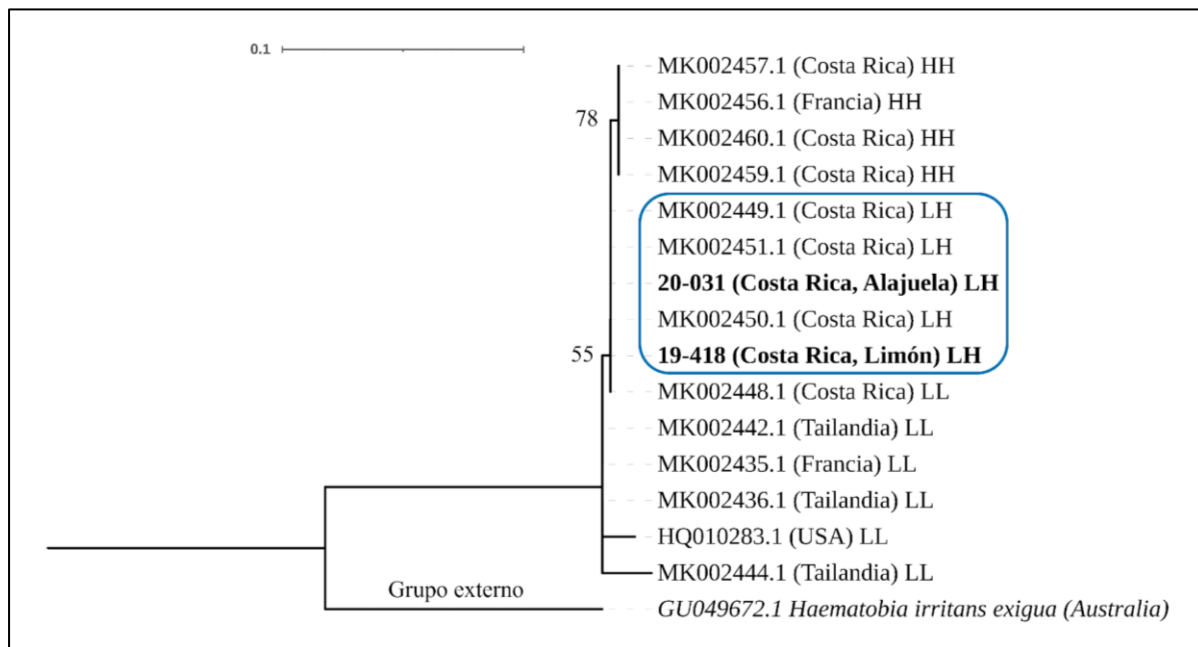


Figura 17. Topología de posicionamiento taxonómico por máxima verosimilitud (ML) de las secuencias código 20-031 y código 19-418 con accesiones del gen parcial *vssc*. El número en los nodos corresponde al valor de bootstrap. El grupo externo es *Haematobia irritans exigua* (Elaboración propia).

4.3. Susceptibilidad a permetrina y deltametrina en poblaciones de campo de *Stomoxys calcitrans* L.

Los porcentajes de mortalidad corregidos se determinaron para ambos insecticidas (Anexo 5 y Anexo 6). En el caso de permetrina, la mortalidad en la dosis 1X fue de 58.33% y 49.74% en los años 2020 y 2021, respectivamente, por otro lado, la mortalidad en la dosis 30X fue de 100%,

en ambos años (Figura 18A). Respecto a la mortalidad para deltametrina, esta fue de 100% en ambas dosis tanto en el año 2020 como en 2021 (Figura 18B).

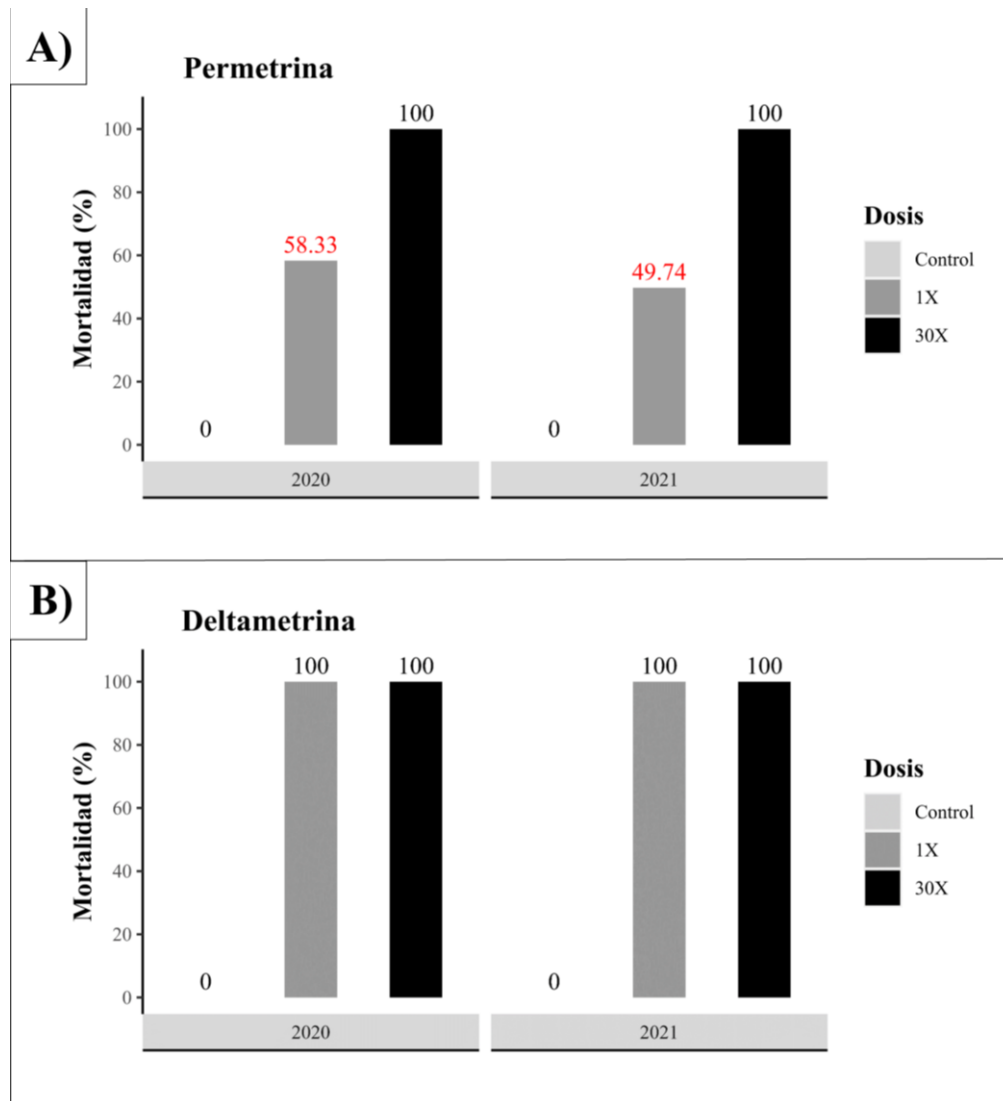


Figura 18. Porcentajes de mortalidad en adultos de *S. calcitrans* L. expuestos a tres dosis de A) permetrina y B) deltametrina en los años 2020 y 2021. Valores corregidos con Abbott (1925).

Los resultados de PCR de moscas expuestas en los bioensayos mostraron la presencia de la mutación en individuos sobrevivientes a la dosis 1X de permetrina (Anexo 7), estas moscas

presentaron el alelo en heterocigosis (Figura 19); cabe mencionar que no hubo presencia de individuos sobrevivientes en los bioensayos con deltametrina. Por otro lado, un hallazgo a resaltar es la presencia de individuos homocigotos para la mutación entre los individuos no sobrevivientes a la dosis 1X de permetrina y 1X de deltametrina (Anexo 8 y Anexo 9).

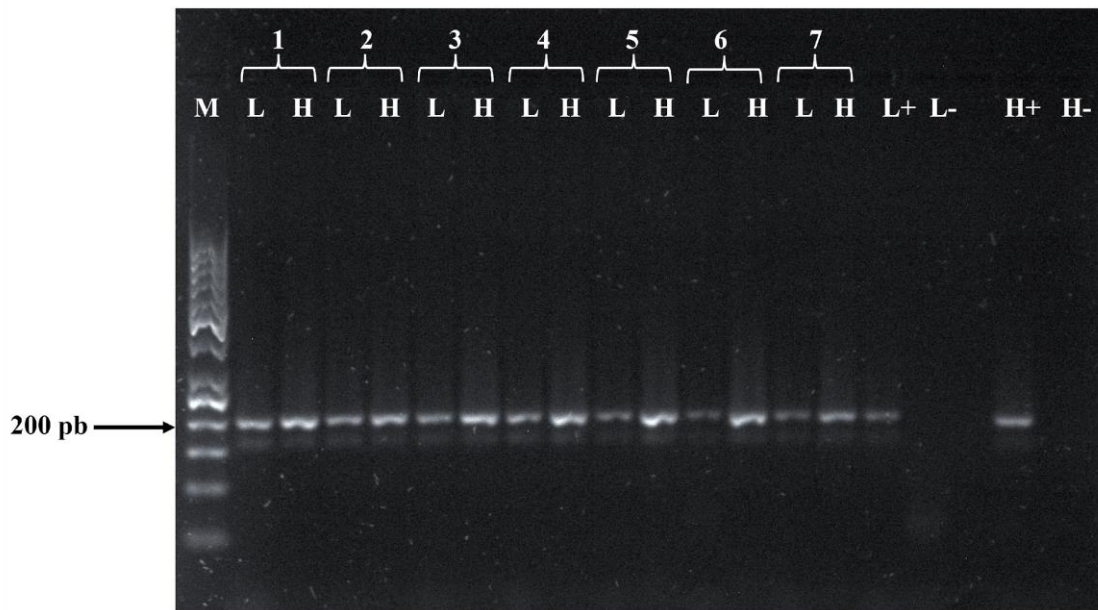


Figura 19. Alelos presentes en moscas sobrevivientes a la dosis 1X de permetrina en los bioensayos del 2020 y 2021. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, TBE 1X. El orden de las muestras corresponde a M: marcador de peso molecular 50 pb (ThermoScientific), 1: 21-073, 2: 21-076, 3: 21-077, 4: 21-078, 5: 21-759, 6: 21-760, 7: 21-761, L+: control positivo alelo L (19-252), L-: control negativo alelo L (agua PCR), H+: control positivo alelo H (19-252) y H: control negativo alelo H (agua PCR). Alelo silvestre (L) y alelo *kdr-his* (H).

5. Discusión

5.1. Frecuencias de la mutación *kdr-his* en poblaciones en campo de *Stomoxys calcitrans* L. en Costa Rica

La resistencia a los insecticidas piretroides en la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans* L.) se ha visto estrechamente relacionada a cambios genéticos como las mutaciones de tipo “knockdown resistance”, las cuales disminuyen la susceptibilidad de las moscas a los insecticidas (Olafson *et al.*, 2011). En el presente estudio se reporta por primera vez la presencia de la mutación *kdr-his* en poblaciones de moscas provenientes de las localidades de Puntarenas, Limón y Heredia, sitios donde la mosca se reproduce en rastrojos de palma aceitera, banano y estiércol animal; además se confirma la presencia de la mutación *kdr-his* en poblaciones de moscas provenientes de zonas de cultivo de piña en la localidad de Alajuela (San Carlos) (Olafson *et al.*, 2019), lo que evidencia una existente problemática de la mosca asociada a múltiples rastrojos de cultivos no sólo a la piña (SEPSA, 2017).

Respecto a las frecuencias genotípicas, la baja incidencia de individuos homocigotos mutados en los sitios sugiere que previo a la recolecta de las moscas pudo haber existido escasa presión selectiva por exposición a insecticidas piretroides sobre los individuos (Olafson *et al.*, 2011). Sin embargo, la alta incidencia de heterocigotos en los sitios indica que en el pasado existieron eventos de exposición a insecticidas piretroides, lo que pudo causar el aumento de individuos portadores del alelo *kdr-his* en las poblaciones; y que posteriormente la inmigración de individuos susceptibles a los sitios pudo causar se diluyera el alelo de resistencia en la descendencia, según ha sido reportado por otros investigadores (Pitzer *et al.*, 2010; Olafson *et al.*, 2011). Estos individuos heterocigotos podrían tener un papel importante en el control de la plaga al actuar como reservorios de alelos de resistencia con el potencial de originar individuos homocigotos resistentes en las poblaciones (Guglielmone *et al.*, 2002, Olafson *et al.*, 2011), siendo este un aspecto importante a considerar al plantear estrategias de control.

Por otro lado, la alta frecuencia de heterocigotos y la baja frecuencia de individuos homocigotos silvestres en este estudio sugiere que el alelo *kdr-his* en homocigosis puede conferir cierta desventaja a los individuos en ausencia de presión selectiva por insecticidas. Ya se ha visto que en ausencia de presión selectiva por insecticidas los alelos de resistencia “knockdown” tienen implicaciones biológicas para aquellos individuos que los portan (Scott, 2019); por ejemplo, estudios en la mosca del cuerno indican que individuos portadores del alelo de resistencia producen casi la mitad de los huevos en comparación con individuos susceptibles no portadores del alelo de resistencia, además de pupar casi menos de la mitad (Oyarzún *et al.*, 2008, como se citó en Scott *et al.*, 1997). A pesar de las desventajas asociadas a los alelos de resistencia, múltiples investigadores indican que una vez estos alelos se establecen en las poblaciones, aunque se suspenda el uso de insecticidas piretroides ya sea por un año o hasta siete años no se dará una reversión en la susceptibilidad de las poblaciones y los alelos de resistencia se mantendrán en heterocigosis principalmente, actuando como un reservorio en la población en caso de que sea necesario (Guerrero *et al.*, 2002; Oremus *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Esta información debe tomarse en consideración al plantear estrategias de control de la plaga.

En Limón, la presencia de individuos homocigotos silvestres en la población pudo deberse a la inmigración de individuos susceptibles desde otras localidades. Estudios sobre la dispersión de esta mosca indican que tiene la capacidad de desplazarse desde 3 km hasta 225 km desde su origen (Pitzer *et al.*, 2010, como se citó en Bailey *et al.*, 1973; Broce *et al.*, 2005; Hogsette y Ruff 1985). Esta capacidad de dispersión tiene efectos significativos en el estado de resistencia de las poblaciones de moscas, ya que el flujo genético puede ocasionar que alelos de resistencia disminuyan o aumenten en la población, afectando el estatus de resistencia en ciertos sitios pudiendo afectar el control de la plaga (Kaufman *et al.*, 2001; Pitzer *et al.*, 2010; Olafson *et al.*, 2011).

La presencia del alelo *kdr-his* en la población de Heredia fue esperada, ya que estudios similares en esta y otras moscas reportan la presencia de alelos “knockdown resistance” en sitios sin aplicación de insecticidas, estas investigaciones sugieren que la inmigración de individuos resistentes al sitio podría ser la causa (Olafson *et al.*, 2011; Pitzer *et al.*, 2010; Oyarzún *et al.*, 2008), sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprobar si realmente existe un flujo

de individuos al sitio (Kaufman *et al.*, 2001). Expertos en mosca del establo, también plantean la hipótesis sobre el desarrollo de resistencia indirecta en poblaciones de la mosca a través de la exposición a insecticidas piretroides utilizados en el control de otros ectoparásitos (Olafson *et al.*, 2019); esto ya ha sido reportado en otras moscas como la doméstica y la del cuerno (Khan *et al.*, 2013; Buscio, 2017). En Costa Rica este desarrollo de resistencia indirecta podría darse a través de la exposición a insecticidas piretroides (permetrina y cipermetrina) utilizados en el control de vectores de enfermedades como el mosquito de transmisión del dengue (comunicación personal Solórzano, 2022; Ministerio de Salud de Costa Rica, 2022).

Conocer sobre la presencia de la mutación *kdr-his* en las poblaciones de la mosca es de gran importancia para el control de la plaga, no obstante, es crucial seguir investigando la presencia de otras variantes genéticas como los alelos de resistencia *super-kdr* y *kdr*, que se ha informado confieren un nivel más alto de resistencia a los insectos (Rinkevich *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2016). Esto brindaría un panorama más detallado de la resistencia en las poblaciones para definir estrategias de control más eficientes.

5.2. Análisis bioinformático de las secuencias

Los polimorfismos presentes en el intrón situado a cuatro pares de bases del sitio de mutación *kdr-his* coinciden con los reportados con anterioridad en esta mosca, sin embargo, aún no se conoce si tienen un papel en la resistencia (Olafson *et al.*, 2019). Estudios en mosquitos han mostrado que existe relación entre los polimorfismos presentes en las regiones intrónicas del gen *vssc* y la presencia de ciertas mutaciones de resistencia en los exones, por lo que han sido utilizados en el estudio del origen y dispersión de mutaciones de tipo “knockdown resistance” (Etang *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2019). En *Stomoxys calcitrans* L. no se han realizado investigaciones de este tipo, por lo que existe un vacío de información al respecto.

En el presente estudio, el análisis filogenético de secuencias parciales del gen *vssc*, mostró la agrupación de las secuencias según el genotipo para el alelo *kdr-his* y los diferentes polimorfismos en la región intrónica, no obstante, se obtuvieron valores de Bootstrap relativamente bajos los cuales pueden atribuirse a que la secuencia del canal de sodio es altamente conservada

(Silva y Scott, 2019). Como se mencionó anteriormente el estudio evolutivo es de gran utilidad para comprender el origen y dispersión de alelos de resistencia en las poblaciones de insectos (Rinkevich *et al.*, 2012), sin embargo, dado que la secuencia del gen *vssc* es muy conservada, en este tipo de análisis se recomienda el estudio del gen completo del canal de sodio, ya que el estudio de secuencias parciales del gen *vssc* podría favorecer que nuevas mutaciones de resistencia pasen desapercibidas (Scott, 2019).

El estudio de la resistencia es complejo dado que es mediada por múltiples mecanismos. Un estudio reciente del genoma de *Stomoxys calcitrans* L. mostró que esta mosca con una amplia familia de genes que codifican para enzimas citocromo P450 monooxigenasas, las cuales están involucradas en la detoxificación de toxinas incluidos los insecticidas piretroides (Schuler Berenbaum, 2013), lo que sugiere que la mosca del establo cuenta con una mayor capacidad de desintoxicación metabólica impulsando la resistencia (Olafson *et al.*, 2021). Queda en evidencia que el estudio de la resistencia debe darse de manera integral y no enfocarse en un solo mecanismo, es aquí donde el estudio del genoma juega un papel importante en dilucidar nuevos enfoques en el control de esta plaga.

5.3. Susceptibilidad a permetrina y deltametrina en poblaciones de campo de *Stomoxys calcitrans* L.

Se observó resistencia moderada a la permetrina en poblaciones de *Stomoxys calcitrans* L. de la localidad de Alajuela, sitio donde años anteriores se reportaron infestaciones masivas con hasta 2000 moscas por metro cuadrado (Solórzano *et al.*, 2016), y baja susceptibilidad a la permetrina en las moscas (MAG, INTA y USDA, 2018). Respecto a la deltametrina, no se encontró resistencia en las poblaciones de mosca analizadas, sin embargo, al ser un insecticida utilizado en el control de brotes de la plaga en el país, es pertinente seguir monitoreando su susceptibilidad (Solórzano *et al.*, 2016). La presente investigación brinda un reporte actualizado sobre el estado de susceptibilidad a la permetrina y deltametrina que debe tomarse en cuenta al plantear una estrategia de control basada en estos insecticidas.

La presencia del alelo *kdr-his* en heterocigosis en el 100% de los individuos sobrevivientes a la exposición del insecticida permetrina sugiere que en *Stomoxys calcitrans* L. al igual que en otros insectos, la resistencia conferida por el alelo podría no ser completamente recesiva (Guglielmone *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2016; Scott, 2019). Por otra parte, la identificación de individuos homocigotos mutantes entre las moscas no sobrevivientes es un indicio importante que sugiere que la resistencia en esta población podría estar mediada no sólo por la presencia del alelo *kdr-his* sino también por otros mecanismos (Olafson *et al.*, 2019).

Queda en evidencia la importancia de seguir monitoreando las frecuencias alélicas y genotípicas de alelos de resistencia en las poblaciones de moscas del país, conjunto a la evaluación regular de la susceptibilidad a los insecticidas utilizados para el control de la plaga, además de la necesidad de implementar el estudio de otros mecanismos que puedan estar mediando la resistencia. Esto con miras a desarrollar estrategias efectivas para el control de esta plaga.

6. Conclusiones

El alelo de resistencia *kdr-his* se detectó en todas las poblaciones estudiadas, siendo el primer reporte de la mutación en las poblaciones de moscas en las localidades de Puntarenas, Limón y Heredia.

Se encontró resistencia moderada al insecticida permetrina en las moscas analizadas provenientes de la localidad de Alajuela; por otro lado, no se observó resistencia al insecticida deltametrina en estas moscas.

Fue posible adaptar un protocolo molecular para utilizar conjunto con bioensayos *in vitro* para el estudio de la resistencia a insecticidas piretroides en las poblaciones de mosca del establo en el país.

7. Recomendaciones

De ser posible, realizar una verificación mediante secuenciación en aquellas moscas que presenten diferentes genotipos.

Se recomienda a futuro evaluar la presencia de otros alelos de resistencia en las poblaciones de la mosca, especialmente aquellos que otorgan un nivel más alto de resistencia a los insecticidas piretroides.

Realizar la amplificación y secuenciación del gen completo del canal de sodio sensible a voltaje (*vssc*) en moscas de distintas localidades, con el fin de investigar la presencia de más polimorfismos tanto en los exones como intrones que puedan estar asociados a la resistencia en las poblaciones de moscas.

Aumentar el número de réplicas de cada tratamiento en los bioensayos *in vitro* para obtener más datos que permitan realizar un análisis estadístico más robusto acerca de la susceptibilidad a los insecticidas en las poblaciones de la mosca.

Continuar el monitoreo de la resistencia a permetrina en las poblaciones de moscas de la localidad de Alajuela, además de aplicar los bioensayos de susceptibilidad a piretroides a poblaciones de moscas en otras localidades del país.

8. Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*, 18(2), 265-267. doi:10.1093/jee/18.2.265a<
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3), 403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Bailey, D. L., T. L. Whitfield, y B. J. Smittle. (1973). Flight and dispersal of the stable fly. *J. Econ. Entomol.* 66, 410-411.
- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., y Duvallet, G. (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, 20(26), 26. doi: 10.1051/parasite/2013026

- Barros, A. T. M. D., Rodrigues, V. D., Cançado, P. H. D., y Domingues, L. N. (2019). Resistance of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), to cypermethrin in outbreak areas in Midwestern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28, 802-806.
- Bautista-Garfias C.R., Rodríguez T., Rojas C., Lira J.J., Álvarez J.A., y Polanco D. (2018). Molecular detection of *Anaplasma marginale* in stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) feeding on a tick-free bovine herd. *Veterinaria México OA.*, 5(1), 2. doi: 10.21753/vmoa.5.1.436
- Bedoya, J. R. (2007). Manejo integrado de la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) en el Palmar del Oriente S.A. *Revista Palmas*, 28(especial,), 383–388. Recuperado de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1274>
- Bernal, E. J., Arcila Quiceno V. H., y Serrano Novoa, C. A. (2005). Control biológico de larvas de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* *in vitro*. *Revista Spei Domus*, 1(1), 8–11. Recuperado de <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/553>
- Bishopp, F. (1920). The Stable Fly: How to Prevent Its Annoyance and Its Losses to Live Stock. U.S. *Department of Agriculture*, (1097), 1–18. Recuperado de <https://ia800901.us.archive.org/23/items/CAT31102575/farmbul1097rev1926.pdf>
- Bishopp, F. C. (1913). The Stable Fly (*Stomoxys calcitrans* L.), an Important Live Stock Pest. *Journal of Economic Entomology*, 6(1), 112–126. doi: 10.1093/jee/6.1.112
- Broce, A. B., Hogsette, J., y Paisley, S. (2005). Winter feeding sites of hay in round bales as major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in spring and summer. *Journal of Economic Entomology*, 98(6), 2307-2312.
- Brues, C. T. (1913). The Geographical Distribution of the Stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Journal of Economic Entomology*, 6(6), 459–477. doi: 10.1093/jee/6.6.459
- Burton, M. J., Mellor, I. R., Duce, I. R., Davies, T. E., Field, L. M., y Williamson, M. S. (2011). Differential resistance of insect sodium channels with *kdr* mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(9), 723–732. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.05.004
- Buschman, L. L., y Patterson, R. S. (1981). Assembly, Mating, and Thermoregulating Behavior of Stable Flies under Field Conditions. *Environmental Entomology*, 10(1), 16–21. doi: 10.1093/ee/10.1.16

- Buscio Gallo, D. (2017.). *Diagnóstico del perfil toxicológico de poblaciones de Hematobia irritans* ("mosca de los cuernos") a fipronil mediante bioensayos in vitro, en Uruguay. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/24946>
- Busvine, J. R. (1951). Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature*. 168,193–19. doi: 10.1038/168193a0
- Cabrero, J. y Camacho, J. (2002). Fundamentos de Genética de Poblaciones. En M. Soler, (Ed.), *Evolución, la base de la Biología* (pp. 84). Recuperado de https://www.academia.edu/3630366/_2002_book_Evolución_La_base_de_la_Biología
- Campbell, J. B., Berry, I. L., Boxler, D. J., Davis, R. L., Clanton, D. C., y Deutscher, G. H. (1987). Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. *Journal of Economic Entomology*, 80(1), 117-119.
- Castresana, J., (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 17(4), 540-52. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26(1), 13-25. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81133-2. PMID: 10798388.
- Catterall, W. A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., Scheuer, T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, 49(2), 124-41. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.022. Epub 2006 Sep 28. PMID: 17239913.
- ChemTica Internacional S.A. (2019). Resumen Ejecutivo sobre desarrollo de un atrayente eficaz para el control de mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*). Manuscrito inédito.
- Chrutek, A., Hołyńska-Iwan, I., Dziembowska, I., Bogusiewicz, J., Wróblewski, M., Cwynar, A., y Olszewska-Słonina, D. (2018). Current research on the safety of pyrethroids used as insecticides. *Medicina*, 54(4), 61. doi:10.3390/medicina54040061
- Chung, H. H., Cheng, I. C., Chen, Y. C., Lin, C., Tomita, T., y Teng, H. J. (2019). Voltage-gated sodium channel intron polymorphism and four mutations comprise six haplotypes in an *Aedes aegypti* population in Taiwan. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(3), e0007291.

- Cilek, J. E., y Greene, G. L. (1994). Stable Fly (Diptera: Muscidae) Insecticide Resistance in Kansas Cattle Feedlots. *Journal of Economic Entomology*, 87(2), 275–279. doi: 10.1093/jee/87.2.275
- Cook, D. F., Telfer, D. V., Lindsey, J. B., y Deyl, R. A. (2018). Substrates across horticultural and livestock industries that support the development of stable fly, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Austral Entomology*, 57(3), 344–348. doi: 10.1111/aen.12282
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A sequence logo generator, *Genome Research*, 14(6), 1188-1190. doi: 10.1101/gr.849004
- Cruz-Vázquez, C., García-Vázquez, Z., Fernández-Ruvalcaba, M., y George, J. E. (2005). Susceptibility of *Stomoxys calcitrans* (L.) to permethrin in dairy farms of Aguascalientes, Mexico. *Veterinaria México*, 36(4), 485-490.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., y Williamson, M. S. (2007). DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. *Life*, 59(3), 151 – 162. doi: 10.1080/15216540701352042
- De Velasco-Reyes I., Cruz-Vázquez, C., Cesar Ángel-Sahagún, C., Medina-Esparza, L., y Ramos-Parra, M. (2019). Control de *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans* con *Metarhizium anisopliae* en ganado naturalmente infestado. *Revista MVZ Córdoba*, 24(1), 7091-7096. doi: 10.21897/rmvz.1203
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver K., y Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50(1), 1–17. doi: 10.1016/j.ibmb.2014.03.012
- Doyle, M. S., Swope, B. N., Hogsette, J. A., Burkhalter, K. L., Savage, H. M., y Nasci, R. S. (2011). Vector Competence of the Stable Fly (Diptera: Muscidae) for West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology*, 48(3), 656–668. doi: 10.1603/ME10167
- Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. S., y Dong, K. (2016). Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects*, 7(4), 60. doi:10.3390/insects7040060
- Eddy, G. (1952). Livestock and insects. En A. Stefferud (Ed.), *Yearbook of Agriculture* (pp. 657–661). Recuperado de <https://ia801709.us.archive.org/18/items/yoa1952/yoa1952.pdf>
- Elliott, M. (1977). Synthetic Pyrethroids. *ACS Symposium Series*, 42, 17. doi: 10.1021/bk-1977-0042.ch001

- Etang, J., Vicente, J. L., Nwane, P., Chouaibou, M., Morlais, I., Do Rosario, V. E., ... y Pinto, J. (2009). Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* ss populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*, 18(14), 3076-3086.
- Field, L. M., Emyr, T. G., O'Reilly, A. O., Williamson, M. S., y Wallace, B. A. (2017). Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *Eur Biophys J*, 46, 675–679. doi: 10.1007/s00249-016-1195-1
- Foil, L. D., Meek, C. L., Adams, W. V., y Issel, C. J. (1983). Mechanical transmission of equine infectious anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American Journal of Veterinary Research*, 44(1), 155–156. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297339?report=abstract>
- Foil, L. D., y Hogsette, J. A. (1994). Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 13(4), 1125–1158. doi: 10.20506/rst.13.4.821
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. (E-ISBN 978-92-5-307348-1). Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf>
- Gallagher, J. (2016). Stable Fly - *Stomoxys calcitrans* [Fotografía]. Flickr. <https://www.flickr.com/photos/52450054@N04/27127547214/>
- Greene, G. L. (1993). Chemical, cultural, and mechanical control of stable flies and house flies. En G. D. Thomas y S. R. Skoda (Eds.), *Rural flies in the urban environment* (pp. 84). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/320046085_Rural_flies_in_the_urban_environment
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. de S., Medeiros, A. T. de B., Andreotti, R., Duarte, P. H., Adalberto Angel Pérez A. A. de L., Pereira, J. B., y Villela, H. S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 150–156. doi: 10.1590/S1984-29612014042
- Guerrero, F. D., Alison Jr, M. W., Kammlah, D. M. y Foil L. D. (2002). Use of the Polymerase Chain Reaction to Investigate the Dynamics of Pyrethroid Resistance in *Haematobia*

irritans irritans (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol*, 39(5):747-54. doi: 10.1603/0022-2585-39.5.747

- Guerrero, F. D., Jamroz, R. C., Kammlah, D., y 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(8–9), 745–755. doi: 10.1016/S0965-1748(97)00057-X
- 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*. *Med Vet Entomol*. 16(3), 310-5. doi: 10.1046/j.1365-2915.2002.00380.x
- Haddi, K., Berger, M., Bielza, P., Cifuentes, D., Field, L. M., Gorman, K., Rapisarda, C., Williamson, M. S., y Bass, C. (2012). Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(7), 506-513. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.03.008
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Herrero-Acosta, M. V., Montes-Pico, L. A., y Hernández, R. (1991). Abundancia relativa de *Stomoxys calcitrans* L. Diptera: Muscidae, en seis localidades del Pacífico Sur de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 39(2), 309–310. Recuperado de <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/24879/25089>
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L.S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* 35(2), 518-522. doi: 10.1093/molbev/msx281
- Hoch, A. L., Bailey, C. L., y Gargan II, T. P. (1985). Mechanical Transmission of Rift Valley Fever Virus by Hematophagous Diptera. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(1), 188–193. doi: 10.4269/ajtmh.1985.34.188
- Hogsette, J. A. y Ruff, J. P. (1985). Stable Fly (Diptera: Muscidae) Migration in Northwest Florida. *Environ. Entomol.*, 14: 170-175. doi: <https://doi.org/10.1093/ee/14.2.170>
- Hogsette, J. A., Ruff, J. P., y Jones, C. J. (1987). Stable fly biology and control in northwest Florida. *Journal of agricultural entomology*, 4(1), 1-11. Recuperado de <http://scentsoc.org/Volumes/JAE/v4/1/00041001.pdf>

- Holderman, C., Swale, D., Bloomquist, J., y Kaufman, P. (2018). Resistance to Permethrin, β -cyfluthrin, and Diazinon in Florida Horn Fly Populations. *Insects*, 9(2), 63. doi:10.3390/insects9020063
- Hopkins, B. W., y Pietrantonio, P. V. (2010). The *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) voltage-gated sodium channel and mutations associated with pyrethroid resistance in field-collected adult males. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 385–393. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.03.004
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297. doi: 10.1093/bioinformatics/btu817
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (2015). *Memoria Institucional 2014* (ISSN: 1659-4983). Recuperado del sitio de Internet de Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria: <http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/07/00527-inta-memoria-2014.pdf>
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (2011). Guía práctica de diagnóstico de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* y otros dípteros asociados a rastrojos de piña. San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado de: <http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/05/00495-mosca-guia-inta.pdf>
- Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria y ChemTica Internacional S.A. (2019). Evaluación de un atrayente de mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*, Diptera: Muscidae), en tres métodos de trampeo en el cultivo de piña (*Ananas comosus*). Manuscrito inédito.
- James, M. T. (1947). *The flies that cause myiasis in man*. Recuperado de <https://archive.org/details/fliesthatcausemy631jame>
- Johnson, G., Panella, N., Hale, K., y Komar, N. (2010). Detection of West Nile Virus in Stable Flies (Diptera: Muscidae) Parasitizing Juvenile American White Pelicans. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 1205–1211. doi: 10.1603/ME10002
- Kaufman, P. E., Scott, J. G., y Rutz, D. A. (2001). Monitoring insecticide resistance in house flies (Diptera: Muscidae) from New York dairies. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(6), 514-521.

- Kaufman, P. E., y Weeks, E. N. (2016). Stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Insect: Diptera: Muscidae) (EENY642). (pp.6). Recuperado del sitio de Internet Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension: <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN111400.pdf>
- Khan, H. A. A., Akram, W., y Shad, S. A. (2013). Resistance to conventional insecticides in Pakistani populations of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): a potential ectoparasite of dairy animals. *Ecotoxicology*, 22, 522-527.
- Letunic, I. y Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49(1), 293-296. doi: 10.1093/nar/gkab301
- Li, A. Y., Lohmeyer, K. H., y Miller, J. A. (2009). Dynamics and mechanisms of permethrin resistance in a field population of the horn fly, *Haematobia irritans irritans*. *Insect Science*, 16(2), 175-184.
- López-Sánchez, J., Cruz-Vázquez, C., Lezama-Gutiérrez, R., y Ramos-Parra, M. (2012). Effect of entomopathogenic fungi upon adults of *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 969–973. doi: 10.1080/09583157.2012.699026
- Marcon, P. C., Thomas, G. D., Siegfried, B. D., y Campbell, J. B. (1997). Susceptibility of Stable Flies (Diptera: Muscidae) from Southeastern Nebraska Beef Cattle Feedlots to Selected Insecticides and Comparison of 3 Bioassay Techniques. *Journal of Economic Entomology*, 90(2), 293–298. doi: 10.1093/jee/90.2.293
- Marín, A. y Estrada, J. (2023). Estadios de la mosca *Stomoxys calcitrans* L. [Ilustración].
- Masmeatathip, R., Gilles, J., Ketavan, C., y Duvallet, G. (2006a). First survey of seasonal abundance and daily activity of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) in Kamphaengsaen Campus, Nakornpathom province, Thailand. *Parasite*, 13(3), 245–250. doi: 10.1051/parasite/2006133245
- Masmeatathip, R., Ketavan, C., y Duvallet, G. (2006b). Morphological studies of *Stomoxys spp.* (Diptera: Muscidae) in central Thailand. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)*, 40, 872-881. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/283608069_Morphological_studies_of_Stomoxys_spp_Diptera_Muscidae_in_Central_Thailand

- Mellor, P. S., Kitching, R. P., y Wilkinson, P. J. (1987). Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Research in veterinary science*, 43(1), 109–112. doi: 10.1016/S0034-5288(18)30753-7
- Meyer, J. A., y Petersen, J. J. (1983). Characterization and Seasonal Distribution of Breeding Sites of Stable Flies and House Flies (Diptera: Muscidae) on Eastern Nebraska Feedlots and Dairies. *Journal of Economic Entomology*, 76(1), 103–108. doi: 10.1093/jee/76.1.103
- Ministerio de Agricultura y Ganadería, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria y U.S. Department of Agriculture (2018). *International Stable Fly Workshop. Stable Fly Insecticides y chemical control assessment*. Manuscrito inédito.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2010). *Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de piña*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9646.PDF>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2012). *Manual técnico para el manejo de rastrojos en el cultivo de piña*. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Q70-10493.pdf>
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2022). Plan Nacional de Acción de Entomología y Control de Vectores Costa Rica 2022-2024. Recuperado de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/vigilancia-de-la-salud/normas-protocolos-guias-y-lineamientos/programa-manejo-integrado-de-control-de-vectores/6124-plan-nacional-de-accion-de-entomologia-y-control-de-vectores-2022-2024/file>
- Mitzmain, M. B. (1913). The Bionomics of *Stomoxys calcitrans*, Linnaeus; a preliminary account. *Philippine Journal of Science*, (1), 28–48. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19131000163>
- Monge, M., y Bonilla, N. (2006). Procedimientos en el manejo de desechos orgánicos para el control de *Stomoxys calcitrans* L. (Setiembre/Octubre, 2006). Actualidad fitosanitaria. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AF-0028.pdf>
- Moraes, A. P., Bittencourt, V. R., y Bittencourt, A. J. (2010). Patogenicidade de *Beauveria bassiana* sobre estágios imaturos de *Stomoxys calcitrans*. *Ciencia Rural*, 40(8), 1802–1807. doi: 10.1590/S0103-84782010000800021
- Moraes, A. R., Angelo, I., Fernandes, É. K., Bittencourt, V. R., y Bittencourt A. J. (2008). Virulence of *Metarhizium anisopliae* to Eggs and Immature Stages of *Stomoxys calcitrans*.

- Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, 384–387. doi: 10.1196/annals.1428.008
- Müller, G. C., Hogsette, J. A., Beier, J. C., Traore, S. F., Toure, M. B., Traore, M. M., Bah, S., Doumbia, S., y Schlein, Y. (2012). Attraction of *Stomoxys sp.* to various fruits and flowers in Mali. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(2), 178–187. doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.01001.x
- Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol*, 79(1), 1-14. doi: 10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x. PMID: 8841090.
- Narahashi, T. (2000). Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 294(1), 1–26. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871290>
- Narahashi, T., (2002). Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini Rev Med Chem.*, 2(4), 419-32. doi: 10.2174/1389557023405927. PMID: 12370061.
- Nelder, M. P., Lloyd, J. E., Loftis, A. D., y Reeves, W. K. (2008). *Coxiella burnetii* in Wild-caught Filth Flies. *Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 1002–1004. doi: 10.3201/eid1406.071691
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 32(1), 268-74. doi: 10.1093/molbev/msu300
- Oğuz B, Özdal N., y Değer S. (2016). *Stomoxys* (Diptera, Muscidae) Sinekleri ve Taşıdığı Bazı Önemli Paraziter Hastalıklar. *Journal Kocatepe Vet.*, 9(2): 97-104. doi: 10.5578/kvj.20952
- Olafson, P. U., Kaufman, P. E., Duvallet, G., Solórzano, J. A., Taylor, D. B. y Fryxell, R. T. (2019). Frequency of *kdr* and *kdr-his* Alleles in Stable Fly (Diptera: Muscidae) Populations from the United States, Costa Rica, France, and Thailand. *Journal of Medical Entomology*, (X), 1–5. doi: 10.1093/jme/tjz012
- Olafson, P. U., Pitzer, J. B., y Kaufman, P. E. (2011). Identification of a Mutation Associated with Permethrin Resistance in the Para-Type Sodium Channel of the Stable Fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 104(1), 250–257. doi: 10.1603/EC10307
- Olafson, P. U., Aksoy, S., Attardo, G. M., Buckmeier, G., Chen, X., Coates, C. J., ... y Benoit, J. B. (2021). The genome of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, reveals potential mechanisms underlying reproduction, host interactions, and novel targets for pest control. *BMC biology*, 19(1), 1-31.

- Olesen, A. S., Lohse, L., Hansen, M. F., Boklund, A., Halasa, T., Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., Bøtner, A., y Bødker, R. (2018). Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1152–1157. doi:10.1111/tbed.12918
- Oremus, G., Guerrero, F.D., Alison, M.W. Jr, Kimball, M.M., Kim, J.H., Foil, L.D. (2006). Effects of mid-season avermectin treatments on pyrethroid resistance in horn fly (Diptera: Muscidae) populations at three locations in Louisiana. *Vet Parasitol.* 141(1-2), 156-64. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.009.
- Oyarzún, M.P., Quiroz, A., Birkett, M.A. (2008). Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med Vet Entomol.* 22(3), 188-202. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00733.x
- Parr, H. (1962). Studies on *Stomoxys calcitrans* (L.) in Uganda, East Africa. II.—Notes on life-history and behaviour. *Bulletin of Entomological Research*, 53(2), 437–443. doi: 10.1017/S0007485300048239
- Pinkus, H. (1913). The Life History and Habits of *Spalangia muscidarum* Richardson, A Parasite of the Stable Fly. *Psyche: A Journal of Entomology*, 20(5), 148–157. doi: 10.1155/1913/56729
- Pitzer, J. B., Kaufman, P. E., y Tenbroeck, S. H. (2010). Assessing Permethrin Resistance in the Stable Fly (Diptera: Muscidae) in Florida by Using Laboratory Selections and Field Evaluations. *Journal of Economic Entomology*, 103(6), 2258–2263. doi: 10.1603/EC10166
- Ramírez, L., Rodríguez, A. y Morales, A. (2016). *Memoria Institucional 2016* (ISSN: 1659-0538). Recuperado del sitio de Internet de Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria: http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/06/Revista_Alcances_Tecnologicos_2016-min.pdf
- Reissert-Oppermann, S., Bauer, B., Steuber, S., y Peter-Henning Clausen (2019). Insecticide resistance in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) on dairy farms in Germany. *Parasitol Res.*, 118(9), 2499–2507. doi: 10.1007/s00436-019-06400-z
- Rinkevich, F. D., Du, Y., Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 106, 93–100. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.02.007

- Rinkevich, F. D., Hedtke, S. M., Leichter, C. A., Harris, S. A., Su, C., Brady, S. G., ... y Scott, J. G. (2012). Multiple origins of kdr-type resistance in the house fly, *Musca domestica*. *PLoS one*, 7(12), e52761.
- Rinkevich, F. D., Zhang, L., Hamm, R. L., Brady, S. G., Lazzaro, B. P., y Scott, J. G. (2006). Frequencies of the pyrethroid resistance alleles of *Vssc1* and *CYP6D1* in house flies from the eastern United States. *Insect molecular biology*, 15(2), 157-167.
- Ruíz-Cancino, E. y Coronado-Blanco, J. (1999). *Beneficios del uso del control biológico de plagas*. doi: 10.13140/RG.2.1.1869.3848
- Salas, C. y Larraín, P. Moscas asociadas a la producción pecuaria. (julio – agosto, 2008). *Tierra Adentro*. Recuperado de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR35016.pdf>
- Salem, A., Bouhsira, E., Liénard, E., Melou, A. B., Jacquiet, P., y Franc, M. (2012). Susceptibility of two European strains of *Stomoxys calcitrans* (L.) to cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, λ -cyhalothrin, permethrin and phoxim. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10(3), 249–257. doi: hal-02645910
- Sangster, N. C. (2001). Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, 98(1–3), 89–109. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00425-3
- Sattelle, D. B., y Yamamoto, D. (1988). Molecular Targets of Pyrethroid Insecticides. *Advances in Insect Physiology*, 20, 147–213. doi: 10.1016/s0065-2806(08)60025-9
- Schleier III, J. J., y Peterson, R. K. (2011). Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. En O. Lopez y J. G. Fernandez-Bolanos (Eds.), *Green Trends in Insect Control* (pp. 94–131). doi: 10.1039/9781849732901-00094
- Schoch, C.L. et al. (2020). *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools* [Conjunto de datos] Oxford. baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=35570>
- Scholnick, S. (2016). A Stable Fly in Montgomery Co., Maryland [Fotografía]. Maryland Biodiversity Project. <https://www.marylandbiodiversity.com/record/367916>
- Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2013). Structure and function of cytochrome P450S in insect adaptation to natural and synthetic toxins: insights gained from molecular modeling. *Journal of chemical ecology*, 39, 1232-1245. Schuler, M. A., y Berenbaum, M. R. (2013). Structure and function of cytochrome P450S in insect adaptation to natural and synthetic toxins: insights gained from molecular modeling. *Journal of chemical ecology*, 39, 1232-1245.

- Scott, J. A., Plapp Jr, F. W., y Bay, D. E. (1997). Pyrethroid resistance associated with decreased biotic fitness in horn flies (Diptera: Muscidae). *Southwestern Entomologist*.
- Scott, J. G., Alefantis, T. G., Kaufman, P. E., y Rutz, D. A. (2000). Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. *Pest Management Science*, 56(2), 147–153. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200002\)56:2<147::AID-PS106>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200002)56:2<147::AID-PS106>3.0.CO;2-7)
- Scott, J.G. (2019) Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annual Review of Entomology*, 64, 243–257. Recuperado de: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-011118-112420>
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria [SEPSA] (2019). Informe de Gestión del Sector Agropecuario, Pesquero y Rural Mayo 2018 – Abril 2019. http://www.sepsa.go.cr/docs/2019-006-Informe_Gestion_SectorAgro_2018-2019.pdf
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria. (2017). Informe de gestión del sector agropecuario y de desarrollo rural (Mayo 2016 – Abril 2017) (Sepsa 2017-008). Recuperado del sitio de Internet de Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria: http://www.sepsa.go.cr/DOCS/2017-008-Inf_Gestion_Sector_Mayo2016-Abril2017.pdf
- Sharif, S., Jacquiet, P., Prevot, F., Grisez, C., Raymond-Letron, I., Semin, M.O., Geffré, A., Trumel, C., Franc, M., Bouhsira É., y Liénard, E. (2019). *Stomoxys calcitrans*, mechanical vector of virulent *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle to susceptible rabbit. *Med Vet Entomol.*, 33(2), 247-255. doi: 10.1111/mve.12356. Epub 2019 Jan 21.
- Skovgård, H., y Steenberg, T. (2002). Activity of pupal parasitoids of the stable fly *Stomoxys calcitrans* and prevalence of entomopathogenic fungi in the stable fly and the house fly *Musca domestica* in Denmark. *BioControl*, 47(1), 45–60. doi: 10.1023/A:1014434004946
- Soderlund, D. M. (1989). Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 77–96. doi: 10.1146/annurev.en.34.010189.000453
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. *Archives of Toxicology*. doi: 10.1007/s00204-011-0726-x
- Soderlund, D. M., y Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(6), 563-77. doi: 10.1016/s0965-1748(03)00023-7

- Soderlund, D.M., (2005). Sodium channels. En L. I., Gilbert, K., Latrou, Gill, S. S. (Eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier (pp. 1-24). doi: 10.1016/B0-44-451924-6/00068-5
- Solórzano, J. A. y Taylor, D. (2015). *Management of stable fly at pineapple fields and dairy in Costa Rica*. Proceedings of American Association of Veterinary Parasitologists - 60th Annual Meeting; Livestock Insect Workers' Conference - 59th Annual Meeting; International Symposium on Ectoparasites of Pets – 13th Biennial Meeting. <https://www.aavp.org/documents/2016/04/aavp-2015-annual-meeting-proceedings.pdf/>
- Solórzano, J. A., Treviño, J., Hidalgo, E., Gómez, Y., Blanco, H., Apuy, M., González, L., y Meneses, D. (2013). Manual Recomendaciones para el manejo de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* en el cultivo de piña. *Memorias Taller Manejo de rastrojos del cultivo de piña y plagas que afectan la competitividad* (pp. 1–27). Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H10-10547.pdf>
- Solórzano, J.A., Gómez, Y., y Taylor, D. (2016). *Biology of Stable Fly on tropical fruits (Pineapple, banana, and oil palm) its management strategies and impacts on national livestock*. Proceedings XXV Congreso Internacional de Entomología ICE 2016, Estados Unidos Set 2016. doi: 10.1603/ICE.2016.108894
- Solórzano, José-Arturo., Gilles, J., Bravo, O., Vargas, C., Gomez-Bonilla, Y., Bingham, G. V., y Taylor, D. B. (2015). Biology and Trapping of Stable Flies (Diptera: Muscidae) Developing in Pineapple Residues (*Ananas comosus*) in Costa Rica. *Journal of Insect Science*, 15(1), 145. doi:10.1093/jisesa/iev127
- Sömme, L. (1958). The Number of Stable Flies in Norwegian Barns, and Their Resistance to DDT. *Journal of Economic Entomology*, 51(5), 599–601. doi: 10.1093/jee/51.5.599
- Spickler, A. R. (2009). *Equine Infectious Anemia*. Center for Food Security and Public Health. Recuperado de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/equine_infectious_anemia.pdf
- Suann, M., Bogema, D. R., Chen, Y., Sarah Mansfield, S., Barchia, I. M., y Herron, G. A. (2015). A TaqMan qPCR method for detecting *kdr* resistance in *Aphis gossypii* demonstrates improved sensitivity compared to conventional PCR-RFLP. *Journal of Pest Science*, 88(4), 1-2. doi: 10.1007/s10340-015-0651-5

- Sun, H., Tong, K. P., Kasai, S., y Scott, J. G. (2016). Overcoming super-knock down resistance (super-kdr) mediated resistance: multi-halogenated benzyl pyrethroids are more toxic to super-kdr than kdr house flies. *Insect Molecular Biology*, 25(2), 126-137.
- Sun, H., Kasai, S., y Scott., J.G. (2017). Two novel house fly Vssc mutations, D600N and T929I, give rise to new insecticide resistance alleles. *Pestic. Biochem. Physiol.* 143: 116–121. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.08.013
- Tainchum, K., Shukri, S., Duvallet, G., Etienne, L., y Jacquiet, P. (2018). Phenotypic susceptibility to pyrethroids and organophosphate of wild *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) populations in southwestern France. *Parasitol Res.*, 117(12), 4027-4032. doi: 10.1007/s00436-018-6109-y. Epub 2018 Oct 15.
- Taylor, D. B., Moon, R. D., y Mark, D. R. (2012). Economic Impact of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Dairy and Beef Cattle Production. *Journal of Medical Entomology*, 49(1), 198–209. doi: 10.1603/ME10050
- Todd, D. H. (1964). The biting fly *Stomoxys calcitrans* (L.) in dairy herds in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 7(1), 60–79. doi: 10.1080/00288233.1964.10420001
- Traversa, D., Otranto D., Iorio R., Carluccio A., Contri A., Paoletti B., Bartolini R., y Giangaspero A. (2008). Identification of the intermediate hosts of *Habronema microstoma* and *Habronema muscae* under field conditions. *Med. Vet. Entomol.* 22,283-287. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00737.x
- Turell, M. J., Dohm, D. J., Geden, C. J., Hogsette, J. A., y Linthicum, K. J. (2010). Potential for Stable Flies and House Flies (Diptera: Muscidae) to Transmit Rift Valley Fever Virus 1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 26(4), 445–448. doi: 10.2987/10-6070.1
- Turell, M. J., y Knudson, G. B. (1987). Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infection and immunity*, 55(8), 1859–1861. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC260614/>
- Vargas-Chacón, C. y Solórzano, A. (2015). Biología y cría de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* L. *Alcances tecnológicos*. (ISSN-1659-0538). 11(1):05-19. 2016. doi: <https://doi.org/10.35486/at.v11i1.23>

- Vargas-Miranda, K., Troyo, A., y Calderón- Arguedas, O. (2019). Resistencia de *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) a insecticidas organofosforados y piretroides en la localidad de Orotina, Alajuela, Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 28(1), 15-24. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292019000100015&lng=en&tlng=es.
- Watson, D. W., Geden, C. J., Long, S. J., y Rutz, D. A. (1995). Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control*, 5(3), 405–411. doi: 10.1006/bcon.1995.1048
- Wickham, J. C., Chadwick, P. R., y Stewart, D. C. (1974). Factors which influence the knockdown effect of insecticide products. *Pesticide Science*, 5(5), 657-664. doi: 10.1002/ps.2780050518
- Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A. y Devonshire, A. L. (1996). Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51-60. doi: 10.1007/BF02173204
- World Health Organization. (1957). *Expert Committee on Insecticides: seventh report* (Informe 125). Recuperado del sitio de internet de Organización Mundial de la Salud: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40380>
- World Health Organization. (2016). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes*. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250677/9789241511575-eng.pdf>
- World Health Organization. (2017). *Specifications and evaluations for public health pesticides: Deltamethrin*. Recuperado de https://www.who.int/whopes/quality/Deltamethrin_eval_specs_WHO_November_2017.pdf?ua=1
- World Health Organization. (2022). *Standard operating procedure for testing insecticide susceptibility of adult mosquitoes in WHO tube tests*. Recuperado de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240043831>
- Yarmut, Y., Brommer, H., Weisler, S., Shelah, M., Komarovsky, O., y Steinman, A. (2008). Ophthalmic and cutaneous Habronemiasis in a horse: case report and review of the

literature. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 63(3), 7–10. Recuperado de http://www.ijvm.org.il/sites/default/files/yarmut_-_p87-90-volume_63_3_2008.pdf

Zumpt, F. (1973). The Stomoxyine biting flies of the world. Diptera: Muscidae. Taxonomy, biology, economic importance, and control measures. Recuperado de <https://www.biodiversitylibrary.org/page/52005565#page/303/mode/1up>

9. Anexos

Anexo 1. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas de Alajuela.

Muestra	Sexo*	Alelo**		Muestra	Sexo*	Alelo**	
		L	H			L	H
20-010	♂	+++	++	20-035	♂	++	++
20-011	♂	++	++	20-036	♂	+++	+++
20-012	♀	++	+++	20-037	♂	+	+++
20-013	♂	++	++	20-038	♂	+	++
20-014	♂	++	++	20-039	♂	++	+++
20-015	♂	+	++	20-040	♂	++	++
20-016	♂	++	+++	20-041	♂	+	++
20-017	♀	+++	+++	20-042	♂	+++	+
20-018	♂	++	++	20-043	♀	++	++
20-019	♀	++	++	20-044	♂	++	++
20-020	♀	+	++	20-045	♀	++	++
20-021	♂	++	++	20-046	♂	++	++
20-022	♀	++	++	20-047	♀	+	+++
20-023	♂	++	++	20-048	♀	++	++
20-024	♂	+++	++	20-049	♀	++	+++
20-025	♂	++	++	20-050	♀	+++	++
20-026	♂	++	+++	20-051	♀	++	++
20-027	♂	++	++	20-052	♂	++	++
20-028	♀	++	+++	20-053	♂	++	++
20-029	♂	++	+++	20-054	♂	++	+++
20-030	♂	++	+++	20-055	♂	++	++
20-031	♀	+++	+++	20-056	♂	+++	+++
20-032	♂	++	+++	20-057	♀	++	+++
20-033	♀	+++	+++	20-058	♀	++	++
20-034	♀	+++	++	20-059	♂	+++	+++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 2. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas de Puntarenas.

Muestra	Sexo*	Alelo**		Muestra	Sexo*	Alelo**	
		L	H			L	H
19-483	♀	++	+++	19-508	♀	++	++
19-484	♂	++	+++	19-509	♀	++	++
19-485	♀	++	+++	19-510	♀	+++	+++
19-486	♀	++	++	19-511	♀	++	+++
19-487	♀	+++	+++	19-512	♀	++	+++
19-488	♀	++	++	19-513	♀	++	+++
19-489	♀	++	+++	19-514	♂	++	++
19-490	♀	+	++	19-515	♂	++	+++
19-491	♂	+	++	19-516	♂	++	++
19-492	♀	++	+++	19-517	♀	+++	+++
19-493	♀	+	++	19-518	♀	+++	+++
19-494	♀	-	+	19-521	♀	+	+++
19-495	♀	++	+++	19-528	♀	+	++
19-496	♀	+	++	19-530	♀	+	+++
19-497	♀	++	+++	19-531	♂	++	+++
19-498	♀	++	++	21-199	♀	++	++
19-499	♀	++	+++	21-200	♀	++	+++
19-500	♀	++	+++	21-201	♀	++	+++
19-501	♂	++	++	21-202	♂	+++	+++
19-502	♂	++	++	21-203	♀	+++	+++
19-503	♀	++	++	21-204	♂	+++	+++
19-504	♀	++	+++	21-205	♀	+++	+++
19-505	♀	+	++	21-206	♀	++	+++
19-506	♀	++	+++	21-207	♂	+++	+++
19-507	♂	+	+	21-208	♀	+++	+++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 3. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas de Limón.

Muestra	Sexo*	Alelo**		Muestra	Sexo*	Alelo**	
		L	H			L	H
19-411	♂	++	+	19-436	♀	++	+
19-412	♂	+++	++	19-437	♂	++	-
19-413	♂	+++	+	19-438	♂	++	+
19-414	♂	+++	-	19-439	♂	++	+
19-415	♂	+++	-	19-440	♂	++	+
19-416	♂	+++	+++	19-441	♂	++	+++
19-417	♂	+++	-	19-442	♂	++	+
19-418	♂	+++	+++	19-443	♂	++	-
19-419	♂	+++	-	19-444	♂	++	+
19-420	♂	+++	-	19-445	♂	++	-
19-421	♂	+++	+	19-446	♂	++	++
19-422	♂	+++	+	19-447	♂	+++	+++
19-423	♂	++	+	19-448	♀	++	-
19-424	♂	++	+	19-449	♂	++	-
19-425	♂	+++	+++	19-450	♂	++	-
19-426	♂	+++	++	19-451	♂	+++	-
19-427	♂	-	+++	19-452	♂	+	-
19-428	♂	++	+	19-453	♂	++	-
19-429	♂	++	+++	19-454	♂	++	-
19-430	♂	++	+	19-455	♂	++	-
19-431	♂	++	+	19-456	♂	++	+
19-432	♀	+++	+	19-457	♂	++	+
19-433	♂	++	+	19-458	♂	++	+
19-434	♂	+++	++	19-459	♀	++	++
19-435	♂	+++	+	19-460	♂	++	+

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 4. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas de Heredia.

Muestra	Sexo*	Alelo**		Muestra	Sexo*	Alelo**	
		L	H			L	H
21-119	♀	++	+++	21-149	♂	+++	+++
21-120	♀	+	+++	21-150	♀	+++	+++
21-121	♀	+++	+++	21-151	♂	+++	++
21-122	♂	+++	+++	21-152	♀	+++	+++
21-124	♀	+++	+++	21-153	♂	+++	+++
21-125	♂	+++	+++	21-154	♀	+	++
21-126	♂	+++	+++	21-155	♀	++	+++
21-127	♂	+	+++	21-156	♀	++	+++
21-128	♀	+++	+++	21-157	♂	++	+++
21-129	♂	+++	++	21-158	♀	++	+++
21-130	♀	+++	+++	21-159	♂	++	+++
21-131	♀	+++	+++	21-160	♂	++	++
21-132	♂	+++	+++	21-161	♀	++	++
21-133	♂	+++	+++	21-162	♂	++	++
21-134	♀	+++	+++	21-163	♂	++	++
21-135	♂	++	+++	21-164	♂	++	++
21-136	♀	+++	+++	21-165	♂	++	++
21-137	♂	+++	+++	21-166	♂	++	++
21-138	♀	+++	+++	21-167	♀	-	++
21-139	♀	+++	+++	21-168	♀	+++	+++
21-140	♀	+++	+++	21-169	♀	+++	+++
21-142	♂	+++	+++	21-170	♀	+++	++
21-145	♀	++	++	21-171	♀	+++	++
21-146	♀	+++	+++	21-172	♂	++	+++
21-148	♀	+++	+++	21-173	♀	+++	+++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 5. Mortalidad en adultos de *S. calcitrans* L. expuestos a permetrina.

Año	Dosis	n	Sexo*		Individuos muertos	Mortalidad promedio (%)		Estado de susceptibilidad***
			♂	♀		Observada	Corregida**	
2020	Control	59	35	24	0	0.00	-	-
	1X	36	18	18	21	58.33	-	Resistencia confirmada
	30X	49	18	31	49	100.00	-	Resistencia moderada
2021	Control	113	84	29	12	10.62	0.00	-
	1X	118	65	53	65	55.08	49.75	Resistencia confirmada
	30X	156	84	72	156	100.00	100.00	Resistencia moderada

*♂: macho, ♀: hembra. **Se corrigió la mortalidad cuando la mortalidad observada en el control fue $\geq 5\%$ y $\leq 20\%$ (Abbott, 1925). ***Según los rangos de mortalidad establecidos por la WHO (2016).

Anexo 6. Mortalidad en adultos de *S. calcitrans* L. expuestos a deltametrina.

Año	Dosis	n	Sexo*		Individuos muertos	Mortalidad promedio (%)		Estado de susceptibilidad***
			♂	♀		Observada	Corregida**	
2020	Control	44	28	16	4	9.09	0.00	-
	1X	38	23	15	38	100.00	100.00	Susceptible
	30X	39	21	18	39	100.00	100.00	-
2021	Control	177	106	71	12	6.78	0.00	-
	1X	144	86	58	144	100.00	100.00	Susceptible
	30X	83	57	26	83	100.00	100.00	-

*♂: macho, ♀: hembra. **Se corrigió la mortalidad cuando la mortalidad observada en el control fue $\geq 5\%$ y $\leq 20\%$ (Abbott, 1925). ***Según los rangos de mortalidad establecidos por la WHO (2016).

Anexo 7. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas sobrevivientes a la exposición de la dosis 1X de permetrina.

Año	Muestra	Sexo*	Alelo**	
			L	H
2020	21-073	♂	+++	+++
	21-076	♀	+++	+++
	21-077	♀	+++	+++
	21-078	♀	+++	+++
2021	21-759	♂	+++	++
	21-760	♀	+++	++
	21-761	♂	++	++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 8. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas no sobrevivientes a la exposición de permetrina.

Año	Dosis	Muestra	Sexo*	Alelo**	
				L	H
2020	Control	21-064	♀	+++	++
		21-065	♀	+++	++
		21-067	♀	+++	++
		21-068	♂	+++	-
		21-217	♂	++	+++
	1X	21-069	♂	-	+++
		21-070	♂	+++	+++
		21-071	♀	++	+++
		21-072	♀	++	+++
		21-074	♀	++	+++
	30X	21-081	♂	+++	++
		21-084	♀	+++	++
		21-085	♂	++	++
		21-088	♀	++	++
		21-218	♂	++	++
2021	Control	21-749	♀	+++	+
		21-750	♂	++	++
		21-751	♂	+++	-
		21-752	♂	++	++
		21-755	♂	+++	+
	1X	21-762	♂	+++	+++
		21-763	♀	++	+
		21-764	♀	-	+++
		21-765	♀	++	-
		21-767	♂	+	++ +
	30X	21-769	♀	+++	++
		21-770	♂	+++	+++
		21-771	♂	+++	+++
		21-772	♀	++	+++
		21-773	♂	++	++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.

Anexo 9. Resultados de PCR de la presencia del alelo silvestre (L, leucina) y alelo mutado *kdr-his* (H, histidina) en moscas no sobrevivientes a la exposición de deltametrina.

Año	Dosis	Muestra	Sexo*	Alelo**	
				L	H
2020	Control	21-089	♀	+++	++
		21-092	♂	+++	+++
		21-093	♂	++	+++
		21-097	♀	-	+++
		21-098	♂	++	++
	1X	21-100	♀	++	-
		21-101	♂	++	++
		21-102	♀	+++	+
		21-103	♂	++	+
		21-104	♀	++	+
	30X	21-109	♀	++	+
		21-113	♂	+++	+
		21-114	♀	+++	+
		21-117	♀	+++	+
		21-118	♀	+++	+++
2021	Control	21-774	♀	++	++
		21-777	♀	++	-
		21-778	♀	++	++
		21-789	♂	-	++
		21-790	♂	+++	++
	1X	21-779	♀	+++	++
		21-781	♂	+++	++
		21-782	♀	+++	++
		21-783	♂	+	++
		21-793	♀	-	+++
	30X	21-784	♂	+	++
		21-785	♂	++	++
		21-786	♂	+++	++
		21-787	♂	+++	++
		21-788	♀	+	++

*♂: macho, ♀: hembra. **Amplificación: (+) leve, (++) moderada, (+++) fuerte, (-) sin amplificación.