



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca
Subdirección de Posgrado e Investigación
Maestría en Producción Pecuaria Tropical

TESIS

**Uso de microorganismos benéficos para el control de garrapatas
análisis in vitro e in situ**

PRESENTA

Adara Patricia Molar Guerrero

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Karla Lissette Silva Martínez

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Armando Arrieta González

REVISORA

Dra. Erika Andrea Hernández

TANTOYUCA, VERACRUZ.

JUNIO DEL 2025

DEDICATORIA

A mis padres,

por ser mi pilar más firme, por su amor incondicional, sus sacrificios silenciosos y su fe constante en cada uno de mis pasos. Gracias por enseñarme, no solo con palabras, sino con el ejemplo, el valor del esfuerzo, la humildad y la perseverancia.

A mi hermano,

compañero de vida y confidente. Tu apoyo, tus palabras de aliento y tu presencia han sido una fuente invaluable de motivación en los momentos más exigentes de este camino.

A mis abuelos,

por sus enseñanzas, su sabiduría y su cariño inagotable. Su ejemplo de vida ha dejado huellas profundas que me inspiran a ser mejor cada día.

En especial a mi querido abuelito Gabriel Molar,

por ser un apoyo inquebrantable en cada etapa de mi vida. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por sus palabras sabias, su aliento constante y por acompañarme con su amor y confianza incondicional. Tu fe en mí ha sido una fuerza silenciosa pero poderosa, y este logro es también fruto de todo lo que me has enseñado con tu ejemplo y tu cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis padres y familia, por su amor, apoyo incondicional y confianza en cada etapa de este proceso.

A mi asesora de tesis Dra. Karla Silva, por su guía, conocimientos compartidos y valiosas observaciones que enriquecieron esta investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el valioso apoyo brindado a través de la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto. Su respaldo fue fundamental para la realización de esta investigación, permitiéndome contar con los recursos necesarios para avanzar en el estudio y alcanzar los objetivos propuestos.

A mis amigos, por su compañía, consejos y momentos compartidos que hicieron más llevadero este camino.

Al Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, por brindarme los espacios para desarrollar este proyecto.

RESUMEN

Rhipicephalus microplus es una garrapata de importancia veterinaria que causa considerables pérdidas económicas en la ganadería tropical debido a su acción hematófaga y su papel como vector de hemoparásitos. El uso prolongado de acaricidas ha generado cepas resistentes, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas biológicas sostenibles. Entre estas, los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* destacan por su eficacia contra artrópodos plaga y su bajo impacto ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia *in vitro* e *in situ* de un aislado nativo de *B. bassiana* sobre hembras teleóginas de *R. microplus* y confirmar su identidad taxonómica mediante análisis filogenético multilocus. Se aplicaron dos tratamientos consistentes en la inmersión de garrapatas en 5 mL y 10 mL de una suspensión conidial (1×10^8 conidios/mL), incluyendo un grupo testigo. La infección fúngica se determinó por la presencia de micelio en los cadáveres. Además, se extrajo ADN del aislado fúngico y se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS, RPB1 y TEF1- α . Las secuencias se analizaron mediante inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. Los resultados mostraron un porcentaje de infección del 64.1 % y 71.8 % en los tratamientos con 5 mL y 10 mL, respectivamente, mientras que el grupo control no presentó signos de infección. El análisis molecular confirmó la identidad del aislado como *B. bassiana*, con alta similitud respecto a cepas tipo previamente reportadas. Estos hallazgos confirman el potencial de este aislado nativo como agente de control biológico contra *R. microplus*, y respaldan su posible incorporación en estrategias de manejo integrado de plagas para sistemas ganaderos tropicales.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Rhipicephalus microplus*, control biológico, filogenia, hongos entomopatógenos.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is a tick of veterinary importance that causes considerable economic losses in tropical cattle farming due to its hematophagous activity and its role as a vector of hemoparasites. The prolonged use of acaricides has led to the emergence of resistant strains, prompting the search for sustainable biological alternatives. Among these, entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* stand out for their efficacy against arthropod pests and low environmental impact. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* and *in situ* efficacy of a native *B. bassiana* isolate against engorged females of *R. microplus* and to confirm its taxonomic identity through multilocus phylogenetic analysis. Two treatments were applied by immersing the ticks in 5 mL and 10 mL of a conidial suspension (1×10^8 conidia/mL), including an untreated control group. Fungal infection was determined by the presence of mycelium on the cadavers. In addition, DNA was extracted from the fungal isolate, and the ITS, RPB1, and TEF1- α regions were amplified and sequenced. The sequences were analyzed using Bayesian inference and maximum likelihood methods. The results showed infection rates of 64.1% and 71.8% in the treatments with 5 mL and 10 mL, respectively, while the control group showed no signs of infection. Molecular analysis confirmed the identity of the isolate as *B. bassiana*, with high similarity to previously reported type strains. These findings confirm the potential of this native isolate as a biological control agent against *R. microplus* and support its possible incorporation into integrated pest management strategies for tropical livestock systems.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Rhipicephalus microplus*, biological control, phylogeny, entomopathogenic fungi.

ÍNDICE

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
<u>RESUMEN</u>	IV
<u>ABSTRACT</u>	V
<u>1. Introducción</u>	1
<u>2. Objetivos</u>	2
<u>2.1 General</u>	2
<u>2.2 Específicos</u>	2
<u>3. Hipótesis</u>	2
<u>4. Marco teórico</u>	3
<u>4.1 Antecedentes</u>	3
<u>4.2 Estado del arte</u>	3
<u>5. Metodología</u>	4
<u>5.1 Área y periodo de estudio</u>	4
<u>5.2 Descripción de los tratamientos</u>	4
<u>5.3 Variables de estudio</u>	4
<u>5.4 Descripción y manejo del objeto de estudio</u>	4
<u>5.5 Diseño experimental y análisis estadístico</u>	4
<u>6. Resultados y discusión</u>	5
<u>7. Conclusiones</u>	6
<u>8. Recomendaciones</u>	7
<u>9. Literatura citada</u>	8
<u>ANEXOS</u>	9

ÍNDICE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Cepa de <i>Beauveria</i> spp	23
2	Cámara húmeda donde se colocaron las muestras	24
3	División de parcelas en campo	26
4	Filogenia de cepas de <i>Beauveria</i> construida mediante análisis filogenético	33

ÍNDICE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Descripción de los tratamientos	24
2	Presencia o ausencia de micelio en hembras teleóginas de <i>R. microplus</i> tratadas con <i>B. bassiana</i>	30

1. Introducción

La ganadería bovina constituye una de las actividades agropecuarias más relevantes en México, tanto por su contribución a la seguridad alimentaria como por su impacto en el desarrollo económico y social de las regiones rurales. En particular, el trópico mexicano que abarca zonas de clima cálido-húmedo como el estado de Veracruz ofrece condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de sistemas de producción de doble propósito, caracterizados por la generación simultánea de carne y leche bajo esquemas extensivos o semi-intensivos (Rojo-Rubio et al., 2009). Esta actividad representa una fuente de ingresos para millones de pequeños y medianos productores, y se estima que más del 60 % del hato nacional se localiza en regiones tropicales (Rojas-Sandoval et al., 2024). Este sector no solo provee alimentos como carne y leche, sino que también genera empleos y fortalece las cadenas productivas locales. No obstante, enfrenta desafíos sanitarios importantes, principalmente aquellos asociados con las enfermedades transmitidas por ectoparásitos como las garrapatas, que afectan la salud y productividad del hato bovino, con consecuencias económicas y sociales significativas para los productores (Rodríguez-Vivas et al., 2018).

Las garrapatas, además del daño físico que provocan al alimentarse de la sangre del ganado, actúan como vectores de enfermedades graves como la babesiosis y la anaplasmosis. Estas patologías ocasionan pérdida de peso, disminución en la producción de leche y, en casos severos, la muerte del animal (Guglielmone et al., 2014). El control tradicional de estos ectoparásitos se ha basado principalmente en el uso de acaricidas químicos. Sin embargo, su uso intensivo ha dado lugar a la aparición de cepas resistentes de *Rhipicephalus microplus*, lo que eleva los costos de producción, reduce la eficacia del tratamiento y genera riesgos de contaminación ambiental (García-Ponce et al., 2025; George et al., 2004).

Frente a esta problemática, los hongos entomopatógenos han emergido como alternativas biológicas viables y sostenibles. Entre ellos, *Beauveria bassiana* destaca por su capacidad para infectar diversas especies de ectoparásitos sin afectar a organismos no objetivo ni al medio ambiente (Alonso-Díaz y Fernández-Salas, 2021). Este enfoque se alinea con los principios del manejo integrado de plagas (MIP), al permitir la incorporación de agentes de control biológico dentro de estrategias más amplias y sostenibles.

El trópico de Veracruz se ha identificado como una zona prioritaria para la implementación de estas estrategias, debido a su relevancia en la producción nacional de carne y leche bovina, y a la alta incidencia de infestaciones por *R. microplus* (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI],

2020; Lucero et al., 2024). Además, factores como el cambio climático, el deterioro de los suelos y el sobrepastoreo han incrementado la vulnerabilidad de los sistemas productivos en la región.

Estudios realizados en esta zona han demostrado que la aplicación de *B. bassiana* puede reducir significativamente las poblaciones de garrapatas en condiciones de campo, especialmente cuando se combina con otras prácticas de manejo, como la rotación de potreros y la selección de razas bovinas con mayor resistencia a ectoparásitos (Lucero et al., 2024). Este enfoque integrado contribuye a disminuir la dependencia de productos químicos y promueve la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas ganaderos.

Sin embargo, para garantizar la eficacia y seguridad de los bioinsumos basados en *B. bassiana*, es indispensable contar con una identificación taxonómica precisa de los aislados fúngicos, así como con evidencia experimental que respalde su virulencia y adaptación a las condiciones ambientales locales. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia *in vitro* de un aislado nativo de *B. bassiana* contra hembras teleóginas de *R. microplus* y confirmar su identidad mediante análisis filogenético multilocus. Los resultados de esta investigación contribuirán a sentar las bases para el desarrollo de estrategias de control biológico adaptadas al trópico de Veracruz, con miras a una ganadería más sostenible, rentable y ambientalmente responsable.

2. Objetivos

2.1 General

Evaluar la eficacia *in vitro* e *in situ* de un aislado nativo de *Beauveria* sobre hembras teleóginas de *Rhipicephalus microplus* y confirmar su identidad taxonómica mediante análisis filogenético multilocus, con el fin de valorar su potencial como agente de control biológico en programas de manejo integrado de plagas en la ganadería bovina del trópico mexicano.

2.2 Específicos

- Determinar la incidencia de infección causada por un aislado nativo de *Beauveria* en hembras teleóginas de *Rhipicephalus microplus* mediante ensayos de inmersión *in vitro*.
- Comparar la eficacia de dos volúmenes de aplicación (5 mL y 10 mL) de una suspensión conidial de *B. bassiana* sobre la mortalidad y presencia de micelio en los especímenes tratados.

- Analizar filogenéticamente las secuencias obtenidas mediante métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud para confirmar la identidad del aislado dentro del género *Beauveria*.

3. Hipótesis

El aislado nativo de *Beauveria* es eficaz contra hembras teleóginas de *Rhipicephalus microplus* y presenta una identidad taxonómica que lo ubica dentro del género *Beauveria*, lo cual respalda su potencial uso como agente de control biológico en programas de manejo integrado de plagas en la ganadería bovina del trópico mexicano.

3.1 Hipótesis nula (H₀)

El uso del hongo entomopatógeno *Beauveria* no tiene efecto significativo sobre la mortalidad o disminución de poblaciones de garrapatas (en estadio de teleoginas o larvas) presentes en ganado bovino o en pasto Bermuda costero en Tantoyuca, Veracruz.

3.2 Hipótesis alternativa (H₁)

El uso del hongo entomopatógeno *Beauveria* tiene un efecto significativo en la mortalidad o disminución de poblaciones de garrapatas (en estadio de teleoginas o larvas) presentes en ganado bovino o en pasto Bermuda costero en Tantoyuca, Veracruz.

4. Marco teórico

4.1 Garrapatas: Biología y ciclo de vida

Las garrapatas están consideradas entre los artrópodos hematófagos más relevantes a nivel mundial, siendo ectoparásitos hematófagos obligados que infestan al 80% del ganado bovino en todo el mundo (Oteo., 2016; Yean et al., 2025). Las garrapatas actúan como vectores obligados hematófagos de múltiples patógenos capaces de causar enfermedades graves e incluso la muerte en seres humanos, animales domésticos y fauna silvestre. Estas poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas especializadas tales como receptores químicos para localizar al hospedador, piezas bucales reforzadas para penetrar la piel y sistemas digestivos eficientes que les permiten adherirse, alimentarse de sangre, reproducirse y sobrevivir en diferentes entornos climáticos, completando exitosamente su ciclo biológico (Anderson y Magnarelli, 2008)

Las garrapatas son reconocidas como ectoparásitos obligados hematófagos que representan una de las amenazas más importantes para la ganadería bovina a nivel mundial. Se estima que aproximadamente el 80 % del ganado mundial está sometido al riesgo de infestación por garrapatas y las enfermedades que transmiten, con pérdidas económicas anuales estimadas entre 22,000 y 30,000 millones de dólares (Lew-Tabor y Rodriguez, 2016; Tabor et al., 2017).

Entre estas especies, *Rhipicephalus microplus* es considerada el ectoparásito de mayor importancia económica para la producción bovina, especialmente en regiones neotropicales, debido a su capacidad para disminuir el aumento de peso corporal, la producción de carne y leche, y la calidad del cuero (Lagunes-Quintanilla et al., 2024).

La garrapata común del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es un ectoparásito hematófago de gran importancia en la ganadería tropical y subtropical. Su ciclo biológico se divide en dos fases: una parasitaria, que ocurre sobre el huésped, y una no parasitaria, que transcurre en el ambiente.

Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae), comúnmente conocida como la "garrapata del ganado bovino", debe su nombre a que este animal es su principal hospedador. Este ácaro representa un problema significativo en la ganadería, debido a los graves efectos que tiene tanto en la salud del ganado como en la economía de las regiones tropicales y subtropicales (Rodríguez-Vivas et al., 2014). En México, *Rhipicephalus microplus* mantiene una distribución geográfica cercana al 69 % del territorio nacional, siendo regiones como la península de Yucatán especialmente proclives a su desarrollo debido a sus condiciones ambientales favorables (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2024; Pérez-Martínez et al., 2023; Cruz-González et al., 2024).

4.2 Impacto de *Rhipicephalus microplus* en la ganadería bovina

En numerosos países, la agricultura y la ganadería constituyen actividades económicas esenciales. No obstante, la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* representa una seria amenaza para los sistemas de producción pecuaria, generando considerables pérdidas económicas. Aunque el control químico mediante ixodicidas es el método más utilizado, su uso conlleva diversos problemas, como la contaminación del medio ambiente, riesgos sanitarios para humanos y animales, y la aparición de cepas de garrapatas resistentes (García-Ponce et al., 2025).

En países con alta actividad ganadera como México y Brasil, las pérdidas económicas ocasionadas por infestaciones de *Rhipicephalus microplus* han sido significativas, estimándose en 573.61 millones de dólares y 3,240 millones de dólares anuales, respectivamente (Rodríguez-Vivas et al., 2017; Grisi et al., 2014). Estas cifras reflejan el severo impacto económico de esta plaga.

En 2017 Rodríguez-Vivas et al. (2017), calcularon las pérdidas económicas anuales causadas por parásitos en el ganado bovino en México. Para ello, consideraron factores como el número total de animales expuestos, los efectos negativos del parasitismo sobre la producción de leche y la ganancia de peso, así como los registros de decomisos de subproductos ganaderos. Las estimaciones, expresadas en dólares estadounidenses (US\$), se basaron en los datos de pérdidas de productividad en animales sin tratamiento antiparasitario. Evaluaron el impacto económico de seis parásitos o grupos de parásitos: los nematodos gastrointestinales generaron pérdidas de aproximadamente 445.10 millones de dólares; *Eimeria* spp.(coccidias), 23.78 millones; *Fasciola hepatica* (duela hepática), 130.91 millones; *Rhipicephalus microplus* (garrapata del ganado), 573.61 millones; *Haematobia irritans* (mosca de los cuernos), 231.67 millones; y *Stomoxys calcitrans* (mosca del establo), 6.79 millones. En conjunto, las pérdidas anuales se estimaron en 1.41 mil millones de dólares. Considerando un hato nacional de 32.4 millones de bovinos en 2013, esto equivale a una pérdida aproximada de 43.57 dólares por animal. Aunque se reconocen ciertas limitaciones en los estudios de base, especialmente al extrapolar datos locales a nivel nacional, los resultados ilustran claramente la magnitud del impacto del parasitismo en la ganadería mexicana y subrayan la necesidad de implementar estrategias integradas y sostenibles para su control.

4.3 Estrategias de control de garrapatas

El control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de acaricidas químicos, basados principalmente en organofosforados y los piretroides sirviendo como herramientas principales para el control de las garrapatas debido a su eficacia para reducir las infestaciones y prevenir las enfermedades transmitidas por garrapatas (De Meneghi et al., 2016; Hall-Mendelin et al., 2011),

que en las últimas décadas han jugado un papel crucial en la sostenibilidad de la producción ganadera (Alonso-Díaz et al., 2014). Pese a décadas de este tipo de control, la garrapata del ganado *R. microplus* continúa representando un obstáculo significativo para los productores pecuarios, jugando un papel crucial en la sostenibilidad de la producción ganadera.

Parásitos con resistencia o multirresistencia, así como el uso inadecuado de medicamentos antiparasitarios, han reducido la eficacia de estos tratamientos (Alonso-Díaz et al., 2014). En la actualidad, se ha evidenciado a nivel global que los métodos de control basados exclusivamente en la aplicación intensiva de productos químicos no son sostenibles a largo plazo. La expansión constante de estas problemáticas impacta negativamente a diversos sectores, incluyendo la industria farmacéutica, profesionales del campo veterinario, productores agropecuarios y responsables de la salud pública.

Los acaricidas se agrupan de acuerdo con sus mecanismos de acción, que incluyen desde compuestos neurotóxicos, como los organofosforados, piretroides y fenilpirazoles, hasta inhibidores del crecimiento y bloqueadores de la síntesis de quitina (Abbas et al., 2014). Un método común para la aplicación de acaricidas es la inmersión del ganado en una solución que contiene el compuesto, lo cual permite una cobertura completa del cuerpo del animal, incluyendo zonas de difícil acceso (Moyo y Masika, 2009). Otro método de aplicación, la pulverización la cual se emplea comúnmente como alternativa cuando la inmersión no es viable, permitiendo tratar animales individualmente mediante equipos manuales o motorizados. Aunque es un método eficaz, su efectividad puede verse comprometida por una aplicación desigual en animales agrupados y por diluciones incorrectas del producto, lo que puede favorecer el desarrollo de resistencia (Makwarela et al., 2025; Wale y Tadesse, 2021; Mbatidd et al., 2021; Allan et al., 2021).

Ante este escenario, se están diseñando e integrando nuevas estrategias de control dentro de programas de manejo integrado de garrapatas (Hüe y Fontfreyde, 2019).

Debido a que las garrapatas de la familia Ixodidae permanecen la mayor parte de su ciclo biológico en el suelo y la hojarasca durante sus etapas inmaduras, se consideran particularmente vulnerables a la regulación natural por parte de depredadores edáficos. Este mecanismo natural de control biológico, basado en la depredación ejercida por otros invertebrados del suelo, representa una alternativa ecológica para el manejo de poblaciones de garrapatas. Sin embargo, su estudio ha sido limitado debido a dificultades metodológicas para identificar qué especies ejercen esta presión predatoria. Un avance importante en este campo se logró mediante el desarrollo de un método innovador para marcar ninfas vivas de *Ixodes ricinus* con isótopo de nitrógeno 15 (^{15}N). Este marcaje permitió identificar depredadores específicos durante un experimento de microcosmos de ocho días. Los resultados mostraron que, aunque solo un 4.1% de los depredadores generalistas del suelo consumieron ninfas, se detectó una señal clara del isótopo ^{15}N en cinco especies predatorias: dos arañas (*Pachygnatha listeri* y *Ozyptila* sp.), dos ácaros gamásidos (*Pergamasus*

beklemischevi y *P. quisquiliarum*) y un escarabajo estafilínido (*Geostiba circellaris*). Estos hallazgos subrayan el potencial del control biológico por medio de predadores naturales del suelo como una estrategia complementaria al uso de acaricidas o entomopatógenos. Además, el uso de técnicas como el etiquetado isotópico ofrece nuevas posibilidades para estudiar las interacciones ecológicas que regulan las poblaciones de garrapatas y fortalecer el enfoque del manejo integrado de parásitos en sistemas ganaderos sostenibles (Vinogradov et al., 2024).

Estudios recientes han evidenciado que la hormiga *Lasius alienus* depreda activamente los huevos de garrapatas, y se ha observado que la presencia de la cera que recubre los huevos desempeña un papel determinante en la tasa de depredación (Kar et al. 2022). Asimismo, ciertas aves como los picabueyes (*Buphagus* spp.) participan en la reducción de poblaciones de garrapatas al alimentarse de estos ectoparásitos sobre grandes mamíferos; no obstante, su eficacia depende de la presencia constante de hospedadores y de condiciones ambientales favorables (Diplock et al., 2018). Por otro lado, las avispas parasitoides, en particular *Ixodiphagus hookeri*, representan un mecanismo de control biológico indirecto, ya que depositan sus huevos en el interior de las garrapatas, y sus larvas se desarrollan alimentándose del huésped hasta provocar su muerte, afectando especialmente a especies como *Amblyomma variegatum* (Ramos et al., 2023; Makwarela et al., 2025).

Si bien estos hallazgos aún requieren validación en condiciones de campo, sugieren una vía complementaria al uso de hongos entomopatógenos y acaricidas en los programas integrados de manejo de garrapatas. La incorporación de enfoques ecológicos que favorezcan la conservación y promoción de enemigos naturales en los sistemas ganaderos puede contribuir a una estrategia más sostenible y de menor impacto ambiental en el control de *Rhipicephalus microplus*.

4.4 Hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol

La creciente presencia de cepas de garrapatas multirresistentes a los acaricidas químicos más comunes, así como los efectos negativos de estos productos sobre el ambiente, han impulsado la búsqueda de métodos alternativos de control. Entre las opciones más prometedoras se encuentra el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico (Alonso-Díaz y Fernández-Salas, 2021).

El uso de hongos entomopatógenos se ha consolidado como una de las estrategias más prometedoras en el control biológico de garrapatas, especialmente de *Rhipicephalus microplus*. Especies como *Metarhizium anisopliae sensu lato* y *Beauveria bassiana sensu lato* han demostrado eficacia tanto en condiciones de laboratorio como de campo, siendo objeto de múltiples investigaciones enfocadas en su capacidad para infectar diversos estadios del parásito. En México, se ha observado que estos hongos pueden afectar tanto cepas susceptibles como multirresistentes,

con resultados alentadores en pasturas y directamente sobre el ganado. No obstante, aún son necesarias más evaluaciones contra otras especies relevantes como *Amblyomma mixtum* y *R. annulatus*, especialmente considerando las particularidades ecológicas y climáticas de cada región (Alonso-Díaz y Fernández-Salas, 2021).

Diversas aplicaciones de productos comerciales basados en *B. bassiana* y *M. anisopliae* han sido evaluadas en entornos residenciales, mostrando reducciones importantes en la población de ninfas de *Ixodes scapularis*. Por ejemplo, la aplicación de *M. anisopliae* cepa F52 logró disminuir la abundancia de garrapatas en áreas de césped y bosques hasta en un 85%. Estos resultados respaldan su potencial como alternativa viable en entornos naturales y productivos, aunque con variaciones dependiendo del sustrato, formulación utilizada y condiciones ambientales (Stafford y Allan, 2010).

Sin embargo, uno de los principales desafíos para el éxito del control biológico con hongos entomopatógenos es la influencia del ambiente sobre su desempeño. Factores como la temperatura, la humedad y la exposición a radiación ultravioleta pueden afectar la viabilidad, infectividad y virulencia de los conidios, lo que repercute directamente en su eficacia. Estas condiciones, especialmente en hábitats epigeos e hipogeos, pueden inducir el agotamiento o inactivación del inóculo. Ante ello, se subraya la importancia de seleccionar cepas nativas o ambientalmente competentes, capaces de mantener su eficacia bajo las condiciones específicas del entorno en el que serán aplicadas (Quesada-Moraga et al., 2024; Alfaro-Álvarez et al., 2024).

Para lograr una implementación exitosa del control biológico con *Beauveria bassiana*, es fundamental incorporar un enfoque transdisciplinario basado en herramientas de biología molecular (genómica, transcriptómica y proteómica), con el fin de descifrar los mecanismos de virulencia y patogenicidad de las cepas usadas. Estudios recientes han utilizado estas tecnologías para identificar genes asociados a adhesión, penetración de cutícula, remodelación de la pared celular y respuesta al estrés en cepas contrastantes de virulencia (Sessa et al., 2024)

Adicionalmente, el desarrollo de formulaciones estables, como emulsiones oleosas que proporcionan protección contra la radiación UV, daños físicos y desecación, es crucial para asegurar la persistencia del inóculo en campo. Investigaciones han demostrado que formulaciones con aceites como el de soja o aguacate pueden prolongar la viabilidad de los conidios, incluso bajo exposición solar intensa (Aquino-Bolaños et al., 2023; Behle et al., 2009; Lei et al., 2022).

4.5 *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*: Mecanismos y eficacia

Los hongos patógenos de artrópodos, como *M. anisopliae*, destacan entre los microorganismos con alto potencial para ser empleados como agentes de control biológico, ya sea de forma individual o en combinación con otros insumos, como los acaricidas químicos. Diversas investigaciones han

abordado su aplicación en el manejo de garrapatas en ganado bovino, posicionando a *M. anisopliae* como una de las alternativas más estudiadas y con mayor viabilidad para lograr un control efectivo de estos ectoparásitos (Mehmood et al., 2025). El hongo *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipitaceae), reconocido como agente de control biológico, fue inicialmente aislado por el microbiólogo ruso Metschnikoff en 1879 a partir de una plaga de cereales, y posteriormente clasificado por Sorokin en 1883 (Metschnikoff, 1879). Su aplicación original se dirigió al manejo del escarabajo *Anisoplia austriaca*. Actualmente, este organismo se considera uno de los hongos entomopatógenos mejor estudiados y ha sido implementado en diversos programas de control biológico alrededor del mundo. *M. anisopliae* presenta una amplia distribución natural, siendo comúnmente localizado en suelos, rizosferas, raíces vegetales, así como en restos de artrópodos, adoptando estilos de vida saprofiticos, endofíticos o patógenos según las condiciones ambientales (Leger, 2008; Beys-da-Silva et al., 2020).

El proceso de desarrollo de *M. anisopliae* dentro de su huésped sigue una secuencia bien definida de eventos patogénicos. Inicialmente, el hongo identifica al organismo susceptible, seguido por la adhesión y germinación de las conidias sobre la superficie cuticular. Posteriormente, se forman estructuras especializadas como el tubo germinativo y el apresorio, que facilitan la penetración a través de la cutícula del huésped. Una vez en el interior, el micelio se desarrolla activamente, provocando la muerte del organismo. Luego, las hifas emergen al exterior y generan nuevas conidias, las cuales pueden reiniciar el ciclo infeccioso en otros hospedadores. Este patrón de infección está ampliamente conservado en la naturaleza y comparte similitudes estructurales y moleculares con otros hongos filamentosos patógenos de plantas, como la formación de estructuras de penetración especializadas (Shah y Pell, 2003; Schrank y Vainstein, 2010; Beys-da-Silva et al., 2014; Beys-da-Silva et al., 2020).

La cutícula del artrópodo funciona como la principal barrera física frente a la infección por hongos entomopatógenos. Esta estructura se organiza en dos capas principales: la epicutícula, formada por lípidos y ceras hidrofóbicas que inhiben la adherencia y germinación del patógeno, y la procutícula, ubicada debajo y formada sobre todo por quitina y proteínas estructurales, que representa la mayor parte del espesor de la cutícula. Las enzimas fúngicas, como quinasas, proteasas, lipasas y quitinasas, deben degradar estas capas para permitir la penetración al interior del hospedador y causar la infección. Sistemas inmunológicos del artrópodo también complementan esta defensa física (Ortiz-Urquiza et al., 2013; Zhang et al., 2025). Para infectar al hospedador, los hongos entomopatógenos deben primero atravesar la epicutícula, una capa externa compuesta mayoritariamente por lípidos esterificados y hidrocarburos que actúan como barrera física y química. Esta capa inhibe la germinación de los conidios y su adherencia, obligando al hongo a emplear adhesinas y enzimas lipolíticas para degradarla antes de alcanzar la procutícula y penetrar

al cuerpo del insecto/árrtrópodo (Beys-da-Silva et al., 2020; Ebani, y Mancianti, 2021; Ribeiro-Silva et al., 2022; Wrońska et al., 2018).

4.2 Estado del arte

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es reconocida como uno de los ectoparásitos de mayor relevancia sanitaria y económica en la ganadería tropical, debido a su capacidad para disminuir la productividad, transmitir hemoparásitos y generar elevadas pérdidas económicas. Esta problemática ha motivado la búsqueda de estrategias de manejo alternativas que reduzcan la dependencia de acaricidas químicos y mitiguen los problemas asociados a su uso indiscriminado, como la resistencia y el impacto ambiental (Rodríguez-Vivas et al., 2018; Lew-Tabor y Rodríguez-Valle, 2016). El uso de cepas comerciales de hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae*, ha demostrado una eficacia considerable bajo condiciones controladas (Pulido-Medellín et al., 2015).

El control de las garrapatas constituye uno de los principales retos sanitarios en la producción ganadera bovina debido a su impacto negativo sobre la salud animal, la productividad y la rentabilidad de los sistemas productivos. Estos ectoparásitos hematófagos provocan estrés, anemia y reducción en la ganancia de peso, además de actuar como vectores de diversos hemoparásitos, como *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*, capaces de comprometer seriamente la vida del ganado. El manejo de las infestaciones se ha basado históricamente en el uso intensivo de acaricidas químicos; sin embargo, su empleo indiscriminado ha favorecido la aparición de cepas resistentes, así como la contaminación ambiental y la presencia de residuos en productos de origen animal (Rodríguez-Vivas et al., 2018; Abbas et al., 2014).

Entre las especies de mayor relevancia sanitaria se encuentra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, considerada la garrapata bovina de mayor impacto económico en regiones tropicales y subtropicales. Este parásito no solo compromete la salud y el bienestar animal, sino que genera pérdidas económicas millonarias para el sector ganadero. En Brasil, por ejemplo, se han estimado pérdidas anuales cercanas a los dos mil millones de dólares asociadas a infestaciones por *R. microplus* (Grisi et al., 2014). Desde el punto de vista económico, las infestaciones por garrapatas representan un serio perjuicio, ya que las pérdidas ocasionadas únicamente por las enfermedades que transmiten al ganado bovino se estiman en cientos de millones de dólares cada año (Makwarela et al., 2025; Luan et al., 2023; Garcia et al., 2022).

Este impacto económico se debe a múltiples factores: disminución de la producción de carne y leche, pérdida de peso, deterioro de la piel y aumento en los costos de tratamiento sanitario.

Además, esta garrapata es el vector principal de enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis, las cuales conforman el complejo denominado “Tristeza parasitaria bovina”, altamente prevalente en regiones tropicales y subtropicales (Saueressig, 2007).

Según Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio (2016), *R. microplus* afecta al 80% del ganado bovino a nivel mundial, con una marcada presencia en el trópico americano. La especie presenta un ciclo biológico con una fase parasitaria en el hospedador y una fase libre en el ambiente, lo que complica su erradicación total y exige estrategias de control integradas y sostenibles.

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten representan un problema de alcance mundial con repercusiones directas en la salud pública, la medicina veterinaria y la productividad ganadera. Su manejo es particularmente complejo en regiones donde la interacción entre la fauna silvestre y el ganado favorece la transmisión de patógenos. Si bien el control químico mediante acaricidas continúa siendo la estrategia más utilizada, su eficacia se ve cada vez más limitada por el desarrollo de resistencia en las poblaciones de garrapatas y por los impactos negativos en el medio ambiente. En este contexto, se han explorado enfoques alternativos como el control biológico, que incluye el uso de depredadores naturales y hongos entomopatógenos y las intervenciones físicas, tales como la modificación del hábitat, los cuales ofrecen opciones más sostenibles, aunque requieren optimización para alcanzar un impacto a gran escala. El manejo integrado de plagas (MIP) se perfila como la alternativa más sólida a largo plazo, al combinar distintas tácticas que incrementan la eficacia del control y reducen el riesgo ambiental. Asimismo, las innovaciones emergentes, como los acaricidas potenciados con nanotecnología y las vacunas de nueva generación, abren nuevas oportunidades para el desarrollo de programas de control más eficientes y sostenibles, enmarcados en un enfoque integral de “Una Salud” (One Health) (Makwarela et al., 2025).

Ante este panorama, el control racional de las garrapatas debe basarse en el conocimiento de su biología y ecología, el uso estratégico de productos químicos, la selección de razas más resistentes y el aprovechamiento de alternativas como el control biológico (Mendoza de Gives, s.f.). Estos enfoques permiten no solo mejorar la eficacia en el manejo sanitario, sino también reducir el impacto ambiental y promover la sostenibilidad en los sistemas ganaderos.

El desarrollo de productos comerciales basados en hongos entomopatógenos ha avanzado notablemente en Latinoamérica. En Brasil, se evaluaron dos formulaciones de *Metarhizium anisopliae* (Metarril® SP Organic y Metarril® SC Organic) sobre diferentes fases biológicas de *Rhipicephalus microplus*. Se utilizaron concentraciones de 10^6 , 10^7 y 10^8 conidios/mL y se aplicaron mediante inmersión para probar su efecto sobre huevos, larvas y hembras engorgadas. La formulación Metarril® SP (conidios secos) mostró una baja eficacia, sin efectos relevantes sobre la biología reproductiva de las hembras tratadas y solo reducciones leves en la incubabilidad de los huevos y la densidad larval. En contraste, Metarril® SC (conidios en aceite vegetal) obtuvo resultados significativamente superiores. En hembras, se reportaron reducciones en el peso de las

masas de huevos y en el índice de producción de huevos. En los huevos, la concentración más alta (10^8 conidios/mL) prolongó el periodo de incubación, acortó el tiempo de eclosión y redujo la incubabilidad hasta en un 61%. En larvas, las concentraciones de 10^7 y 10^8 conidios/mL lograron tasas de mortalidad del 99.6% y 100%, respectivamente, después de 10 días de exposición. Estos hallazgos refuerzan la importancia de desarrollar y utilizar formulaciones oleosas, como Metarril® SC, especialmente dirigidas a los estadios más susceptibles del ciclo de vida del parásito, como los huevos y las larvas (Nogueira et al., 2020).

Ante esta problemática, surge la necesidad de explorar alternativas sostenibles y ecológicas, entre las cuales destaca el control biológico mediante el uso de microorganismos entomopatógenos, como el hongo *Beauveria bassiana*, que ha demostrado eficacia contra diversas plagas.

Pulido-Medellín et al. (2015) evaluaron la eficacia de la cepa MaF1309® de *M. anisopliae* sobre garrapatas adultas en condiciones in vitro en Tunja, Colombia. Mediante la técnica de inmersión, se aplicaron tres concentraciones del hongo (1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/mL). Se observó una relación directamente proporcional entre la concentración del hongo y la mortalidad de las garrapatas. En particular, la concentración de 1×10^8 conidias/mL logró un 100% de mortalidad a los 14 días post-tratamiento, además de una significativa inhibición de la oviposición y reducción en la eclosión de larvas (32%).

En el altiplano boliviano, la ganadería de camélidos enfrenta importantes afectaciones sanitarias ocasionadas por garrapatas (*Amblyomma parvitarsum*), cuyo parasitismo provoca pérdidas económicas significativas. Ante esta problemática, se han explorado alternativas de control biológico basadas en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (*Balsamo* Vuill.). En un estudio desarrollado en la Estación Experimental Choquenaira, Viacha – Bolivia, se evaluó en laboratorio la patogenicidad y virulencia de diferentes cepas de *B. bassiana* sobre *A. parvitarsum*. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo bifactorial, utilizando análisis de varianza (ANVA), prueba de Duncan y estimaciones de error estándar ($\leq 5\%$). Las variables analizadas incluyeron el efecto patogénico, el grado de virulencia, el tiempo letal medio (TL_{50}) y la concentración letal media (CL_{50}). Los resultados evidenciaron diferencias significativas en la mortalidad de garrapatas, destacando la cepa 24 PV/CC con un 73,3% de mortalidad a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} . Sin embargo, la cepa T6 presentó el menor TL_{50} , alcanzando un 50% de mortalidad en 18 días. Las CL_{50} estimadas fueron de $2,5 \times 10^6$ conidios mL^{-1} para la cepa 24 PV/CC y $1,4 \times 10^7$ conidios mL^{-1} para la cepa Bb.9205. Estos hallazgos confirman el potencial de *B. bassiana* como agente patógeno y virulento contra *A. parvitarsum*, lo que respalda su inclusión en estrategias de manejo integrado de garrapatas en la ganadería camélida del altiplano boliviano (Huanca et al., 2025).

5. Metodología

5.1 Localización del estudio

La investigación se llevó a cabo en cinco unidades de producción pecuaria ubicadas en el municipio de Tantoyuca, Veracruz: Los Olivos, Mirador, Las Conchitas, El Orejón y Veredas. En estos ranchos se desarrolla ganadería bovina de doble propósito con ejemplares de las razas Cebú, Brahman, Suiz-Bú y Suizo.

La selección de las unidades se basó en el criterio de que, durante un período mínimo de veinte días previos al muestreo, el ganado no hubiese recibido tratamientos con garrapaticidas químicos, con el fin de evitar interferencias en la evaluación de la estrategia de control biológico.

5.2 Recolección de hembras teleóginas de *Rhipicephalus microplus*

La recolección de garrapatas se realizó en mayo de 2024, obteniéndose 20 ejemplares por unidad de producción.

Los parásitos fueron cuidadosamente extraídos del cuerpo de los bovinos en regiones anatómicas comúnmente afectadas (orejas, papada, dorso y pecho) utilizando pinzas de precisión y aplicando movimientos controlados de torsión para evitar daños a los ejemplares (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria [SENASA], 2025).

Las garrapatas recolectadas se depositaron en frascos de ensayo etiquetados con la información de la unidad de procedencia y se transportaron al laboratorio del Instituto Tecnológico de Tantoyuca para su procesamiento y análisis.

5.3 Desinfección y preparación de especímenes.

Los ejemplares se sometieron a desinfección inicial mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante un tiempo suficiente para eliminar contaminantes superficiales. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en cajas Petri estériles para su manejo y observación.

5.4 Identificación taxonómica

La identificación de las garrapatas se efectuó utilizando un microscopio estereoscópico VELAB, siguiendo las claves taxonómicas propuestas por Guglielmone et al. (2003) y Bautista-Garfias et al. (2006) para la determinación morfológica de especies de importancia veterinaria en la región neotropical.

Los caracteres diagnósticos observados incluyeron:

- Forma y ornamentación del escudo (scutum).
- Longitud y proporción de los palpos.
- Forma de la base capitular.
- Presencia y disposición de festones.
- Morfología de coxas y placas espiraculares.

La confirmación morfológica estableció que todas las garrapatas recolectadas correspondieron a hembras teleóginas de *R. microplus*.

5.5 Ensayos *in vitro*

Se empleó un aislado nativo de *Beauveria bassiana* previamente obtenido de suelo/patógeno (especificar fuente exacta) y cultivado en medio PDA. El cultivo se mantuvo en condiciones controladas de laboratorio (25 ± 2 °C, humedad relativa del 70–80 %, fotoperiodo de 12 h). Las colonias se conservaron en refrigeración (4 °C) hasta su utilización experimental.

Se evaluó la incidencia de infección provocada por un aislado nativo de *Beauveria bassiana* mediante ensayos de inmersión. Se preparó una suspensión conidial a una concentración de 1×10^8 conidios/mL y se aplicaron dos tratamientos:

- T1: 5 mL de suspensión conidial.
- T2: 10 mL de suspensión conidial.

Se incluyó un grupo control tratado únicamente con agua destilada estéril y Tween® 80 al 0,01 %.

Cada hembra se sumergió durante 1 minuto en la suspensión correspondiente, se secó sobre papel absorbente estéril y se incubó individualmente en condiciones controladas (27 ± 1 °C, HR 80 ± 5 %). Se registró la mortalidad y la presencia de micelio cada 48 horas.



Figura 1. Cepa de *Beauveria* spp



Figura 2. Cámara húmeda donde se colocaron las muestras

5.6 Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado. Las variables analizadas fueron la mortalidad del ectoparásito (*in vitro*) y el tiempo en que ocurría dicha mortalidad. Cada caja Petri utilizada en los tratamientos representó una unidad experimental, en la cual se realizaron las observaciones y mediciones correspondientes (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Concentración de Beauveria	Número de cajas petri	Número de garrapatas por caja	Total de garrapatas por tratamiento
Tratamiento 1	8×10^6	13	3	39
Tratamiento 2	1×10^8	13	3	39
Tratamiento 3	Testigo	13	3	39
Total general	—	39	—	117

5.7 Recolección de garrapatas para estudios de infestación larval en pasto (*Cynodon dactylon*)

La recolección de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en fase de hembras teleóginas se realizó en el rancho Las Conchitas, situado en el municipio de Tantoyuca, Veracruz. Se utilizaron bovinos de la raza Suiz-Bú y, mediante el uso de pinzas de precisión, se extrajeron cuidadosamente las garrapatas aplicando movimientos controlados de torsión para evitar daños y preservar su viabilidad.

Los ejemplares recolectados se depositaron en frascos de ensayo debidamente etiquetados y se transportaron al Laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. En total, se recolectaron 150 garrapatas.

5.8 Procesamiento, incubación y obtención de larvas

Las garrapatas recolectadas fueron desinfectadas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, seguidas de un enjuague con agua estéril y secado con papel absorbente (Figura 3a). Posteriormente, se examinó su integridad morfológica con un microscopio estereoscópico para descartar ejemplares dañados.

La identificación taxonómica se llevó a cabo siguiendo las claves de Guglielmone et al. (2003) y Barros-Battesti et al. (2006), confirmándose que todos los ejemplares correspondían a *R. microplus*. Para la obtención de huevos viables, se colocaron tres hembras por caja Petri provista de cámara húmeda (Figura 3b) para mantener condiciones microambientales favorables. Las cajas se incubaron en estufa a 27 ± 1 °C durante 10 días, de acuerdo con la metodología descrita por Jaén-Torrijos et al. (2015). Bajo estas condiciones, la eclosión de larvas se observó aproximadamente a los 20 días posteriores al inicio de la oviposición.

5.9 Evaluación en campo del efecto de *Beauveria* spp. sobre larvas de garrapata

El estudio de campo se desarrolló en el rancho Pénjamo, en Tantoyuca, Veracruz, zona de clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual de 23,3 °C (variaciones mensuales entre 7 °C y 14 °C) y precipitación anual de 1.236 mm. Este sitio fue seleccionado por cumplir con las condiciones agroecológicas adecuadas para el ensayo.

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

T1 – B5 mL: Aplicación de *Beauveria* spp. a una concentración de 1×10^8 esporas/mL.

T2 – B10 mL: Aplicación de *Beauveria* spp. a una concentración de 8×10^8 esporas/mL.

T3 – Control: Aplicación de agua destilada sin microorganismos.

El área experimental consistió en un potrero con pasto Costa Bermuda (*Cynodon dactylon*), dividido en dos grupos: pleno sol y sombra. Cada grupo se conformó por nueve parcelas de 9 m², delimitadas con bordes de 1,5 m para evitar la dispersión de larvas. Se realizó limpieza quincenal para evitar el crecimiento de maleza y se aplicó hidróxido de calcio tres veces por semana para prevenir migración larval.

La separación entre tratamientos fue de 30 m y las aplicaciones se realizaron mediante aspersión manual (Figura 4) cada tres días (de 18:00 a 19:00 h) para evitar la exposición solar directa, lo que ayuda a preservar la viabilidad de las conidias fúngicas durante su aplicación. Este procedimiento está alineado con lo descrito por Polar et al. (2005), quien validó que las formulaciones en aceite para aplicaciones ULV deben realizarse en horarios de baja irradiación solar para minimizar deterioros de los propágulos (Nchu et al., 2010).

El conteo de larvas se efectuó desde el día 0 y semanalmente hasta finalizar el experimento. La recolección de larvas se realizó mediante el método de arrastre descrito por Salomón et al. (2020), que consiste en desplazar una tela de franela blanca sobre la vegetación baja en transectos lineales durante un minuto. Las muestras se depositaron en envases de nailon tipo tetra pack, selladas y trasladadas al laboratorio, donde se mantuvieron durante cinco horas para el conteo larval.

5.10 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, con seis repeticiones por tratamiento. Las variables analizadas fueron:

Mortalidad larval (%).

Reducción en la oviposición.

Presencia/ausencia de micelio.

El monitoreo de la mortalidad larval se realizó cada siete días, registrando la reducción progresiva en el número de larvas a lo largo del tiempo.



Figura 3. División de parcelas en campo

5.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre mortalidad larval, oviposición y presencia de micelio se organizaron en hojas de cálculo Excel.

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

5.12 Identificación molecular

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo CTAB (hexadeciltrimetilamonio bromuro) al 2%, formulado con Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, CTAB 2% y NaCl 1.4 M, conforme a lo descrito por Doyle (1991). Todas las manipulaciones se realizaron dentro de una campana de flujo laminar previamente desinfectada con hipoclorito de sodio y etanol al 76%. Se

colocó un mechero como medida de esterilidad, y se dispusieron microtubos y gradillas para facilitar el manejo de las muestras.

La muestra fúngica fue recolectada mediante raspado con una puntilla estéril y transferida a un mortero que contenía 1000 μL de solución CTAB al 2%. Se trituró cuidadosamente hasta obtener una suspensión homogénea, que fue transferida a microtubos e incubada a baño maría a 96 °C durante 90 minutos. Posteriormente, se agitó en vórtex durante 5 minutos y se le adicionaron 500 μL de cloroformo-isoamílico, mezclando por inversión. La fase orgánica fue separada por centrifugación a 11,500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se repitió la extracción con 700 μL de cloroformo-isoamílico.

Para precipitar el ADN, se utilizó etanol frío al 100% (-20 °C), incubando las muestras durante 12 horas. Luego de centrifugarlas, se lavó el pellet con isopropanol al 70%, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 μL de agua HPLC y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

5.12.1 Cuantificación espectrofotométrica

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría, utilizando 2 μL de la muestra. La lectura se efectuó en un espectrofotómetro calibrado, y los resultados reflejaron tanto la concentración como la calidad del ADN, siendo esta última adecuada para su posterior análisis molecular.

5.12.2 Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa

Para la amplificación de las secuencias, se utilizaron los primers ITS, RPB1 y RPB2. Se preparó una mezcla de reacción (mix) La mezcla de reacción proporciona el ambiente químico ideal y los insumos moleculares necesarios para que la enzima Taq polimerasa pueda sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir del molde. que contenía agua HPLC, buffer, dNTPs, Taq polimerasa y los primers específicos. A cada reacción se agregaron 3 μL de ADN y 12 μL del mix.

La separación de productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para ello, se disolvieron 3 gramos de agarosa en 200 mL de solución TAE 1X, calentándola en microondas hasta su completa disolución. La mezcla fundida se vertió en un molde con peines para formar los pocillos y se dejó solidificar. Se cargaron las muestras mezcladas con buffer de carga en los pocillos y se corrió la electroforesis durante 90 minutos. Finalmente, el gel fue revelado en un fotodocumentador con luz ultravioleta, y se verificó la presencia de bandas específicas de acuerdo con el peso molecular esperado para cada marcador.

6. Resultados y discusión

6.1 Identificación taxonómica de garrapatas

El organismo objeto de estudio corresponde al ectoparásito *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conocido comúnmente como la garrapata del ganado bovino.



Desde el punto de vista morfológico, esta garrapata presenta un cuerpo ovalado. En los machos, el escudo dorsal es visible y muestra ornamentaciones, mientras que en las hembras el cuerpo se expande considerablemente durante la alimentación, pudiendo alcanzar hasta 12 mm de longitud. Posee palpos cortos y un aparato bucal especializado para la succión de sangre, extremidades bien desarrolladas y un *capitulum* orientado hacia adelante, rasgo característico del subgénero *Boophilus*.

Se trata de un ácaro monoxeno, ya que completa todo su ciclo de vida sobre un solo hospedador, generalmente bovinos. *R. microplus* reviste gran relevancia en medicina veterinaria debido a su capacidad para actuar como vector de hemoparásitos, tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, agentes etiológicos de la enfermedad conocida como tristeza bovina.

La determinación taxonómica de las garrapatas recolectadas se realizó empleando las claves morfológicas propuestas por Walker et al. (2003). Para ello, se observaron cuidadosamente bajo un estereomicroscopio diversas estructuras diagnósticas, tales como la forma del escudo dorsal (*scutum*), la ornamentación del tegumento, la disposición y longitud de los palpos, la dentición del hipostoma, así como las características de las patas, espiráculos y placas genitales. Estas observaciones permitieron identificar con precisión los especímenes hasta el nivel de especie, confirmando la presencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

6.2 Eficacia *in vitro* del hongo *Beauveria bassiana* sobre hembras teleoginas de *Rhipicephalus microplus*

La evaluación *in vitro* de *Beauveria bassiana* se realizó mediante la aplicación de dos tratamientos con volúmenes distintos: 5 mL y 10 mL de una suspensión de 1×10^8 \times 10^8 conidios/mL, además de un grupo testigo sin aplicación fúngica. La presencia de micelio se utilizó como indicador de infección.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, donde se observa una clara diferencia en la proporción de garrapatas con micelio entre los tratamientos y el grupo control.

Tabla 2. Presencia o ausencia de micelio en hembras teleóginas de *R. microplus* tratadas con *B. bassiana*

Tratamiento	Presencia de micelio (P+)	Ausencia de micelio (A-)
B5mL	25	14
B10mL	28	11
Testigo	0	39

La infección micótica se presentó en el 64.1% de las garrapatas tratadas con 5 mL y en el 71.8% de las tratadas con 10 mL, mientras que en el grupo control no se observó desarrollo de micelio. El análisis estadístico mediante la prueba de Chi-cuadrada ($X^2 = 19.185$; $p < 0.0001$) indicó diferencias significativas entre los tratamientos, confirmando la efectividad del hongo para colonizar a los ectoparásitos.

Estos resultados evidencian la capacidad infectiva de *B. bassiana* sobre garrapatas adultas, incluso en su fase más resistente. Investigaciones previas han documentado hallazgos similares. Por ejemplo, Zumaeta et al. (2022) evaluaron la patogenicidad de *B. peruviana* sobre hembras teleóginas, registrando mortalidades de hasta 92% con concentraciones de 1×10^9 \times 10^9 conidios/mL y una inhibición de oviposición del 60%. Aunque en el presente estudio no se midió la mortalidad, la elevada incidencia de micelio sugiere un impacto comparable, dado que la presencia de estructuras micóticas es indicativa de infección letal o debilitante.

De manera similar, en México han mostrado que cepas nativas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* lograron mortalidades en hembras adultas de *R. microplus* superiores al 75 %, con reducciones del número viable de huevos superiores al 25 %, lo cual coincide con los resultados encontrados en este estudio (Fernandez-Salas et al., 2019).

Un estudio más reciente, en México, Alonso-Díaz et al. (2022) realizaron el primer estudio enfocado en la evaluación de cepas nativas de hongos entomopatógenos contra larvas de *Amblyomma mixtum*. Los autores reportaron que varios aislados presentaron mortalidades clínicas significativas, superiores al 24 %, destacando la capacidad de ciertos genotipos para infectar y afectar el desarrollo de este género de garrapatas en condiciones controladas. Este hallazgo resulta relevante ya que amplía la evidencia sobre el potencial de los hongos entomopatógenos en el control de garrapatas distintas a *R. microplus*, respaldando su viabilidad como herramienta dentro de programas de manejo integrado de ectoparásitos en regiones tropicales y subtropicales.

Estudios previos en el género *Amblyomma* han demostrado la eficacia de *M. anisopliae* en adultos, con mortalidades superiores al 90 % en especies como *A. maculatum* y reducciones significativas en eclosión larval. Por ejemplo, Kirkland et al. (2004) reportaron más del 90 % de mortalidad en *A. maculatum* tras exposición a una suspensión de 10^8 conidios/mL, con colonización micótica visible en más del 70 % de los individuos tratados. Estas evidencias respaldan la viabilidad de aplicar hongos entomopatógenos en el control de garrapatas en sistemas tropicales.

En conjunto, los resultados del presente estudio refuerzan el potencial de *B. bassiana* como alternativa sostenible al uso de acaricidas químicos. La infección micótica en hembras teleóginas representa un punto crítico para interrumpir el ciclo biológico del parásito, ya que puede reducir tanto la capacidad de oviposición como la viabilidad de los huevos (Fernández-Salas et al., 2019).

6.3 Evaluación *in situ* sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* en pasto (*Cynodon dactylon*)

En las pruebas de campo se evaluaron dos concentraciones de *Beauveria bassiana* (1×10^{81} y 8×10^{68} conidios/mL) aplicadas en condiciones de sol y sombra, durante tres periodos diferentes. Se analizaron dos variables: número de larvas vivas y presencia de micelio.

La prueba de Shapiro-Wilk evidenció que los datos no seguían una distribución normal ($p < 0.0001$), por lo que se utilizaron modelos mixtos y análisis de varianza (ANOVA).

El análisis de la variable presencia de micelio mediante ANOVA mostró efectos significativos del tratamiento, la condición de luz y la fecha de evaluación, así como interacciones entre estos factores. Sin embargo, la prueba t de Student no detectó diferencias significativas entre las condiciones de sol y sombra ($p = 0.4646$), aunque la media de presencia de micelio fue ligeramente mayor en sombra (7.65) que en sol (6.67).

Por otro lado, el modelo aplicado a la variable número de larvas vivas indicó que ni la dosis ni la condición de aplicación por sí solas tuvieron un efecto significativo. No obstante, el periodo de evaluación resultó ser un factor determinante ($F = 308.1$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$), lo que sugiere que el éxito del tratamiento estuvo influenciado por condiciones ambientales y temporales.

Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas que señalan que variables como la humedad relativa, la temperatura y la radiación solar pueden modificar drásticamente la viabilidad de las esporas y la velocidad de infección de *B. bassiana* en ambientes naturales. Por ejemplo, Inglis et al. (2001) demostraron que la efectividad de los hongos entomopatógenos se ve limitada en ambientes con alta radiación UV o baja humedad, condiciones frecuentes en sistemas a cielo abierto.

Las interacciones significativas encontradas entre dosis, lugar de aplicación y periodo de evaluación sugieren que la eficacia del hongo no depende de un solo factor, sino de una combinación de condiciones ambientales y logísticas. Esto refuerza la necesidad de diseñar estrategias de aplicación que consideren la estacionalidad y los microambientes presentes en los sistemas ganaderos.

En conjunto, la evidencia generada en este estudio, sumada a la reportada en la literatura científica, respalda la inclusión de cepas nativas de *B. bassiana* en programas de manejo integrado de garrapatas, particularmente en regiones tropicales como Tantoyuca, Veracruz, donde las condiciones agroecológicas favorecen su aplicación y persistencia.

6.4 Identificación molecular de la especie nativa de Beauveria

Se obtuvo una secuencia consenso combinando la región completa del ITS y fragmentos parciales de los genes RPB1 y TEF, tras un minucioso recorte y ensamblaje con BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple mediante MAFFT v7.475 (Katoch y Standley, 2013).

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con referencias *ex type* de *Beauveria* disponibles en bases de datos públicas como GenBank (NCBI), UNITE y BOLD Systems, empleando *Cordyceps javanica* NR_111172 como grupo externo. Los alineamientos génicos individuales fueron concatenados con el software Mesquite v3.6 (Maddison, 2008).

El ajuste de modelos evolutivos se realizó con jModelTest v2 (Darriba et al., 2012) y, posteriormente, se llevaron a cabo análisis filogenéticos mediante inferencia bayesiana (MrBayes v3.2.1; Ronquist et al., 2012) y máxima verosimilitud (raxmlGUI 1.5b2; Silvestro y Michalak, 2012).

Para MrBayes se utilizaron cuatro cadenas y 2 millones de generaciones, con un *burn-in* del 25%. En el análisis de ML se aplicó un *bootstrap* rápido de 1,000 réplicas bajo el modelo GTR+G. Los árboles resultantes fueron visualizados con FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010) y MEGA7 (Figura 5).

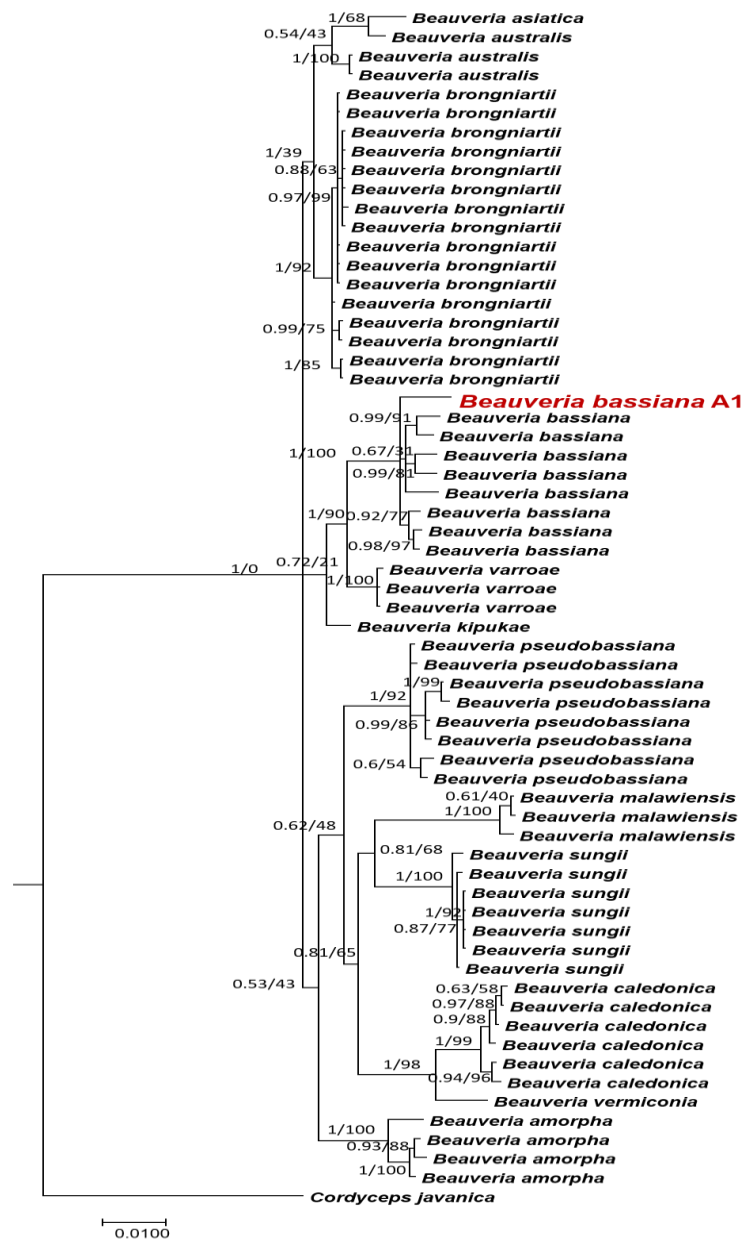


Figura 4. Filogenia de cepas de *Beauveria* construida mediante análisis filogenético

El uso de marcadores múltiples (ITS, TEF, RPB1) ha sido ampliamente respaldado en estudios recientes para delimitar especies dentro del género *Beauveria*. Katoh & Standley (2013) destacaron que MAFFT permite alineamientos precisos para regiones ribosomales y genes codificantes, lo cual es esencial para análisis concatenados. Asimismo, Hall (1999) subrayó la precisión de BioEdit en la edición de secuencias crudas.

Trabajos previos como Rehner & Buckley (2005), y Rehner et al. (2011) han demostrado que los análisis multilocus usando ITS, TEF, RPB1, RPB2 y Bloc permiten resolver clados robustos dentro del complejo de *B. bassiana*. En particular, Rehner y Buckley (2005) mostraron que la combinación de RPB1, Bloc y TEF discrimina especies crípticas con altos niveles de soporte estadístico, utilizando métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud.

En el presente estudio, la amplificación y secuenciación de estos marcadores permitió construir filogenias robustas que facilitaron la identificación precisa de la cepa utilizada (Bustamante et al., 2019). De forma similar, Wang et al. (2022), mediante un análisis basado en seis loci (incluyendo ITS y RPB1), confirmaron la existencia de numerosas especies nuevas dentro de este género.

La elección de estos marcadores y herramientas bioinformáticas está respaldada por su uso como estándar en filogenia de hongos entomopatógenos. MrBayes proporciona estimaciones probabilísticas detalladas (*posterior probability*), mientras que RAxML destaca por su eficiencia computacional y la robustez de sus valores de *bootstrap*. La concordancia entre ambos métodos en este estudio refuerza la solidez del árbol final y la delimitación de especies.

Los resultados obtenidos validan la identificación taxonómica de la cepa candidata y su posición dentro del género *Beauveria*. Su ubicación en clados con alto soporte estadístico avala su coherencia genética con especies reconocidas, garantizando su idoneidad como agente de biocontrol específico y respaldando su potencial uso en contextos científicos y regulatorios.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* tiene un alto potencial como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus*, tanto en condiciones de laboratorio como en campo. En las pruebas in vitro, se observó una notable presencia de micelio en las hembras teleoginas tratadas, especialmente con la dosis más alta, lo que indica una capacidad efectiva de infección. Esto sugiere que el hongo podría reducir la reproducción de las garrapatas al interferir con su capacidad ovopositora.

En evaluaciones de campo realizadas, se ha comprobado que el uso de formulaciones de hongos combinadas con adyuvantes naturales o aceitosos puede mejorar considerablemente la eficacia del biocontrol, incluso alcanzando valores superiores al 90 %. Además, la aplicación mediante métodos prácticos como el sistema de rociado sobre el ganado facilita su adopción en explotaciones ganaderas.

El análisis molecular basado en múltiples regiones genéticas permitió confirmar con alta certeza la identidad del aislado evaluado dentro del género *Beauveria*, lo cual respalda su uso como bioinsumo. Esta validación genética es crucial para garantizar tanto su seguridad como su efectividad, y para posibles procesos de registro en instancias regulatorias.

En conjunto, este trabajo aporta evidencia sólida sobre la viabilidad de utilizar *B. bassiana* como alternativa ecológica para el control de garrapatas en sistemas ganaderos, y refuerza su inclusión en estrategias de manejo integrado que busquen disminuir el uso de productos químicos.

8. Recomendaciones

Desarrollar formulaciones eficaces: se sugiere optimizar las formulaciones de hongos entomopatógenos mediante el uso de coadyuvantes que mejoren su persistencia y adherencia al hospedador en ambientes tropicales.

Usar cepas locales adaptadas: se recomienda trabajar con cepas nativas, adaptadas a las condiciones locales, ya que suelen ofrecer mejores resultados frente a cepas exóticas.

Incorporar el biocontrol a estrategias integradas: el uso de *B. bassiana* debería considerarse parte de un programa de manejo integral de garrapatas, complementando otras prácticas preventivas y sanitarias.

Fortalecer la capacitación en campo: es fundamental capacitar a productores y técnicos sobre el manejo, producción y aplicación de hongos entomopatógenos para asegurar su uso adecuado y efectivo.

Realizar validaciones en diferentes entornos: es conveniente ampliar las evaluaciones en distintas zonas geográficas y condiciones ambientales para validar la consistencia de los resultados y ajustar las estrategias según el contexto.

Mantener el enfoque molecular en la identificación: continuar empleando herramientas moleculares en la identificación de nuevas cepas garantizará una correcta clasificación, evitando errores taxonómicos y facilitando su registro y aplicación comercial.

9. Literatura citada

- Abbas, R. Z., Colwell, D. D., Iqbal, Z., & Khan, A. (2014). Acaricidal drug resistance in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) and approaches to its management. *World's Poultry Science Journal*, 70(1), 113-124.
- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary parasitology*, 203(1-2), 6-20.
- Aguilera-Cogley, V. A., Jaén-Torrijos, M., Ávila-Rodríguez, L. Y., Herrera-Vásquez, J. Á., Jaén-Sanjur, J. N., & Barba-Alvarado, A. A. (2020). Identificación y virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) como agente de control biológico de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en Panamá. *Idesia (Arica)*, 38(1), 59-65.
- Alfaro-Álvarez, J. H., Gandarilla-Pacheco, F. L., Quintero-Zapata, I., Vargas-Pérez, M. P., Guajardo-Barbosa, C., Luna-Olvera, H. A., & Elías-Santos, M. (2024). Selection of Native *Beauveria bassiana*1 Strains for Formulation by Coacervation and the Effect of Temperature and UV Radiation on Their in vitro Stability. *Southwestern Entomologist*, 49(2), 658-672.
- Alonso-Díaz, M. Á., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., & Campbell, W. B. (2013). Controlling the introduction and augmentation of parasites in and on domesticated livestock. *Sustainable Food Production Includes Human and Environmental Health*, 191-228.
- Alonso-Díaz, M. A., Jiménez-Ruíz, M., & Fernández-Salas, A. (2022). First Evidence of the Tickicide Effect of Entomopathogenic Fungi Isolated from Mexican Cattle Farms Against *Amblyomma mixtum*. *The Journal of Parasitology*, 108(6), 539-544.
- Alonso-Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2021). Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 657694. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.657694>

- Allan, F. K., Sindoya, E., Adam, K. E., Byamungu, M., Lea, R. S., Lord, J. S., ... & Auty, H. K. (2021). A cross-sectional survey to establish *Theileria parva* prevalence and vector control at the wildlife-livestock interface, Northern Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, 196, 105491.
- Alonso-Díaz, M. Á., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., & Campbell, W. B. (2014). Controlling the introduction and augmentation of parasites in and on domesticated livestock. *Sustainable Food Production Includes Human and Environmental Health*, 191-228.
- Alonso-Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2021). Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in fungal biology*, 2, 657694.
- Álvarez, V., Matamoros-Carvajal, T., & Mena-Marín, A. L. (2017). Determinación, in vitro, de la eficacia de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Ciencias Veterinarias*, 35(1), 43-57.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America*, 22(2), 195-215.
- Aquino-Bolaños, T., Ortiz-Hernández, Y. D., Bautista-Cruz, A., & Acevedo-Ortiz, M. A. (2023). Viability of entomopathogenic fungi in oil suspensions and their effectiveness against the agave pest *Scyphophorus acupunctatus* under laboratory conditions. *Agronomy*, 13(6), 1468.
- Bautista Garfias, C. R. (2006). *Entomología veterinaria esencial*. Ed. INIFAP, México DF, México.
- Behle, R. W., Compton, D. L., Laszlo, J. A., & Shapiro-Ilan, D. I. (2009). Evaluation of soyscreen in an oil-based formulation for UV protection of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1759-1766.
- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Vainstein, M. H., Schrank, A., ... & Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 208, 107812.
- Beys-da-Silva, W. O., Santi, L., Berger, M., Calzolari, D., Passos, D. O., Guimarães, J. A., ... & Yates, J. R. (2014). Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2282-2296.

- Broglio-Micheletti, S. M., de Souza, L. A., Valente, E. C., de Araújo, M. J., da Silva Dias, N., & Gómez-Torres, M. L. (2012). Evaluation of entomopathogenic fungi as biological control agents *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Nuestra Revista*, 30(1), 93-99.
- Bustamante, D. E., Oliva, M., Leiva, S., Mendoza, J. E., Bobadilla, L., Angulo, G., & Calderon, M. S. (2019). Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. nov. *MycKeys*, 58, 47.
- Canestrini G (1888) *Prospetto dell'acarofauna Italiana*.
- Cruz-González, G., Romero-Salas, D., Szabó, M. P. J., & Alonso-Díaz, M. Á. (2024). *Ciclo de la garrapata Rhipicephalus microplus fuera del bovino en México: ¿Qué sabemos y qué hace falta?* *Bioagrocencias*, 17(2), 11–15. <http://doi.org/10.56369/BAC.5683>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- De la Cruz Díaz, A., Garduño, R. G., Pena, M. V., Arriola, R. O. C., & Simán, E. M. (2023). Prevalencia y diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas de ganado bovino en municipios de Chiapas y Tabasco, México. *Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical*, 3(2), 1-14.
- De Meneghi, D., Stachurski, F., & Adakal, H. (2016). Experiences in tick control by acaricide in the traditional cattle sector in Zambia and Burkina Faso: possible environmental and public health implications. *Frontiers in public health*, 4, 239.
- Diplock, N., Johnston, K., Mellon, A., Mitchell, L., Moore, M., Schneider, D., ... & Kiffner, C. (2018). Large mammal declines and the incipient loss of mammal-bird mutualisms in an African savanna ecosystem. *PloS one*, 13(8), e0202536.
- Ramos, R. A. N., de Macedo, L. O., Bezerra-Santos, M. A., de Carvalho, G. A.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Dzemo, W. D., Vudriko, P., Ramatla, T., & Thekiso, O. (2023). Acaricide resistance development in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations against amitraz and deltamethrin on communal farms of the King Sabata Dalindyebo Municipality, South Africa. *Pathogens*, 12(7), 875.

Ebani, V. V., & Mancianti, F. (2021). Entomopathogenic fungi and bacteria in a veterinary perspective. *Biology*, 10(6), 479.

Esteban-Del Ángel, R., Silva-Martínez, K. L., Allende-Molar, R., Arrieta-González, A., Silva-Rojas, H. V., & Martínez-Sánchez, I. (2025). Pathogenicity of *Metarhizium* sp. on *Spodoptera frugiperda* in Maize in Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 50(1), 1-19.

Estrada-Peña, A., Nava, S., & Petney, T. (2017). Ticks of the genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) in the Americas: Taxonomy, ecology, and their role as disease vectors. *Zootaxa*, 4105(1), 1-68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4105.1.1>

Evans, D. E., Martins, J. R., & Guglielmone, A. A. (2000). A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4), 453–470. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400001>

Fan, Y., Ortiz-Urquiza, A., Garrett, T., Pei, Y., & Keyhani, N. O. (2015). Involvement of a caleosin in lipid storage, spore dispersal, and virulence in the entomopathogenic filamentous fungus, *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 17(12), 4600 – 4614. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12805>

Fernandez-Salas, A., Alonso-Díaz, M. A., & Alonso-Morales, R. A. (2019). Effect of entomopathogenic native fungi from paddock soils against *Rhipicephalus microplus* larvae with different toxicological behaviors to acaricides. *Experimental parasitology*, 204, 107729.

Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., & Alonso-Díaz, M. A. (2019). Control biológico de garrapatas con hongos entomopatógenos: Avances y perspectivas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(2), 345-358. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4567>

Fernández, J., Martínez, A., & López, D. (2020). Eficacia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de *Rhipicephalus microplus* en condiciones de laboratorio. *Revista*

<https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v33n4a05>

García-Ponce, R., Villarreal-Villarreal, J. P., Suárez, A. E. F., Vidal, G. H., García-Hernández, D. G., Hernández-Escareño, J. J., & Heya, M. S. (2025). Nanocarriers of natural and synthetic ixodicides, new alternatives against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): a review. *Veterinary Parasitology*, 110506.

Garcia, K., Weakley, M., Do, T., & Mir, S. (2022). Current and future molecular diagnostics of tick-borne diseases in cattle. *Veterinary Sciences*, 9(10), 241. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100241>

George, J. E., Davey, R. B., & Pound, J. M. (2020). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology Today*, 36(2), 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.002>

George, J. E., Davey, R. B., & Pound, J. M. (2004). Chemical control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and mechanisms of acaricide resistance. *Parasitology Research*, 104(S1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>

George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129(S1), S353-S366.

Giles, J. R., Peterson, A. T., Busch, J. D., Olafson, P. U., Scoles, G. A., Davey, R. B., ... & Wagner, D. M. (2014). Invasive potential of cattle fever ticks in the southern United States. *Parasites & vectors*, 7, 1-11.

Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. D. S., Barros, A. T. M. D., Andreotti, R., Cançado, P. H. D., ... & Villela, H. S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 150-156.

Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., & Horak, I. G. (2014). *The hard ticks of the world* (Vol. 10, pp. 978-994). Dordrecht: Springer.

Guglielmone, A. A., Nava, S., & Estrada-Peña, A. (2020). Tick-host relationships and distribution in the neotropics. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00165>

- Gutiérrez, F., Torres, A., & Ramírez, C. (2020). Eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Rhipicephalus microplus* en pastizales infestados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(3), 112-126.
- Hall-Mendelin, S., Craig, S. B., Hall, R. A., O'donoghue, P., Atwell, R. B., Tulsiani, S. M., & Graham, G. C. (2011). Tick paralysis in Australia caused by *Ixodes holocyclus* Neumann. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105(2), 95-106.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).
- Hernández, J. A., López-Cervantes, S., & Torres, G. V. (2020). Ganadería sostenible en el trópico mexicano. *Agrociencia*, 54(3), 123-135. <https://doi.org/10.12345/agrociencia.v54i3.5678>
- Hernández, J. (2005). Control biológico de garrapatas: una alternativa ante la resistencia a acaricidas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández-Velázquez, V. M., Pérez-De la Torre, M. A., & Gómez-Velasco, M. (2017). Uso de hongos entomopatógenos para el control de garrapatas en ganado bovino. *Acta Zoológica Mexicana*, 33(2), 345-358. <https://doi.org/10.21829/azm.2017.332.1242>
- Herrera Montero, L. M., Romero Peláez, A. B., Gómez Mendoza, G. A., Navarrete Párraga, M. E., & Hidalgo Mata, D. A. (2024). Control de garrapatas mediante *Beauveria bassiana* cepa INIAP L3B3 en combinación con moléculas orgánicas y químicas. *Emergentes - Revista Científica*, 4(2), 583–596. <https://doi.org/10.60112/erc.v4.i2.166>
- Hidalgo, D., Ramírez, J. L., Navarrete, M., Cevallos, V., Ramos, M., Bravo, B., ... & Pérez de León, A. Á. (2025). Research advances in Ecuador on use of entomopathogenic fungi for control of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*: the case of *Beauveria bassiana* sensu lato strain INIAP L3B3. *Frontiers in Fungal Biology*, 6, 1492395.
- Huanca, L. T. L., Blanco, C. L., Maraza, M. H., Vargas, C. A., Miranda, F. A. C., Rojas, J. J. V., & Sánchez, D. C. (2025). Patogenicidad y virulencia de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuill., sobre la garrapata (*Amblyomma parvitarsum*) del ganado camélido en condiciones de laboratorio. *Apthapi*, 11(1), 2798-2808.

- Hüe, T., & Fontfreyde, C. (2019). Development of a new approach of pasture management to control *Rhipicephalus microplus* infestation. *Tropical animal health and production*, 51(7), 1989-1995.
- Ibarra, J. E., Del Rincón, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., ... & Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 113-120.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. En T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential* (pp. 23–69). CABI Publishing.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2019). *Encuesta Nacional Agropecuaria 2019*. <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2019/>
- Jaén-Torrijos, M., Álvarez-Calderón, V., Quintero-Noriega, R., Espinales, K., Rangel-Tapia, G., & Quintero-Vega, N. (2015). Sensibilidad al clorpirifos y cipermetrina en la garrapata *Rhipicephalus microplus* en fincas ganaderas de panamá. *Ciencia Agropecuaria*, (22), 70-77.
- Kaaya, G. P., Mwangi, E. N., & Ouna, E. A. (1996). Prospects for Biological Control of Livestock Ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, Using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*, 67(1), 15-20.
- Kar, S., Sirin, D., Akyildiz, G., Sakaci, Z., Talay, S., & Camlitepe, Y. (2022). Predation of ant species *Lasius alienus* on tick eggs: impacts of egg wax coating and tick species. *Scientific Reports*, 12(1), 14773.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kato, T., Inagaki, S., Shibata, C., Takayanagi, K., Uehara, H., Nishimura, K., & Park, E. Y. (2025). Topical Infection of *Cordyceps militaris* in Silkworm Larvae Through the Cuticle has Lower Infectivity Compared to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*, 82(1), 26.
- Kirby, C., & Safford III, A. S. (2010). Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*, 47, 1107-1115.

Kirkland, B. H., Westwood, G. S., & Keyhani, N. O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of medical entomology*, 41(4), 705-711.

Lagunes-Quintanilla, R., Gómez-Romero, N., Mendoza-Martínez, N., Castro-Saines, E., Galván-Arellano, D., & Basurto-Alcantara, F. J. (2024). Perspectives on using integrated tick management to control *Rhipicephalus microplus* in a tropical region of Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1497840.

Lei, C. J., Halim, N. A., Asib, N., Zakaria, A., & Azmi, W. A. (2022). Conidial emulsion formulation and thermal storability of *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Dryophthoridae). *Microorganisms*, 10(7), 1460.

Leger, R. J. S. (2008). Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of invertebrate pathology*, 98(3), 271-276.

Lew-Tabor, A. E., & Rodriguez, V. M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(4), 573-585.

López, V. G. (1980). Biología, morfología y taxonomía de garrapatas de interés económico, En: Control de garrapatas. Medellín: Instituto Colombiano Agropecuario, Compendium 39; p. 1-16.

Lozada Monroy, H., Gutiérrez, A., y Soto, P. (2011). Efecto de la "tierra de diatomeas", como antiparasitario en una ganadería lechera en el Piedemonte Llanero. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 2(1), 2-21. <https://doi.org/10.22579/22484817.565>

Luan, Y., Gou, J., Zhong, D., Ma, L., Yin, C., Shu, M., ... & Lin, Q. (2023). The tick-borne pathogens: an overview of China's situation. *Acta Parasitologica*, 68(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00598-5>

Lucatero, J. P., Chávez, D. F., & Cupul, W. C. (2023). Eficacia del uso de hongos entomopatógenos con material inerte en el control biológico de garrapatas del ganado bovino. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 27(Especial), ágs-10.

Lucero, J., Manzano, J., Loaiza, I., & Orellana, Y. (2024). Producción de *Beauveria bassiana* para la formulación de bioplaguicidas. *La Granja*, 113-129.

Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2023). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.81. <http://www.mesquiteproject.org>.

Maddison, W. P. (2008). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. *Evolution*, 62, 1103-1118

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* for integrated pest management. *Insects*, 7(4), 77. <https://doi.org/10.3390/insects7040077>

Makwarela, T. G., Seoraj-Pillai, N., & Nangammbi, T. C. (2025). Tick control strategies: Critical insights into chemical, biological, physical, and integrated approaches for effective hard tick management. *Veterinary sciences*, 12(2), 114.

Martínez-García, J., Abad-Zavaleta, J., García-Gómez, M. D. J., & Núñez-Gaona, O. (2023). Evaluación in vitro del potencial acaricida de *Beauveria bassiana* DS3. 17 sobre la garrapata común (*Rhipicephalus microplus*) en Oaxaca, México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(3), 644-657.

Mbatidd, I., Bugenyi, A. W., Natuhwera, J., Tugume, G., & Kirunda, H. (2021). Effectiveness and limitations of the recently adopted acaricide application methods in tick control on dairy farms in South-Western Uganda. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 13(3), 192-201.

Mehmood, N., Muqaddas, H., Shahid, N., Kousar, S., & Iqbal, F. (2025). Using entomopathogenic fungi for tick control. In *Acaricides Resistance in Ticks: A Global Problem* (pp. 293-330). Singapore: Springer Nature Singapore.

Mendoza de Gives, P. (s.f.). *Microorganismos en el manejo de parásitos de ganado*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. <https://sistemas.fciencias.unam.mx/~germoplasma/files/s3/Mendoza%20de%20Gives.pdf>

Metschnikoff, E. (1879). Maladies des hannetons ble. *Zapiski imperatorskogo obshchestva sel'ska Khozyaistra yuzhnoi rossii*, 17-50.

Metchnikoff, E. (1880). Zur lehre über Insektenkrankheiten. *Zoologischer Anzeiger*, 3, 44–47.

Monzón, A. J., Guharay, F., & Klingen, I. (2008). Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2), 134–141.

Moyo, B., & Masika, P. J. (2009). Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4), 517-523.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.09.006>Moyo, B., & Masika, P. J. (2009). Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 517-523.

Nchu, F., Maniania, N. K., Hassanali, A., & Eloff, K. N. (2010). Optimizing modes of inoculation of *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae) with a mitosporic entomopathogenic fungus in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*, 51(4), 373-382.

Nogueira, M. R. da S., Camargo, M. G., Rodrigues, C. J. B. C., Marciano, A. F., Quinelato, S., Freitas, M. C. de, ... & Bittencourt, V. R. E. P. (2020). *In vitro* efficacy of two commercial products of *Metarhizium anisopliae* s.l. for controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, e000220. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120200035>

Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., da Silva Vaz Jr, I., Tanaka, T., & Ali, A. (2022). Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 941831.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s.f.). Control de garrapatas en el ganado. FAO. <https://www.fao.org/animal-health/areas-of-work/livestock-tick-control/es>.

Oteo Revuelta, J. A. (2016). Espectro de las enfermedades transmitidas por garrapatas. *Pediatría Atención Primaria*, 18, 47-51.

Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357-374.

- Peña-Eguren, G., Espinosa-García, E., & González-Garduño, R. (2022). Estrategias integradas para la producción ganadera sostenible en Veracruz. *Revista Tropical de Ciencias Agrícolas*, 40(1), 50-63. <https://doi.org/10.12345/rtc.v40i1.7890>
- Pérez-Martínez MB, Moo-Llanes DA, Ibarra-Cerdeña CN, Romero-Salas D, Cruz-Romero A, López-Hernández KM y Aguilar-Domínguez M. 2023. Worldwide comparison between the potential distribution of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under climate change scenarios. *Medical and veterinary entomology* 37(4): 745-753. <https://doi.org/10.1111/mve.12680>
- Pineda Lucatero, J. ., Figueroa Chávez, D. ., & Chan Cupul, W. . (2023). Eficacia del uso de hongos entomopatógenos con material inerte en el control biológico de garrapatas del ganado bovino. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 27(Especial), Págs 10–11. <https://doi.org/10.53897/RevAIA.23.27.12>
- Polanco-Echeverry, D. N., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95.
- Polar, C., Silva, J., & Mendes, A. (2018). *Análisis in vitro de *Beauveria bassiana* en larvas de *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileña de Control Biológico*, 26(2), 101-113.
- Polar, P., Kairo, M. T., Moore, D., Pegram, R., & John, S. A. (2005). Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160(2), 151-157.
- Pulido-Medellín, M. O., Rodríguez-Vivas, R. I., García-Corredor, D. J., Díaz-Anaya, A. M., & Andrade-Becerra, R. J. (2015). Evaluación de la eficacia de la CEPA MAF1309® de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* en Tunja, Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 56(2), 80-86.
- Quesada-Moraga, E., González-Mas, N., Yousef-Yousef, M., Garrido-Jurado, I., & Fernández-Bravo, M. (2024). Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. *Journal of Pest Science*, 97(1), 1-15.
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2004). Bionomics of *Beauveria bassiana* in relation to its efficacy against stored grain pests. *Biocontrol Science and Technology*, 14(7), 701 – 710. <https://doi.org/10.1080/09583150410001720588>

- Quinelato, S., Golo, P. S., Perinotto, W. M., Sá, F. A., Camargo, M. G., Angelo, I. C., ... & Bittencourt, V. R. (2012). Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* sl isolates on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4), 556-565.
- Rambaut, A. (2010). *FigTree v1. 3.1*. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Ramos, R. A. N., de Macedo, L. O., Bezerra-Santos, M. A., de Carvalho, G. A., Verocai, G. G., & Otranto, D. (2023). The role of parasitoid wasps, *Ixodiphagus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), in tick control. *Pathogens*, 12(5), 676.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Villela, H. S., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso Sánchez, H., ... & García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(1), 61-74.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., & Bárcenas, H. (2018). Economic impact of ticks on cattle in the neotropics: Current knowledge and perspectives for future studies. *Veterinary Parasitology*, 254, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.004>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*, 117(1), 3-29.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Pittman, N. C., & et al. (2006). Situación de la resistencia de *Rhipicephalus microplus* a acaricidas en México. *Veterinary Parasitology*, 139, 123-133.

Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.

Rojas Sandoval, L.A., Albarrán Portillo, B., Mondragón Ancelmo, J., Martínez García, C.G. and García Martínez, A. (2024). La Ganadería de doble propósito en trópico seco: diversidad de unidades de producción y orientación productiva. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.5459>

Rojo-Rubio, R., Vázquez-Armijo, J. F., Pérez-Hernández, P., Mendoza-Martínez, G. D., Salem, A. Z. M., Albarrán-Portillo, B., ... & Gutierrez-Cedillo, J. G. (2009). Dual purpose cattle production in Mexico. *Tropical animal health and production*, 41(5), 715-721.

Ribeiro-Silva, C. S., Muniz, E. R., Lima, V. H., Bernardo, C. C., Arruda, W., Castro, R. N., ... & Fernandes, É. K. (2022). Cuticular lipids as a first barrier defending Ixodid ticks against fungal infection. *Journal of Fungi*, 8(11), 1177.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

Salomón, O. D., Quintana, M. G., & Santini, M. S. (2020). Manual para la recolección de artrópodos vectores. Instituto Nacional de Medicina Tropical.

Salomon, J., Hamer, S. A., & Swei, A. (2020). A beginner's guide to collecting questing hard ticks (Acari: Ixodidae): a standardized tick dragging protocol. *Journal of Insect Science*, 20(6), 11.

Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S389-S403.

Sandoval, L. A. R., Portillo, B. A., Ancelmo, J. M., Garcia, C. G. M., & Martinez, A. G. (2024). Livestock dual purpose in dry tropics: cattle farms diversity and productive orientation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27(2).

Saueressig, T. (2007). Control racional de las parasitosis bovina con bajo impacto ambiental. XI Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil, 26.

Sessa, L., Oberti, H., Abreo, E., & Pedrini, N. (2024). *Beauveria bassiana* transcriptomics reveal virulence-associated shifts during insect lipid assimilation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 23.

Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7), 1267-1274.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2025). *Instructivo para la toma de muestras de interés en garrapata del bovino*. SENASA. Recuperado el 4 de mayo de 2025, de <https://biblioteca.senasa.gob.ar/items/show/4409>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Para prevenir la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas, es importante aplicar productos autorizados por Agricultura. <https://www.gob.mx/senasica/articulos/para-prevenir-la-resistencia-de-las-garrapatas-a-los-ixodicidas-es-importante-aplicar-productos-autorizados-por-agricultura>.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2024). *Situación actual del control de la garrapata *Boophilus spp.** Gobierno de México. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacionactual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2024. Fecha de consulta 20/05/2024 <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>

Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), 413-423.

Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12, 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>.

Siddique, I., Camarda, A., Friuli, M., Rhimi, W., Circella, E., Pugliese, N., ... & Cafarchia, C. (2025). *Beauveria bassiana* delivered through a cellulose-based hydrogel is effective against the red poultry mite, *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology*, 94(3), 41.

Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(4), 335-337.

Sorokin, N. (1883). *Plant parasites of man and animals as cause of infectious disease* [Parásitos vegetales del hombre y de los animales como causa de enfermedades infecciosas] (Vol. 2, pp. 268–292) [In Russian]. St. Petersburg.

Stafford, K. C., & Allan, S. A. (2014). Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 47(6), 1107-1115.

Tabor, A. E., Ali, A., Rehman, G., Rocha Garcia, G., Zangirolamo, A. F., Malardo, T., & Jonsson, N. N. (2017). Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 506.

Taylor, D. B. (2001). Acaricide metabolism and resistance. In *Veterinary Parasitology* (pp. 23–45). CABI Publishing.

Tofiño-Rivera, A. P., Ortega Cuadros, M., Pedraza Claros, B., Perdomo Ayola, S. C., & Moya Romero, D. C. (2018). Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. *Revista argentina de microbiología*, 50(4), 426-430.

Verocai, G. G., & Otranto, D. (2023). The role of parasitoid wasps, *Ixodiphagus* spp. (Hymenoptera: Encyrtidae), in tick control. *Pathogens*, 12(5), 676.

Vinogradov, D. D., Smagin, A. S., Belova, O. A., Tsurikov, S. M., Karganova, G. G., & Tiunov, A. V. (2024). Identification of soil-dwelling predators of tick nymphs (Acari: Ixodidae) by stable isotope labeling. *Journal of Medical Entomology*, 61(2), 512-516.

Wale, M., & Tadesse, E. (2021). *Efficacy of indigenous alcoholic beverage, Areki, against ticks on cattle in Woldia area of Ethiopia* [Preprint]. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/367931186> Efficacy of Indigenous Alcoholic Beverage Areki Against Ticks on Cattle in Woldia Area of Ethiopia

Walker, A. R. (2003). *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species* (Vol. 74). Edinburgh: Bioscience Reports.

Wang, Y., Fan, Q., Wang, D., Zou, W. Q., Tang, D. X., Hongthong, P., & Yu, H. (2022). Species diversity and virulence potential of the *Beauveria bassiana* complex and *Beauveria scarabaeidae* complex. *Frontiers in Microbiology*, 13, 841604.

Wrońska, A. K., Boguś, M. I., Włóka, E., Kazek, M., Kaczmarek, A., & Zalewska, K. (2018). Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus*. *PLoS One*, 13(3), e0192715.

Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., et al. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483. <https://doi.org/10.1038/srep00483>

Yean, S., Prasetyo, D. B., Ren, T., Krib, D., Sen, S., Chea, B., ... & Boyer, S. (2025). Seasonal dynamic of ticks infesting cattle (*Bos indicus*) farms in two provinces in Cambodia. *PloS one*, 20(4), e0320879.

Zhang, D., Qi, H., & Zhang, F. (2025). Parasitism by entomopathogenic fungi and insect host defense strategies. *Microorganisms*, 13(2), 283.

Zeina, G. W., & Laing, M. (2025). *Evaluation of fifteen adjuvants for compatibility with Beauveria bassiana and their synergistic efficacy against Rhipicephalus microplus ticks* (Preprint). SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5289450>

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(6), 553 – 596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

Zumaeta, V., Bardales, W., & Oliva, S. (2022). Patogenicidad in vitro de *Beauveria peruviana* en hembras adultas de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Revista de investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 2(2), 01-14.

Evaluation and Molecular Characterization of a Native *Beauveria bassiana* Isolate for the Biological Control of *Rhipicephalus microplus* in Tropical Cattle Production

Adara Patricia Molar Guerrero¹, Armando Arrieta-González², Karla Lissette Silva-Martínez³, Erika Andrea Hernández⁴

¹ Maestría en Producción Pecuaria Tropical, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Tantoyuca, Veracruz, México.

m233s0001@itsta.edu.mx

² Maestría en Producción Pecuaria Tropical, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Tantoyuca, Veracruz, México.

armando.arrieta@itsta.edu.mx

³ Maestría en Producción Pecuaria Tropical, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Tantoyuca, Veracruz, México.

karla.silva@itsta.edu.mx

⁴ Maestría en Producción Pecuaria Tropical, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca. Tantoyuca, Veracruz, México.

erika.hernandez@itsta.edu.mx

Abstract: *Rhipicephalus microplus* is a tick of major veterinary relevance that causes significant economic losses in tropical cattle production due to its blood-feeding behavior and its role as a vector of hemoparasites. The extensive use of chemical acaricides has led to the development of resistant tick populations, highlighting the need for sustainable biological alternatives. Among these, entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* have gained attention for their efficacy against arthropod pests and low environmental impact. This study aimed to evaluate the *in vitro* and *in situ* efficacy of a native *B. bassiana* isolate against engorged females of *R. microplus* and to confirm its taxonomic identity through multilocus phylogenetic analysis. Two treatments were applied by immersing ticks in 5 mL and 10 mL of a conidial suspension (1×10^8 conidia/mL), along with an untreated control group. Fungal infection was assessed based on the presence of external mycelial growth on tick cadavers. DNA was extracted from the fungal isolate, and the ITS, RPB1, and TEF1- α regions were amplified and sequenced. Phylogenetic analyses using Bayesian inference and maximum likelihood confirmed the identity of the isolate as *B. bassiana*, showing high similarity to known type strains. The treatments resulted in infection rates of 64.1% (5 mL) and 71.8% (10 mL), while no infection was observed in the control group. These findings demonstrate the potential of this native *B. bassiana* isolate as a biological control agent against *R. microplus* and support its integration into sustainable pest management strategies in tropical livestock systems.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Beauveria bassiana*, biological control, phylogenetic analysis.

1. INTRODUCTION

Cattle farming is one of the most important agricultural activities in Mexico, due to its contribution to food security and its impact on the economic and social development of rural regions. The Mexican tropics, particularly the warm-humid areas such as the state of Veracruz, offer favorable agroecological conditions for dual-purpose production systems, which are characterized by the simultaneous generation of meat and milk under extensive or semi-intensive management [1]. This activity represents a vital source of income for millions of small- and medium-scale producers, and it is estimated that over 60% of the national herd is concentrated in tropical regions [8]. In addition to providing meat and milk, the sector generates employment and strengthens local value chains.

However, tropical livestock production faces major sanitary challenges, primarily those associated with ectoparasite-borne diseases. Ticks are among the most harmful ectoparasites, as they compromise the health and productivity of cattle herds, causing substantial economic and social impacts [5]. Besides the physical damage caused by their hematophagous activity, ticks are vectors of serious diseases such as babesiosis and anaplasmosis, which lead to weight loss, reduced milk production, and, in severe cases, death of the animal [7].

The traditional control of these ectoparasites relies mainly on chemical acaricides. However, prolonged and intensive use has resulted in the emergence of *Rhipicephalus microplus* resistant strains, leading to increased production costs, reduced treatment efficacy, and environmental contamination risks [5; 2]. In response to these challenges, entomopathogenic fungi have emerged as viable and sustainable biological control alternatives. Among them, *Beauveria bassiana* stands out for its ability to infect a wide range of ectoparasite species without affecting non-target organisms or the environment [6]. This approach aligns with the principles

of Integrated Pest Management (IPM), as it allows the inclusion of biological control agents within broader and more sustainable strategies.

The tropical region of Veracruz has been identified as a priority area for implementing such strategies due to its relevance in national cattle production and the high incidence of *R. microplus* infestations [3-4]. Moreover, factors such as climate change, soil degradation, and overgrazing have increased the vulnerability of livestock systems in the region. Studies conducted in this area have shown that the application of *B. bassiana* can significantly reduce tick populations under field conditions, particularly when combined with other management practices such as pasture rotation and the selection of tick-resistant cattle breeds [4]. This integrated approach helps reduce dependence on chemical products and promotes the long-term sustainability of livestock production systems.

However, to ensure the efficacy and safety of *B. bassiana*-based bioproducts, it is essential to conduct precise taxonomic identification of fungal isolates and provide experimental evidence supporting their virulence and adaptation to local environmental conditions. In this context, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* efficacy of a native *B. bassiana* isolate against engorged females of *R. microplus* and to confirm its identity through multilocus phylogenetic analysis. The results of this research will contribute to the development of adapted biological control strategies for tropical livestock systems in Veracruz, aiming for more sustainable, profitable, and environmentally responsible cattle farming.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study Area

The study was conducted in five dual-purpose cattle production units in Tantoyuca, Veracruz, Mexico: Los Olivos, Mirador, Las Conchitas, El Orejón, and Veredas. The farms raise *Bos indicus* and crossbreeds (Cebu, Brahman, Suiz-Bú, and Swiss) under semi-intensive systems.

To avoid interference in the biological control evaluation, farms were selected based on the criterion that cattle had not been treated with chemical acaricides for at least 20 days prior to tick collection.

2.2 Collection of Engorged Female Ticks

In May 2024, 20 engorged females of *Rhipicephalus microplus* were collected from each farm (n = 100). Ticks were manually removed using precision forceps from typical attachment sites (ears, dewlap, dorsum, chest), applying gentle twisting to avoid injury [30]. Specimens were placed in labeled vials and transported to the laboratory at the Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca.

2.3 Tick Disinfection and Handling

Ticks were surface-disinfected by immersion in 1% sodium hypochlorite, rinsed with sterile distilled water, and placed in sterile Petri dishes for subsequent analysis.

2.4 Taxonomic Identification

Morphological identification was performed using a VELAB stereomicroscope and the taxonomic keys of [7] and [26]. Diagnostic features included scutum shape and ornamentation, palp dimensions, capitulum base morphology, presence of festoons, and spiracular plate structure. All specimens were identified as engorged females of *R. microplus*.

The title of the paper is centered 17.8 mm (0.67") below the top of the page in 24 point font. Right below the title (separated by single line spacing) are the names of the authors. The font size for the authors is 11pt. Author affiliations shall be in 9 pt.

2.5 In Vitro Bioassay with *Beauveria bassiana*

A native isolate of *Beauveria bassiana* (source: soil/pathogen; specify) was cultured on PDA medium under controlled conditions (25 ± 2 °C, 70–80% RH, 12 h photoperiod) and stored at 4 °C until use.

A conidial suspension (1 × 10⁸ conidia/mL) was prepared, and two immersion treatments were applied:

T1: 5 mL conidial suspension

T2: 10 mL conidial suspension

A control group received sterile distilled water with 0.01% Tween® 80. Each tick was immersed for 1 minute, dried on sterile absorbent paper, and incubated individually (27 ± 1 °C, $80 \pm 5\%$ RH). Mortality and external mycelial growth were recorded every 48 hours.

2.6 Experimental Design – In Vitro Assay

A completely randomized design was used. Each Petri dish represented an experimental unit, containing three ticks. The variables analyzed were tick mortality and time to death. The distribution of treatments and sample sizes is shown in Table 1.

Table 1: Experimental design of the in vitro assay: treatments with *Beauveria bassiana* and number of *Rhipicephalus microplus* ticks evaluated per treatment.

Treatment	Conidial concentration (conidia/mL)	Petri dishes	Ticks per dish	Total ticks
T1	8×10^6	13	3	39
T2	1×10^8	13	3	39
Control	—	13	3	39
Total	—	39	—	117

2.7 Collection of Engorged Ticks for Larval Infestation Study

Additional *R. microplus* engorged females were collected at Las Conchitas ranch (Tantoyuca, Veracruz) from Suiz-Bú cattle. Ticks were gently removed using precision forceps, avoiding damage to ensure viability. Specimens ($n = 150$) were placed in labeled vials and transported to the laboratory.

2.8 Egg Laying and Larval Hatching

Ticks were surface-sterilized with 1% sodium hypochlorite, rinsed with sterile distilled water, and dried on absorbent paper. Their integrity was verified under a stereomicroscope. Morphological identification was confirmed using the keys of [7].

Three females were placed in each Petri dish with a moist chamber and incubated at 27 ± 1 °C for 10 days to allow oviposition [27]. Larval hatching occurred approximately 20 days after the start of oviposition.

2.9 Field Evaluation of *Beauveria* spp. on Tick Larvae

The field trial was conducted at Pénjamo ranch in Tantoyuca, Veracruz, a sub-humid tropical zone with an average annual temperature of 23.3 °C and precipitation of 1,236 mm. The experimental area was a pasture of *Cynodon dactylon* divided into sun and shade plots, each with nine 9 m² parcels, bordered with 1.5 m margins to avoid larval dispersion.

Treatments applied:

T1 – B5 mL: 1×10^8 spores/mL

T2 – B10 mL: 8×10^8 spores/mL

T3 – Control: distilled water only

Treatments were applied manually every three days (18:00–19:00 h) to reduce solar exposure and maintain spore viability [28-29]. Weeds were removed biweekly, and calcium hydroxide was applied thrice weekly to reduce larval migration.

Larval counts were conducted weekly using the drag cloth method [25]. A white flannel cloth was dragged over vegetation in 1-minute transects. Samples were sealed in nylon containers and transported to the lab, where they were incubated for 5 hours prior to counting.

2.10 Experimental Design – Field Trial

A completely randomized design with six replicates per treatment was used. The evaluated variables were:

Larval mortality (%)

Oviposition reduction

Presence or absence of mycelial growth
Mortality was recorded weekly to assess population decline over time.

2.11 Statistical Analysis

All data were processed in Excel and analyzed using one-way ANOVA to determine significant differences between treatments ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm standard deviation.

2.12 Molecular Identification

2.12.1 DNA Extraction and Quantification

DNA was extracted from the fungal isolate using the CTAB 2% protocol [31], with a buffer composed of Tris-HCl (100 mM, pH 8.0), EDTA (2 mM), CTAB (2%), and NaCl (1.4 M). All procedures were performed under sterile conditions in a laminar flow hood disinfected with sodium hypochlorite and 76% ethanol.

Fungal mycelium was scraped with a sterile loop and transferred to a mortar containing 1,000 μ L of 2% CTAB solution. The homogenate was incubated at 96 °C for 90 minutes, followed by vortexing and addition of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After centrifugation (11,500 rpm, 15 min), the supernatant was extracted and the step repeated. DNA was precipitated with 100% cold ethanol (-20 °C) and incubated for 12 hours. The pellet was washed with 70% isopropanol, air-dried, and resuspended in 100 μ L of HPLC-grade water. DNA was stored at -20 °C.

DNA concentration and purity were measured by spectrophotometry using 2 μ L of sample.

2.12.2 PCR Amplification and Gel Electrophoresis

The ITS, RPB1, and RPB2 regions were amplified using specific primers. The PCR mix included HPLC-grade water, buffer, dNTPs, Taq polymerase, and primers. Each reaction contained 3 μ L of DNA and 12 μ L of reaction mix.

PCR products were separated via 1.5% agarose gel electrophoresis in $1\times$ TAE buffer. Gels were stained and visualized under UV light to confirm the presence of bands corresponding to expected molecular weights.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Taxonomic Identification of Ticks

The ectoparasite identified in this study corresponds to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, commonly known as the cattle tick. Morphologically, *R. microplus* presents an oval body. Males exhibit a visible dorsal scutum with ornamentation, while females significantly expand during blood feeding, reaching up to 12 mm in length. Diagnostic features include short palps, a specialized piercing-sucking mouthpart, robust legs, and a forward-oriented capitulum—characteristic of the *Boophilus* subgenus.

R. microplus is a monoxenous tick, completing its entire life cycle on a single host, typically cattle. It holds high relevance in veterinary medicine due to its role as a vector of hemoparasites such as *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*, causative agents of bovine babesiosis (“tristeza bovina”).

Identification was confirmed morphologically using the taxonomic keys proposed by [9], based on features such as the shape and ornamentation of the scutum, palp length and arrangement, hypostome dentition, and the morphology of legs, spiracles, and genital plates. All specimens were accurately identified as *R. microplus* females.

3.2 In Vitro Efficacy of *Beauveria bassiana* Against Engorged Females of *Rhipicephalus microplus*

The *in vitro* bioassay consisted of two treatments: immersion of ticks in 5 mL and 10 mL of a conidial suspension (1×10^8 conidia/mL), plus a control group with no fungal application. Fungal infection was confirmed by the presence of external mycelial growth.

Fungal infection was observed in 64.1% of ticks treated with 5 mL and in 71.8% of those treated with 10 mL, while no infection

was detected in the control group (Table 2). A chi-square test ($\chi^2 = 19.185$; $p < 0.0001$) indicated significant differences among treatments, confirming the effectiveness of *B. bassiana* in colonizing *R. microplus* females.

Table 2: Mycelial growth in engorged females of *R. microplus* treated with *B. bassiana*

Treatment	Mycelium Present (P ⁺)	Mycelium Absent (A ⁻)
B5 mL	25	14
B10 mL	28	11
Control	0	39

These findings support the infective capacity of *B. bassiana*, even at the engorged stage, one of the tick's most resistant phases. Similar results were reported by [10], who evaluated *B. peruviansis* and observed up to 92% mortality in engorged females at concentrations of 1×10^9 conidia/mL, along with a 60% reduction in oviposition. Although mortality was not directly measured in this study, the high incidence of visible mycelium suggests lethal or sublethal infection.

In Mexico, [11] also demonstrated over 75% mortality in adult females of *R. microplus* and more than 25% reduction in viable egg numbers when exposed to native strains of *B. bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. More recently, [12] evaluated native fungal isolates against *Amblyomma mixtum* larvae and reported clinical mortality rates exceeding 24%, highlighting the versatility of entomopathogenic fungi across tick genera.

Similarly, [24] observed over 90% mortality in *Amblyomma maculatum* exposed to 10^8 conidia/mL of *M. anisopliae*, with fungal colonization in more than 70% of treated individuals. These findings reinforce the feasibility of entomopathogenic fungi as viable alternatives to chemical acaricides in tropical tick control.

Overall, the results of this study confirm the potential of *B. bassiana* as a sustainable alternative to chemical acaricides. Fungal infection of engorged females may disrupt the reproductive cycle by reducing oviposition capacity and egg viability [11], thus contributing to long-term tick population management.

3.3 In Situ Evaluation of *Beauveria bassiana* Against Larvae of *Rhipicephalus microplus* on *Cynodon dactylon*

Field trials evaluated two concentrations of *B. bassiana* (1×10^8 and 8×10^6 conidia/mL) under sun and shade conditions over three evaluation periods. Two variables were analyzed: number of live larvae and presence of external mycelium.

The Shapiro-Wilk test indicated non-normal data distribution ($p < 0.0001$); therefore, mixed models and analysis of variance (ANOVA) were applied. ANOVA results for mycelial presence showed significant effects of treatment, light condition, and evaluation date, as well as their interactions. However, Student's t-test detected no significant differences between sun and shade conditions ($p = 0.4646$), although a slightly higher mean mycelial presence was recorded under shade (7.65) compared to full sun (6.67).

For the variable "number of live larvae," neither the dose nor the application condition alone showed a statistically significant effect. However, the evaluation period was a key factor ($F = 308.1$; $p < 2.2 \times 10^{-16}$), suggesting that treatment success was strongly influenced by temporal and environmental conditions.

These findings are consistent with previous reports highlighting the influence of abiotic factors such as humidity, temperature, and solar radiation on fungal conidial viability and infection rates in natural environments. For instance, [23] demonstrated that UV exposure and low humidity significantly reduced the efficacy of entomopathogenic fungi under open-field conditions.

The significant interactions between dose, application condition, and evaluation period underscore that fungal efficacy does not rely on a single factor but rather on a combination of environmental and operational variables. This highlights the importance of designing application strategies that consider seasonality and microenvironmental variation in tropical livestock systems.

Together with findings from previous studies, the results from this trial support the integration of native *B. bassiana* strains into Integrated Tick Management (ITM) programs, particularly in tropical regions like Tantoyuca, Veracruz, where agroecological conditions favor spore persistence and activity.

3.4 Molecular Identification of the Native *Beauveria* Isolate

A consensus sequence was obtained by assembling the full ITS region and partial fragments of RPB1 and TEF1- α using BioEdit v7.0.5 [17]. Multiple sequence alignment was performed with MAFFT v7.475 [19], and sequences were compared with type strains in public databases (GenBank, UNITE, BOLD Systems), using *Cordyceps javanica* (NR_111172) as an outgroup. Gene alignments were concatenated in Mesquite v3.6 [20].

Evolutionary model selection was conducted with jModelTest v2 [21]. Phylogenetic analyses were performed using Bayesian inference MrBayes v3.2.1 [32] and maximum likelihood raxmlGUI 1.5b2 [22]. For MrBayes, four Markov chains were run for two million generations, with a 25% burn-in. For ML analysis, a rapid bootstrap with 1,000 replicates under the GTR+G model was used. Resulting trees were visualized with FigTree v1.4.4 [18] and MEGA7 (Figure 1).

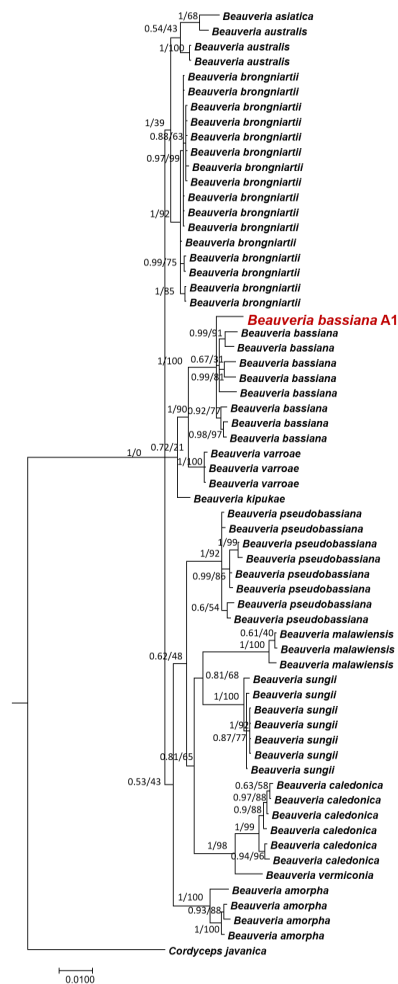


Figure 1. Phylogenetic tree of *Beauveria* strains constructed using concatenated multilocus data.

The use of multiple markers (ITS, TEF1- α , RPB1) is well supported in the literature for resolving species boundaries within *Beauveria*. MAFFT provides accurate alignments for both ribosomal and protein-coding regions [19], and BioEdit is reliable for raw sequence editing [17]. Studies by [15] and [16] have shown that

multilocus datasets including ITS, TEF, RPB1, RPB2, and Bloc resolve robust clades within the *B. bassiana* complex.

In a recent comprehensive study, [14] applied multilocus phylogeny and five DNA-based species delimitation methods, based on genetic distance, coalescent theory, and genealogical concordance, demonstrating that polyphasic approaches are essential for robust species delineation in *Beauveria*. Their results supported the delimitation of 20–28 species, revealed cryptic diversity in *B. bassiana* and related taxa, and led to the formal description of *B. peruviana* from northeastern Peru. Notably, their findings emphasized that congruence among methods, especially multilocus phylogeny, genetic distance, and coalescent analyses, provides reliable support for species boundaries in this genus.

These insights reinforce the approach adopted in the present study and highlight the importance of integrating multilocus phylogenetic frameworks when characterizing native isolates for potential biocontrol applications.

Notably, [15] demonstrated that combining RPB1, Bloc, and TEF1- α provides strong statistical support for cryptic species delimitation within *Beauveria*, using both Bayesian and ML approaches. Similarly [13], using six loci including ITS and RPB1, confirmed the existence of numerous cryptic species in the genus.

The selection of these markers and bioinformatics tools aligns with current standards in fungal phylogenetics. MrBayes provides detailed posterior probability estimates, while RAxML is known for computational efficiency and high bootstrap support. The congruence between both phylogenetic methods in this study strengthens the reliability of the final tree and taxonomic resolution.

The results validate the taxonomic identification of the isolate, positioning it within a well-supported *Beauveria* clade. Its phylogenetic placement confirms its identity and supports its candidacy as a genetically coherent and ecologically relevant biocontrol agent.

4. CONCLUSIONS

This study demonstrates the potential of a native isolate of *Beauveria bassiana* as an effective biological control agent against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* under both laboratory and field conditions in tropical environments. *In vitro* bioassays confirmed the pathogenicity of the fungus, with infection rates exceeding 70% in engorged females, highlighting its virulence even in the most resistant stage of the tick's life cycle.

Field trials revealed that although environmental variables such as light exposure and spore concentration influenced fungal activity, the evaluation period was the most critical factor affecting larval population dynamics. These findings underscore the importance of optimizing application strategies according to seasonal and microclimatic conditions to enhance fungal efficacy in pasture systems.

References

- [1] Rojo-Rubio, R., Vázquez-Armijo, J. F., Pérez-Hernández, P., Mendoza-Martínez, G. D., Salem, A. Z. M., Albarrán-Portillo, B., et al. (2009). Dual purpose cattle production in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 41(5), 715–721.
- [2] George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129(S1), S353–S366.
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2019). Encuesta Nacional Agropecuaria 2019. <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2019/>
- [4] Lucero, J., Manzano, J., Loaiza, I., & Orellana, Y. (2024). Producción de *Beauveria bassiana* para la formulación de bioplaguicidas. *La Granja*, 113–129.
- [5] Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3–29.

- [6] Alonso-Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2021). Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 657694. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.657694>
- [7] Guglielmo, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., & Horak, I. G. (2014). *The hard ticks of the world* (Vol. 10, pp. 978–994). Dordrecht: Springer.
- [8] Rojas Sandoval, L.A., Albarrán Portillo, B., Mondragón Ancelmo, J., Martínez García, C.G., & García Martínez, A. (2024). La Ganadería de doble propósito en trópico seco: diversidad de unidades de producción y orientación productiva. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 27(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.5459>
- [9] Walker, A. R. (2003). *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species* (Vol. 74). Edinburgh: Bioscience Reports.
- [10] Zumaeta, V., Bardales, W., & Oliva, S. (2022). Patogenicidad in vitro de *Beauveria peruviansis* en hembras adultas de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Revista de investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*, 2(2), 01–14.
- [11] Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., & Alonso-Díaz, M. A. (2012). First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), 338-342. [10.1016/j.vetpar.2011.07.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.028)
- [12] Alonso-Díaz, M. A., Jiménez-Ruíz, M., & Fernández-Salas, A. (2022). First evidence of the tickicidal effect of entomopathogenic fungi isolated from Mexican cattle farms against *Amblyomma mixtum*. *The Journal of Parasitology*, 108(6), 539–544.
- [13] Wang, Y., Fan, Q., Wang, D., Zou, W. Q., Tang, D. X., Hongthong, P., & Yu, H. (2022). Species diversity and virulence potential of the *Beauveria bassiana* complex and *Beauveria scarabaeidicola* complex. *Frontiers in Microbiology*, 13, 841604.
- [14] Bustamante, D. E., Oliva, M., Leiva, S., Mendoza, J. E., Bobadilla, L., Angulo, G., & Calderon, M. S. (2019). Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. nov. *Mycology*, 58, 47.
- [15] Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84–98. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- [16] Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055–1073.
- [17] Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- [18] Rambaut, A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- [19] Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
- [20] Maddison, W. P. (2008). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. *Evolution*, 62, 1103–1118.
- [21] Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772.
- [22] Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(4), 335–337.
- [23] Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 23–69). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- [24] Kirkland, B. H., Westwood, G. S., & Keyhani, N. O. (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 705–711.
- [25] Salomón, J., Hamer, S. A., & Swei, A. (2020). A beginner's guide to collecting questing hard ticks (Acari: Ixodidae): a standardized tick dragging protocol. *Journal of Insect Science*, 20(6), 11.
- [26] Bautista-Garfias, C. R. (2006). *Entomología veterinaria esencial*. Ed. INIFAP, México DF, México.

- [27] Jaén-Torrijos, M., Álvarez-Calderón, V., Quintero-Noriega, R., Espinales, K., Rangel-Tapia, G., & Quintero-Vega, N. (2015). Sensibilidad al clorpirifos y cipermetrina en la garrapata *Rhipicephalus microplus* en fincas ganaderas de Panamá. *Ciencia Agropecuaria*, (22), 70–77.
- [28] Nchu, F., Maniania, N. K., Hassanali, A., & Eloff, K. N. (2010). Optimizing modes of inoculation of *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae) with a mitosporic entomopathogenic fungus in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*, 51(4), 373–382.
- [29] Polar, P., Kairo, M. T., Moore, D., Pegram, R., & John, S. A. (2005). Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160(2), 151–157.
- [30] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2025). Instructivo para la toma de muestras de interés en garrapata del bovino. SENASA. <https://biblioteca.senasa.gob.ar/items/show/4409>
- [31] Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In: *Molecular Techniques in Taxonomy* (pp. 283–293). Berlin: Springer.
- [32] Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>



Documentos



GOBIERNO DEL ESTADO DE VERACRUZ 2024 - 2030

SEV SECRETARÍA DE EDUCACIÓN DE VERACRUZ

SEMSys SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR



DET



FORMATO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS DE POSGRADO

Tantoyuca, Ver., a 12 de Agosto de 2025.

C. Adara Patricia Molar Guerrero PRESENTE:

De acuerdo al dictamen emitido por el jurado asignado para la revisión de su Trabajo Profesional, integrado por los siguientes catedráticos:

PRESIDENTE: Dra. Karla Lissette Silva Martínez
SECRETARIO: Dr. Armado Arrieta González
VOCAL: Dra. Erika Andrea Hernández
SUPLENTE: Dr. Oscar del Ángel Piña

Y considerando que cumple con todos los requisitos del reglamento de titulación en vigor del Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, doy a usted la autorización para que proceda a imprimir su Trabajo de Posgrado para titulación por la:

Opción de "TESIS" cuyo nombre del trabajo es:

"Uso de microorganismos benéficos para el control de garrapatas análisis in vitro e in situ"

Lo anterior lo hago de su conocimiento para los fines correspondientes a su Examen de Grado de **Maestro en Producción Pecuaria Tropical**, por lo cual deberá entregar al encargado de Titulación de Posgrado un ejemplar de su documento final de tesis empastado en color vino con letras doradas y cuatro CD's (debidamente rotulados) en archivo PDF, así como donar un libro (nuevo) de su LGAC al Centro de Información (Biblioteca).

Esperando que el logro del mismo sea congruente con sus deseos profesionales.

ATENTAMENTE

Dr. Julio Meza Hernández
Director Académico



C.c.p. Servicios Escolares. Titulación de Posgrado

Desviación Lindero Tametate S/N, Col. La Morita, C.P. 92100, Tel: (+52) 789 893 2503 ext. 101
www.itsta.edu.mx



POR AMOR A VERACRUZ

R02/0820

F-PG-03



GOBIERNO DEL ESTADO DE VERACRUZ 2024 - 2030

SEV SECRETARÍA DE EDUCACIÓN DE VERACRUZ

SEMSyS SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR

DET



Tantoyuca, Veracruz a 12 de Agosto de 2025

Yo, Adara Patricia Molar Guerrero, alumno (a) de la carrera de Maestría en Producción Pecuaria Tropical, con número de control M233S0001, por medio del presente declaro mi conformidad para ceder los derechos del proyecto: Uso de microorganismos benéficos para el control de garrapatas análisis in vitro e in situ, desarrollado en: Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, durante el periodo comprendido del 01 de octubre del 2023 al 01 de septiembre del año 2025 del cual declaro:

- Que es inédito
• Que es de mi autoría y me hago responsable por su contenido
• Que autorizo al Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca para que, en el caso de que sea requerido pueda hacer uso libre de la totalidad del contenido del proyecto, para que sea desarrollado o divulgado en cualquier medio impreso o electrónico.
• El presente instrumento no contempla remuneración alguna por la transferencia de los derechos sobre dicho} proyecto.

Lo anterior con el fin de que quede expresamente asentado mi consentimiento total a favor del instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca en todo lo relativo al proyecto en mención.

Para constancia firma:

Vo. Bo.

Handwritten signature of Adara Patricia Molar Guerrero

Adara Patricia Molar Guerrero
Nombre y firma del(a) alumno(a)

Handwritten signature of Dra. Karla Jissette Silva Martínez

Dra. Karla Jissette Silva Martínez
Nombre y firma del asesor interno.





ANEXOS

Congresos





LA ACADEMIA ENTOMOLÓGICA DE MÉXICO A. C.

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Adara Patricia Molar Guerrero

Por su participación como **PONENTE ORAL** del trabajo:

CONTROL IN VITRO DE GARRAPATAS MEDIANTE EL USO DE *Beauveria*, con la autoría de Adara Patricia Molar-Guerrero, Karla Lissette Silva-Martínez, Armando Arrieta-González, Erika Andrea-Hernández y Oscar Del Ángel-Piña expuesto en el LIX Congreso Nacional de Entomología, celebrado en San Luis Potosí del 23 al 26 de junio de 2024.


 Dr. José Antonio Sánchez García
 Presidente


 Dra. Juana María Coronado Blanco
 Presidente del Comité Organizador Nacional


 Dra. María Guadalupe Galindo Mendoza
 Presidente del Comité Organizador Local

San Luis Potosí, San Luis Potosí, a 26 de junio de 2024





**EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
A TRAVÉS DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COLIMA**

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

ADARA PATRICIA MOLAR GUERRERO

POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN PRESENTANDO EL PROYECTO
TLALNEMILIZTLI, DE LA **CATEGORÍA SECTOR AGROALIMENTARIO**
EN EL CERTAMEN DE PROYECTOS (NIVEL POSGRADO), DE LA
CUMBRE NACIONAL DE DESARROLLO TECNOLÓGICO, EMPRENDIMIENTO E INNOVACIÓN,
INNOVATECNM 2024
ETAPA NACIONAL

CELEBRADO DEL 19 AL 22 DE NOVIEMBRE
CIUDAD DE VILLA DE ÁLVAREZ, COLIMA A 22 DE NOVIEMBRE DE 2024

ANDREA YADIRA
ZARATE FUENTES
**SECRETARIA DE EXTENSIÓN
Y VINCULACIÓN**

HUGO ERNESTO
CUÉLLAR CARREÓN
**DIRECTOR DEL
IT DE COLIMA**



Participación en eventos



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



La Asociación Mexicana de Sistemática de Artrópodos AMXSA

Otorgan la presente constancia a:

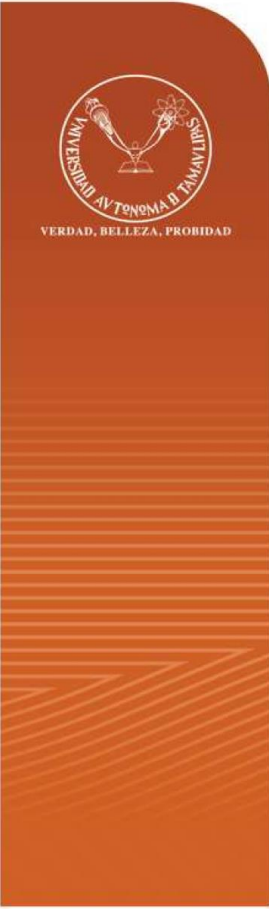
Ángel Adalberto Morales Meléndez, Adara Patricia Molar Guerrero, Armando Arrieta González y Karla Lissette Silva Martínez

Por su participación con la presentación del cartel titulado:

“Listado de ectoparásitos (ácaro y moscas) presentes en ranchos ganaderos de la huasteca norte del estado de Veracruz”, en el marco del IV Congreso de la Asociación Mexicana de Sistemática de Artrópodos, realizado el 28 de marzo en el Instituto de Ecología, A.C. INECOL.

Xalapa, Veracruz, a 28 de marzo de 2025

Andrés Ramírez Ponce
Presidente de la AMXSA



RECONOCIMIENTO a:

Molar Guerrero A. P., Silva Martínez K. L., Arrieta González A., Hernández E. A.

Por haber obtenido el 3er Lugar en el Concurso de Carteles de la Categoría Posgrado con el tema “Beauveria COMO AGENTE DE CONTROL in vitro PARA GARRAPATAS” en el 2º Congreso Interuniversidades “Sustentabilidad en la Producción Agropecuaria y Manejo de Recursos Naturales” dentro 2º. Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y Producción Animal 2024, del 14 al 18 de octubre del 2024 en Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

“Verdad, Belleza, Probiidad”

Dr. Flaviano Benavides González
Director



Dra. María de la Luz Vázquez Saucedo
Jefa de la División de Posgrado e Investigación





Estancia



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE · COICUILA · MONTECILLO · PUEBLA · SAN LUIS POTOSÍ · TABASCO · VERACRUZ

Hoja 6 de 7
#0001

CAMPUS MONTECILLO
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

SUB.INV. /CM.-06/25

Asunto: CONCLUSIÓN DE ESTANCIA ACADÉMICA
Montecillo, Texcoco Edo. de México, a 09 de enero de 2025.

DR. OSCAR DEL ÁNGEL PIÑA
DIRECTOR GENERAL
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TANTOYUCA
VERACRUZ, MÉXICO.
PRESENTE.

Por este conducto informo a Usted, que la C. Adara Patricia Molar Guerrero, con número de control M233S0001, **concluyo satisfactoriamente su Estancia Académica** en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, en el periodo comprendido del 18 de noviembre al 30 de diciembre de 2024. En la que desarrollo las actividades propuestas al inicio de su estancia relacionadas con el objetivo: **"Extracción de DNA, ampliación por PCR de genes ribosomales y multilocus, electroforesis con gel agarosa y limpieza de productos de PCR"**, bajo la supervisión de la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, Profesora Investigadora Titular, del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Producción de Semillas.

Asimismo, expreso el interés que tiene el Colegio en la participación interinstitucional para el fortalecimiento de nuestras capacidades para atender la formación de recursos humanos y el desarrollo de la investigación agrícola.

Sin otro particular de momento, quedo de Usted.

Atentamente
Subdirectora de Investigación
Campus Montecillo

Dra. Antonia Macedo Cruz

C.c.p. Dr. Oscar Javier Ayala Garay, Coordinador del Posgrado de REGEP-Producción de Semillas, C.M., presente.

C.c.p. Dra. Hilda V. Silva Rojas, Producción de Semillas, C.M., presente.

C.c.p. C. Adara Patricia Molar Guerrero, Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, Veracruz, México, presente.

AMC/viris*



Retribución social



GOBIERNO DEL ESTADO DE
VERACRUZ
2024 - 2030

SEV
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
DE VERACRUZ

SEMSys
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN
MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR



DET
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN
TÉCNICA



Constancia de actividades de retribución social

Ciudad de México a 05 de junio del 2025

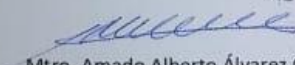
A quien corresponda:

Presente.

En cumplimiento a lo establecido en el *Artículo 20, Capítulo VII. De la Conclusión de la Beca o Apoyo*, del *Reglamento de Becas de la Secretaría de Ciencia, Humanidades Tecnología e Innovación*, y en el marco de la Convocatoria registro de programas y matriculas del sistema nacional de posgrados 2023-2 hago constar que el (la) **C. Adara Patricia Molar Guerrero** con número de CVU **2000862 beneficiado(a)** con una beca para obtener el grado de Maestría en el programa **Producción Pecuaria Tropical**, que se imparte en el Instituto Tecnológico Superior de Tantoyuca, realizó las actividades de retribución social durante el periodo de vigencia de la beca tiempo en el que fue **alumno(a)** regular de esta Institución.

Asimismo, hago constar que, conforme a lo establecido en la Ley General de Archivos, la coordinación del posgrado organiza y conserva la evidencia documental de dichas actividades en caso de que la SECIHTI o cualquier otra instancia la requieran.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.


Mtro. Amado Alberto Álvarez Cepeda

Jefe de Posgrado e Investigación



POR AMOR A
VERACRUZ



Inglés



IELTS English Language Test

in collaboration with
GLOBAL ENGLISH COURSE PARE

RVOE: 421.9/649/418.47/2015

This is to certify that

Name: Adara Patricia Molar Guerrero
Date of Birth : September 14, 1999
Test Date : October 21, 2024

has taken **English Proficiency Test** and achieved the following scores

Reading A : 49
Structure A : 48
Listening A : 49
Total Correct Point : 146
Prediction Score For TOEFL : 415

Proficiency Level : Intermediate

This certificate is acceptable until October 21, 2026

TOEFL is a registered trademark of Educational Testing Service (ETS)
This document is not endorsed or approved by ETS

