

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: MEDIO AMBIENTE

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA LA
OBTENCIÓN DE INGENIERO EN MEDIO AMBIENTE**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**MICROORGANISMOS (HONGOS Y BACTERIAS “género
Bacillus”) ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO EN
DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL CANTÓN
PORTOVIEJO**

AUTORES:

MENDOZA RODRÍGUEZ MARÍA DANIELA

PAZMIÑO MERA ANGGIE JUDITH

TUTORA:

ING. SILVIA MONTERO CEDEÑO

CALCETA, FEBRERO 2021

DERECHOS DE AUTORÍA

MENDOZA RODRIGUEZ MARIA DANIELA con cédula de ciudadanía 1312910787 y **PAZMIÑO MERA ANGGIE JUDITH**, con cédula de ciudadanía 1313537878, declaran bajo juramento que el trabajo de titulación titulado: **MICROORGANISMOS (HONGOS Y BACTERIAS “género Bacillus”) ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL CANTÓN PORTOVIEJO** es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e innovación.



**MENDOZA RODRÍGUEZ MARÍA
DANIELA**



PAZMIÑO MERA ANGGIE JUDITH

CERTIFICACIÓN DE TUTORA

SILVIA MONTERO CEDEÑO certifica haber tutelado el trabajo de titulación **MICROORGANISMOS (HONGOS Y BACTERIAS “género Bacillus”)** **ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL CANTÓN PORTOVIEJO**, que ha sido desarrollada por **Mendoza Rodríguez María Daniela** y **Pazmiño Mera Anggie Judith**, previa la obtención del título de Ingenieros en Medio Ambiente, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de La Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



ING. SILVIA MONTERO CEDEÑO

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han APROBADO el trabajo de titulación **MICROORGANISMOS (HONGOS Y BACTERIAS “género Bacillus”) ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL CANTÓN PORTOVIEJO**, que ha sido

Propuesta, desarrollada y sustentada por **Mendoza Rodríguez María Daniela y Pazmiño Mera Angie Judith**, previa la obtención del título de Ingenieros en Medio Ambiente, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Ing. Julio Abel Loureiro Salabarría,
M.Sc.
Miembro del tribunal



Ing. Carlos Fabián Solórzano
Solórzano, M.Sc.
Miembro del tribunal



Ing. Teresa Vivas Saltos, M.Sc
Presidente del tribunal

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiarme, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Por su trabajo y sacrificio en todos estos años a mi padre Rolando Mendoza Chávez como también a mis hermanos Leonora Mendoza y Rolando Mendoza por siempre estar presente a lo largo de esta de mi vida.

Y en especial a mi enamorado Cristhian Cedeño por el ser el principal promotor de este sueño realizado, ser mi guía, por confiar y creer en mi a lo largo de mi carrera universitaria, infinitamente gracias por ser mi paño de lágrimas como también mi arco iris.

A la Ing. Silvia Montero, tutora de la tesis por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

A los docentes miembros del tribunal por darnos sus conocimientos y paciencia al llevar a cabo nuestra investigación.

Y no por último y menos importante a mi mascota Popito por ser mi alegría durante este proceso cansado pero satisfactorio que siempre estuvo presente para demostrarme mediante un gesto que podía seguir adelante.

MARÍA DANIELA RODRÍGUEZ MENDOZA

DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico principalmente a Dios, por ser el inspirador para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados en mi vida profesional.

En especial a mi abuelita Onelia que fue una de mis mayores inspiraciones para nunca decaer y siempre seguir adelante porque sé que estando en el cielo siempre estuvo guiándome llevándome por el camino correcto.

MARÍA DANIELA RODRÍGUEZ MENDOZA

AGRADECIMIENTO

Comenzare agradeciendo a la vida por permitirme vivirla y a Dios por no soltar mi mano.

Quiero agradecer a mi madre AB. María Mera; por apoyarme en cada decisión de mi vida, por toda la confianza puesta en mí y darme las herramientas necesarias para poder volar sola, a mi padre Ing. Cesar Pazmiño por amarme, aconsejarme y nunca dejarme sola, por guiarme para ser mejor humano siempre.

A mis hermanos Adriana, Fernanda, Kelin y Alejandra; que suponen benefactores de importancia inimaginable puesta sobre mi persona, especialmente cuando he necesitado su mejor apoyo.

A mi querido Adriel, quiero agradecerle por ser mi mejor medicina en tiempos difíciles, por llenarme de amor y alegría; llegaste en el momento que quería renunciar a todo y me motivas a ser mejor siempre.

A mi compañero de siempre por apoyarme día a día y demostrarme que soy mucho más de lo que imagino, gracias por siempre animarme y no abandonarme; este logro es gracias a ti Jonathan Hidalgo.

A mis queridos profesores por entregarme todos sus conocimientos a diarios; en especial a la Ing. Teresita por demostrarme que todavía existen personas con el don de MAESTRO, el Ing. Ricardo Villafuerte por su cariño y motivación para conmigo. Los llevare siempre en mi corazón.

Quiero agradecer a mi amiga y ahora compañera de tesis Daniela Mendoza por ser un pilar fundamental en la realización de este trabajo de investigación por entregar todo su esfuerzo y no rendirse, a su novio Cristhian por apoyarnos y entregarnos su experiencia para hacer de nuestra investigación un éxito.

No tengo palabras para agradecer a mi querido grupo de amigos que estuvieron desde el día 1 de este camino, gracias por no abandonarnos ni en el peor momento, gracias por alegrarnos en nuestros días difíciles cuando nuestra familia estaba lejos, gracias por permitirnos terminar esta etapa juntos, gracias por siempre estar presente, dicen que en la universidad no encuentras amigos;

pero yo encontré hermanos para toda la vida: Paul, Betzabeth, Vanessa y Francesca.

Quiero dedicarle todo mi agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Manabí por darme la oportunidad de convertirme en una Ingeniera Ambiental como lo soñé, por ser mi hogar durante estos años y permitirme sobrepasar mis límites educativos y personales; a todas las personas que conforman tan hermosa universidad, desde que entraba y me recibían los amables conserjes don Nacho y don Antonio, hasta mi querida directora de Carrera Dra. Ayda De la Cruz a quien admiro y quiero mucho por siempre motivarme a ser mejor y confiar en mí; y los amigos que esta me regalo: Yardel, Gema, Erick, Flores, Nicole, Anthoni.

DEDICATORIA

Este presente trabajo está dedicado principalmente para mi querida prima Freyita Vera quien me acompaña desde el cielo y celebra conmigo este logro como siempre lo soñamos desde que entre a la universidad; esto va por ti mi prima Vera. A mí querida madrina que me acompaña desde el cielo y me recuerda sus sabias palabras siempre, doña Marlene Castillo quien me animo a estudiar en la ESPAM y con quien siempre hablábamos de cuando me gradué, esto va por usted doña Marle, lo logramos. Con todo mi amor y esfuerzo plasmado aquí, dedico mi tesis a mis padres Ab. María Mera e Ing. Cesar Pazmiño por criarme con amor, reglas y ciertas libertades que hicieron de mí una mujer con carácter. A mí querido sobrino Kelin Alexis porque de él aprendí que debía arriesgarme a todo lo que quería, y este trabajo fue de mucha lucha, y dedicación, sinónimo de lo que él es y por lo que lo amo.

A mis queridas sobrinas Gabriela y Adriana por llenarme de amor, dulzura y motivación; por ser mis más grandes admiradoras, y quienes me motivan a entregar todo mi esfuerzo para hacer que las cosas sean excelentes, todas esas cualidades están plasmadas en este trabajo de investigación. Dedico este trabajo a mi querida hermana Adriana, por ser mi gran apoyo y escucharme cuando las cosas no salían bien, quien me daba ánimos para hacer que este trabajo sea posible y sobre pasar todos los obstáculos que se me presentaron. Este trabajo de investigación va dedicado a Don Simón un padre para mí, quien me ha apoyado en toda mi carrera universitaria y en la etapa final de mi proyecto fue de gran importancia.

Dedico con todo mi amor este trabajo de investigación a Jonathan Hidalgo por ser mi compañero en las buenas y malas, por ayudarme a plasmar todo mi conocimiento aquí y por apoyarme en cada momento, este es el comienzo de muchos logros juntos. Por último, pero no menos importante este trabajo de investigación va dedicado para MI NIÑA INTERIOR, por tu constancia, por tu fortaleza, tu inteligencia y por tu persistencia para que este trabajo sea un éxito.

PAZMIÑO MERA ANGGIE JUDITH

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTORA	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	x
FIGURAS.....	xiii
GRÁFICOS.....	xiii
TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
PALABRAS CLAVES:	xiv
ABSTRACT.....	xv
KEYWORDS:.....	xv
CAPITULO 1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACION DEL PROBLEMA.	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	2
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. HIPÓTESIS	4
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. CACAO.....	5
2.2. CACAO A NIVEL MUNDIAL.....	5
2.3. CACAO EN ECUADOR	6

2.4.	SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CACAO	6
2.5.	SISTEMAS AGROFORESTALES	7
2.6.	VENTAJAS DE LOS SISTEMAS AGROFORESTALES.....	7
2.7.	SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGROFORESTAL	
	SIMULTÁNEOS.....	8
2.8.	MICROBIOLOGÍA DEL SUELO	8
2.9.	CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL SUELO	9
2.10.	CALIDAD DEL SUELO.....	9
2.11.	IMPORTANCIA DE BIODIVERSIDAD EN EL SUELO.....	9
2.12.	MICROORGANISMO EN LA RIZOSFERA	9
2.13.	PREPARACION DE LOS MEDIO DE CULTIVO.....	9
2.14.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	
	(AISLAMIENTO)	10
2.15.	MÉTODO	10
2.16.	TINCIÓN DE GRAM	10
2.17.	OBSERVACIÓN MACROSCÓPICAS	11
2.18.	OBSERVACION MICROSCÓPICAS.....	11
2.19.	HONGOS	12
2.20.	HONGOS EN EL SUELO.....	12
2.21.	IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN EL SUELO	12
2.22.	BACTERIAS	12
2.23.	GÉNERO BACILLUS.....	13
2.23.1.	CLASIFICACIÓN.....	13
2.23.2.	ECOLOGÍA.....	13
2.23.3.	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS.....	13
2.24.	BIODIVERSIDAD	13
2.25.	MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD DE ESPECIES.....	13
2.26.	ÍNDICE	14
2.27.	ÍNDICE SIMPSON (H Simpson).....	14
2.28.	ÍNDICE DE SHANNON (H Shannon).....	15

2.29.	<i>FLORA ARBÓREA</i>	16
2.30.	<i>IDENTIFICACIÓN DE FLORA ARBÓREA</i>	16
2.31.	<i>INVENTARIO PARA FLORA</i>	16
2.32.	<i>DISEÑO DE MUESTREO</i>	17
2.33.	<i>MUESTREO ALEATORIO SIMPLE</i>	17
CAPÍTULO 3. DESARROLLO METODOLÓGICO		18
3.1.	UBICACIÓN	18
3.2.	DURACIÓN.....	18
3.3.	MÉTODOS Y TÉCNICAS	18
3.4.	VARIABLES DE ESTUDIO.....	19
3.4.1.	<i>VARIABLES INDEPENDIENTES</i>	19
3.4.2.	<i>VARIABLES DEPENDIENTE</i>	19
3.5.	<i>PROCEDIMIENTOS</i>	19
3.5.2.	<i>FASE 2. ESTABLECER ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS GÉNERO BACILLUS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN</i>	23
3.5.3.	<i>FASE 3. IDENTIFICAR LAS ESPECIES DE FLORA EXISTENTE EN CADA SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CACAO, COMO APORTANTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA RIZOSFERA</i>	25
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		26
4.1.	IDENTIFICAR LAS BACTERIAS Y HONGOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	26
4.1.1.	<i>DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO Y ESTABLECER LOS PUNTOS DE MUESTREO PARA RECOLECCIÓN MUESTRA DE SUELO.</i>	26
4.1.2.	<i>IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS</i>	28
4.2.	DETERMINAR ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS EN LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN	37
4.2.1.	<i>ESTIMACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS.</i> 37	
51.	<i>CARACTERIZAR LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CACAO, COMO APORTANTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA</i>	

RIZOSFERA. 42

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1. CONCLUSIONES.....	45
5.2. RECOMENDACIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46
ANEXOS.....	56

FIGURAS

Figura 3.1 Mapa de ubicación.....	18
Figura 3.2. Croquis de toma de muestra.....	20
Figura 4.1. Polígonos de cada sistema de producción.....	27

GRÁFICOS

Gráfico 2.1 Niveles que indican la diversidad de especies a través del Índice de Shannon.....	16
Gráfico 4.1. Representatividad de especies de hongos en los tres sistemas de producción de cacao identificadas durante las dos épocas del año.....	33

TABLAS

Tabla 4.1. Coordenadas de cada sistema.....	26
Tabla 4.2. Total de hongos identificados en las dos épocas.....	28
Tabla 4.3. Especies de hongos identificadas durante la época seca.....	30
Tabla 4.4. Especies de hongos identificadas durante la época lluviosa	31
Tabla 4.5. Especies de bacterias identificadas durante la época seca.....	34
Tabla 4.6. Especies de bacterias identificadas durante la época lluviosa.....	35
Tabla 4.7. Biodiversidad de especies de hongos en la época seca.....	37
Tabla 4.8. Biodiversidad de especies de hongos en la época lluviosa.....	38
Tabla 4.9. Biodiversidad de especies de bacterias en la época seca y lluviosa	39
Tabla 4.10. Especies de flora existentes en los tres sistemas de producción de cacao.....	41

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se logró determinar los hongos y bacterias de género *Bacillus* asociados a la rizosfera del cacao en diferentes sistemas de producción en el cantón Portoviejo, los cuales fueron: Monocultivo, cacao con cítricos y cacao con maderables en ambas épocas del año, época seca y lluviosa. De esta manera se logró conocer cuáles fueron las familias de hongos más influyentes en estos suelos. Se identificaron un total de ocho grupos de hongos: 1) *Cladosporium*, 2) *Penicillium*, 3) *Trichoderma harzianum*, 4)

Aspergillus, 5) *Paecilomyces*, 6) *Beauveria*, 7) *Fusarium solani* y 8) *Bipolaris tetramera*; mientras que, para el caso de bacterias, solamente se identificó una especie del género *Bacillus*. En la época seca se encontraron seis grupos: *Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*. Mientras que en la época lluviosa se encontraron siete: *Beauveria*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Fusarium solani*, *Aspergillus*, *Bipolaris tetramera*. Los índices de biodiversidad bajos: H Shannon= 0,92–1,03 para la época seca y 0,88–1,56 para la época lluviosa; y H Simpson= 0,40–0,45 en época seca y 0,22–0,48 en época lluviosa; aunque en este último caso el 0,22 se aproxima más a 0 indicando una mayor biodiversidad del hábitat. La época lluviosa es más óptima para la abundancia de especies; registrando un total de 7137 vs 5951 colonias de bacterias en la época seca y 117 vs 60 aislamiento de colonias de hongos, respectivamente.

PALABRAS CLAVES:

Microrganismos, Índices de biodiversidad, sistemas de producción, *Theobroma cacao*.

ABSTRACT

In the present research work, it was possible to determine the fungi and bacteria of the *Bacillus* genus associated with the cacao rhizosphere in different production systems in the Portoviejo canton, which were: Monoculture, cacao with citrus fruits and cacao with timber at both times of the year, dry and rainy season. In this way, it was possible to know which were the most influential fungal families in these soils. A total of eight groups of fungi were identified: 1) *Cladosporium*, 2) *Penicillium*, 3) *Trichoderma harzianum*, 4) *Aspergillus*, 5) *Paecilomyces*, 6) *Beauveria*, 7) *Fusarium solani* and 8) *Bipolaris tetramera*; while, in the case of bacteria, only one species of the genus *Bacillus* was identified. In the dry season six species were found: *Cladosporium*, *Penicillium* and *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*. While in the rainy season seven were found: *Beauveria*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Fusarium solani*, *Aspergillus*, *Bipolaris tetramera*. Low biodiversity indices: H Shannon = 0.92–1.03 for the dry season and 0.88–1.56 for the rainy season; and H Simpson = 0.40–0.45 in dry season and 0.22–0.48 in rainy season; although in the latter case 0.22 is closer to 0 indicating greater biodiversity of the habitat. The rainy season is more optimal for the abundance of species; registering a total of 7137 vs 5951 colonies of bacteria in the dry season and 117 vs 60 isolation of fungal colonies, respectively. For this, sampling points and the collection of samples were established following the processes of the methodology given by Alvis, (2009).

KEYWORDS:

Microorganisms, Biodiversity Indices, Production Systems, *Theobroma cacao*.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACION DEL PROBLEMA.

Uno de los cultivos con mayor importancia que además tiene historia económica para el Ecuador considerándose como el producto de exportación más antiguo del país es el cacao, constituyéndose en una especie primordial de los sistemas productivos (Rosero 2002). Según Navarro, (2005) los sistemas productivos permiten la tipificación y caracterización e influyen en las interrelaciones entre ellos y son capaces de determinar la diversidad de sistemas existentes en diferentes tipos de cultivo.

Sin embargo, es de los factores con mayor importancia que afectan a toda la productividad de los suelos y el ambiente son aquellas funciones que son llevadas pertinentemente a cabo por la biota general del suelo. Aquellos microorganismos, conocidos como bacterias, los hongos, las algas, protozoos y nematodos, permiten varios procesos, incluyendo especialmente la descomposición de la materia orgánica, también en la formación de los humus, en la transformación y el reutilización o reciclaje de los nutrientes, siendo necesarios, en todo el mantenimiento de la producción de los mismos. Es importante conocer a fondo el manejo e importancia de la microbiología del suelo para entender su fertilidad; que ya es estudiada hace muchos años, por lo contrario, en la actualidad no es muy conocida la calidad del suelo; es un tema reciente. (PROECUADOR, 2013).

En la microbiología de los suelos actualmente se estudia el número y las clases de microorganismos, además de todos los efectos que en su causa se presentan en el ambiente, en el suelo y el desarrollo vegetal, presentada en la riqueza y la abundancia de aquellas comunidades microbianas que se encuentran presentes en él, de esta manera es importante entender para conseguir aprovechar todos los efectos favorables de organismos del suelo, por ello es necesario conocer su identidad, caracterizar todas las sus funciones e identificar sus estrategias de supervivencia (Bernal, 2005).

La micro biota del suelo es de mucha importancia ya que contribuye a la solución de problemas como la baja fertilidad, la contaminación de metales pesados en

los diferentes sistemas de producción (Jaramillo, 2002), los microorganismos son aquellos intermediarios entre planta que necesitan de los nutrientes o de minerales solubles, y el suelo es, quien contiene estos nutrientes muy necesarios pero con poca concentración o de forma poco accesibles para las plantas, cabe recalcar que los microorganismos en la rizosfera incluye un enlace crítico entre las plantas y el suelo. Es decir, los microorganismos desarrollan sus estrategias diversas que propician y ayudan al florecimiento de una serie de biodiversidad microbiana, (Ortiz, 2009) En Manabí no se encuentra publicado algún estudio que esté relacionado con la composición, la diversidad de las comunidades microbianas presente en los suelos de cultivos de cacao bajo los diferentes sistemas de producción, por esta razón, es ventajoso utilizar técnicas para poder caracterizar y conocer de qué manera intervienen las comunidades complejas de microorganismos que colonizan los suelos (ANECACAO, 2015).

¿Cómo influyen los sistemas de producción sobre la biodiversidad (bacterias género *Bacillus* y hongos) en la rizosfera del cacao?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La conjunción de esfuerzos públicos y privado se ha ido expandiendo en el desempeño positivo de la producción de cacao en los últimos años, llevando al país colocarse en uno de los principales exportadores del producto a nivel mundial, América Latina encaja el 80% de la producción de lo cual Ecuador aporta un 54% del total de este segmento (Ecuador, 2013).

Para Chase *et al.*, (2000), los sistemas de producción agrícolas son cultivos que establecen relaciones entre el medio ambiente y la actividad agrícola. Sin embargo, no hay que perder de vista que este concepto ha evolucionado, y pueda ser objeto de numerosas interpretaciones (en el espacio, en el tiempo, la biodiversidad de hongos y bacterias).

La biodiversidad de hongos y bacterias que se encuentra en los sistemas de producción es de millones de especies que se organizan en comunidades y poblaciones registrando un tamaño 100 y los 2000 millones de individuos por gramo de suelo. Es por ello que las comunidades están presentes entre 35.000 especies de las bacterias y 1'500.000 especies del hongo. Sin embargo, en la

actualidad solo se ha estudiado e identificado un 8% en bacterias y un 1% de hongos. La abundancia encontrada en los suelos va a variar, dependiendo del manejo de cultivo como de su tipo (Ochoa, Madrigal, Martínez & Carreón, 2010). Todos los microorganismos suelen demostrar la acción específica una vez relacionada con la especie vegetal (Benítez *et al.*, 2007). Es por ello que la riqueza y la abundancia de las colonias microbianas encontradas dependen del sistema de manejo, así como de los tipos de cultivo, de esta manera para comprender y aprovechar de manera favorable los efectos de estos organismos en el suelo se debe llevar una identificación y caracterización de sus funciones (Handelsman *et al.*, 1998). Todos los microorganismos cuentan con un papel importante en el suelo, ya que su participación es en varios procesos tales como la estimulación del crecimiento vegetal, un ejemplo clave es el crecimiento de la raíz para permitir a la planta una mejor absorción de sus nutrientes y supresión de ciertas enfermedades de las plantas (Rolf, 2004).

El conocimiento de las poblaciones hongos y bacterias asociadas a la rizosfera de sistemas de producción de cacao proporciona indicadores microbiológicos, utilizados como instrumentos para vigilar la resistencia y la adaptabilidad de estos agroecosistemas a los fenómenos adversos (Martínez *et al.*, 2006). Por lo tanto, es importante conocer la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo, especialmente en áreas tropicales muy variables como Ecuador, y relacionarlas con los diferentes métodos de gestión para mejorar las condiciones de los sistemas agro productivos (Alfaro *et al.*, 2015).

La Constitución de la República del Ecuador (2008) en el suplemento de la ley orgánica de tierras rurales y tierras ancestrales capítulo V artículo 49 menciona que el estado impulsara la protección, la conservación y la recuperación de la tierra rural de su capa fértil, en forma sustentable e integrada con los demás recursos naturales; sin embargo en Ecuador no se han publicado estudios relacionados con la diversidad de las comunidades de hongos y bacterias en los diferentes sistemas de producción de cacao.

Para ello, la siguiente investigación tiene un enfoque en la evaluación de bacterias género *Bacillus* y hongos lo cual permite establecer los índices de diversidad (riqueza y abundancia) en los diferentes sistemas de producción de

cacao, ya que de esta manera se logrará caracterizar y relacionar la micro biota del suelo con los beneficios aportados por las diferentes comunidades de hongos y bacterias, al cultivo de cacao en diferentes áreas; junto a cultivos maderables y frutales. La información que se obtenga será valiosa para técnicos y productores, pues tiene la finalidad de aportar conocimiento básico que puede ayudar a mejorar la fertilidad de los suelos de este importante renglón de la economía ecuatoriana.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los microorganismos (hongos y bacterias “género bacillus”) asociados a la rizosfera del cacao en diferentes sistemas de producción en el cantón Portoviejo.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las bacterias de género bacillus y hongos a nivel de la rizosfera de cacao en tres sistemas de producción.
- Establecer índices de biodiversidad de hongos y bacterias género bacillus asociados a la rizosfera de cacao en tres sistemas de producción.
- Caracterizar los sistemas de producción de cacao, como aportantes en la composición de la rizosfera

1.3.3. HIPÓTESIS

Los sistemas de producción de cacao influyen sobre la biodiversidad (bacterias género Bacillus y hongos) en la rizosfera.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

1.4. CACAO

El cacao tiene como nombre científico *Theobroma* cacao ha sido parte de grandes investigaciones, claramente delimitada pertenece a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae (antes Sterculiaceae). Esta especie se puede considerar un árbol o arbusto semicaducifolio de 12 a 20 m de altura, y en los cultivos no pasa de 4 a 8m normalmente. En los arboles jóvenes el tallo es glabro o pubescente, contando con una corteza que varía entre oscura, gris-café. Las ramas de estos árboles son cafés y cuentan con vellosoidad fina. Las hojas se las denomina coriáceas o cartáceas simples, enteras o ligera e irregularmente sinuadas, cuenta con forma ovaladas angosta a obovado-elípticas, ligeramente asimétricas (Dostert, *et al.*, 2011).

2.1. CACAO A NIVEL MUNDIAL

A nivel mundial el cacao sobrepasa los 4 000 000 de TM de granos, en el continente con mauro responsabilidad es Africa con un 73% de su producción y el 64% de todo lo sembrado en cacao; en los países de América obsoleta el 17% de toda la producción a nivel mundial y con el mismo porcentaje de sembrios en cacao; Asia y Oceanía contribuyen con el 10 % en la producción y un 19 % de la superficie sembrada de cacao. En los últimos cincuenta años la producción del cacao ha ido aumentando significativamente permitiendo cuadruplicar la demanda a nivel mundial, desde los años ochenta, noventa y la primera del actual siglo. Sin embargo, en el año 2011 se percibió que la tasa de crecimiento se había decaído en la producción de cacao en el mundo, estimándose una reducción de 300 000 TM.

Cabe recalcar que los cultivos de cacao dependen de las condiciones climáticas encontradas. Las variaciones presentes como las lluvias, las temperaturas y la humedad relativa son parámetros de gran impacto sobre la producción cacaotera, estas variabilidades tienen un efecto negativo en el ciclo fisiológico de los cultivos y con ello condicional con propbabilidades alta de la presencia de plagas y enfermedades, es por ello que estas producciones han ido creciendo, pero interanualmente errática. En los últimos años América Latina y el Caribe ha

aumentado a nivel comercial el cacao por lo menos en 23 países, con una producción combinada mayor a las 675 000 TM y alrededor de 1 700 000 ha, en cuanto a los países de Ecuador, Perú, Brasil, Republica Dominicana, México y Colombia son los mayores productores con un 90 % de la producción y de la superficie sembrada del continente. (Arvelo *et al.*, 2017).

2.2. CACAO EN ECUADOR

En Ecuador el cacao fino de aroma representa únicamente 5% del total de la producción mundial de cacao. Debido a las óptimas condiciones geográficas e involucrando la riqueza de recursos biológicos que aporta el Ecuador, se ha convertido en el productor excelencia del Cacao Arriba fino y su aroma lleva el 63% de la producción mundial, de esta manera se ha acentuado a nivel mundial en el mercado siendo el más reconocido. Estos granos se utilizan en los chocolates refinados. Sin embargo, no es conocido por muchos que el cacao ecuatoriano se identifica por su pureza, en ello prevalece el sabor y fragancia que en lo particular el cacao ecuatoriano mantiene. Ecuador es el país más competitivo posesionado por muchos años en América Latina relacionado con el cacao, después por menos ventajas sigue Venezuela, Panamá y México, países que de a poco se ha incrementado en el mercado mundial por el cacao fino en grano (Anecacao, 2015).

2.3. SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CACAO

Los sistemas de producción es la mejor forma de utilizar el suelo, y de manera adecuada; por ello se busca combinar algunos cultivos; involucrando diferentes tipos de planta de manera ordenada (Priego *et al.*, 2009). Según Jaimez *et al.* (2008). En los sistemas se involucran todas las especies de plantas, animales hasta microorganismos para establecer relación en beneficio de sus vidas, sin embargo (Priego, *et al.*, 2009) indica que el cacao plantado con árboles acompañantes se define como un sistema agroforestal; ya que estas combinaciones de cultivo de cacao con plantas obtienen beneficios diferentes y productos de calidad a las familias que lo cultivan, permitiéndose utilizar las parcelas de mejor manera.

Es por ello que el potencial de los sistemas de cultivos de cacao se expresa según su dinámica fisiológica ya que interactúan las condiciones climáticas y

suelo favorables, control, de plagas, el adecuado manejo de sombra del cultivo, entre otro. No obstante, deberán buscarse tecnologías que sean rentables y sostenibles para garantizar un buen sustento del productor en el presente y en el futuro (IICA, 2006).

Los sistemas e cultivo de cacao constituyen un agro ecosistema en el cual su caracterización se basa en la diversidad de especies que se encuentran asociadas y establecen interacciones de manejo adecuado con el mismo, es por ello que se da un alcance favorable a la productividad y a la economía del productor (ETCHEGARAY, 1998).

2.4. SISTEMAS AGROFORESTALES

Estos sistemas son de uso antiguo y conocido por la práctica, reconocido por combinar espacialmente y temporalmente con los cultivos de agrícola. Es una combinación de elementos presente en la agricultura con prácticas forestales para producir de una manera sustentable en la misma unidad de espacio en la tierra. De esta manera se procura ir aumentando el rendimiento de una forma continua, haciendo una combinación de cultivos forestales arbolados con cultivos de campo o arables (Farrell y Altieri, 1997).

2.5. VENTAJAS DE LOS SISTEMAS AGROFORESTALES

Las ventajas que proporcionan los sistemas agroforestales se basan en combinar la producción agrícola con la forestal y de esta manera alcanzar mayores y diversas funciones en el momento de producir bosques y los cultivos de alimentos. Existen ventajas particulares como socioeconómicas en los sistemas integrados. (Farrell y Altieri, 1997).

2.5.1. VENTAJAS AMBIENTALES

Forja un eficiente uso en los recursos naturales, de esta manera las múltiples capas de la vegetación presentan un manejo de la radiación solar eficaz. Así como las raíces con sus múltiples tipos de raíces permiten un buen uso del suelo y de esta manera las plantas agrícolas aprovechan la superficie enriquecida producto del reciclaje mineral por medio las copas de árboles (Farrell y Altieri, 1997).

2.5.2. VENTAJAS SOCIOECONÓMICAS

Todos los componentes y productos de los múltiples sistemas pueden ser utilizados como consumos. En relación con las plantaciones puramente forestales, al introducir cultivos agrícolas junto con las prácticas diversas culturales claramente bien adaptadas, da como resultado un aumento de la producción forestal y una merma en los diferentes costos del manejo arbóreo (Maycotte, 2011).

2.6. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGROFORESTAL SIMULTÁNEOS

Los sistemas agroforestales se los puede detallar como la apicultura con árboles. Es decir, la acuicultura o lotes de los árboles con multipropósitos. Los componentes se disponen temporalmente o espacialmente y se pueden utilizar varias técnicas para indicar las variadas disposiciones. La base funcional hace referencia a un producto principal y al desarrollo de los componentes, uno en particular los arbolados. Los cuales pueden ser la producción de necesidades básicas como las funciones productivas, leña, forraje, alimento, y algunos papeles importantes como la conservación de los suelos y la mejora de la fertilidad del mismo. Según la ecología, los sistemas se pueden dividir y agrupar para cualquier zona agroecológica conocidas como zonas tropicales húmedas de las tierras que están bajas, zonas tropicales áridas y semiáridas, tierras altas tropicales y así sucesivamente. Modifican la escala socioeconómica en producción y sobre el manejo de los mismos se pueden manejar criterios como comerciales, intermedios o de subsistencia (Maycotte, 2011).

2.7. MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

La sustentabilidad de los ecosistemas permitidos por el reciclaje de nutrientes al regular toda la dinámica de la materia orgánica presente en el suelo es debido a los microorganismos, como también la retención de carbono, incluso la emisión de gases invernaderos, también la estructura de los suelos y la retención líquida, aumentar los niveles de nutrientes por las plantas y de mantener la salud vegetal (Correa, 2013).

2.8. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL SUELO

En sitio donde mayor se encuentra la interacción entre microorganismos edáficos y entre los cultivos son una porción de suelo que se influencia por la raíz vegetal, por eso es importante conocer detalladamente el ambiente y sus características biodiversas. En la actualidad la microbiología de los suelos indica de manera detallada con estudios el número y clase de microorganismos, y los que ellos contribuyen al medio ambiente en el suelo y desarrollo vegetal, además de contribuir a las soluciones de problemas. (Gómez, 2015).

2.9. CALIDAD DEL SUELO

Es la capacidad que posee el suelo entre todo límite de cada ecosistema natural o manipulado, para conservar la productividad de las plantas y animales. La calidad del suelo proporciona un concepto útil y universal para educar a los profesionales, productores y el público sobre su gran importancia. También se puede utilizar para evaluar los impactos de las prácticas de manejo y sus usos (Willis, 2013).

2.10. IMPORTANCIA DE BIODIVERSIDAD EN EL SUELO

La importancia se basa en la diversidad y riqueza de especies en las comunidades microbianas y su funcionamiento en la descomposición de materia orgánica, residuos de animales y vertido nocivos. Capaz de soportar mejor una perturbación específica del suelo (Ruíz, 2011).

2.11. MICROORGANISMO EN LA RIZOSFERA

La rizosfera se lo considera un nicho ciertamente ecológico que integra la composición y las estructuras de todas las comunidades de microorganismos que se asocian a ella. La interacción entre los microorganismos rizosféricos como los hongos y bacterias son catalogados como agente de control biológico (Cano, 2011).

2.12. PREPARACION DE LOS MEDIO DE CULTIVO

Existen diversos medios de cultivo que son necesarios para producir ambientes óptimos para la siembra de numerosos microorganismos, estos medios pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos. Para estos medios se debe tener en cuenta

la humedad, el pH, la luz ambiental, la temperatura y la esterilidad del medio. Estos cultivos a su vez pueden ser selectivos, diferenciales o enriquecidos. Los medios de cultivos más comunes son el agar-agar el cual es un polisacárido no ramificado de origen marino, algas. El agar-PDA (El cual es una infusión de papa y dextrosa) o el Agar de sal y manitol (Tividor, 2019).

2.13. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (AISLAMIENTO)

Se conoce como aislar a la separación del tipo de microorganismo de una población heterogénea de la misma. En hábitats naturales es casi imposible encontrar un solo tipo de microorganismos, por ello, es indispensable seguir procedimientos de aislamiento adecuados en la separación e identificación de los diferentes tipos de microorganismos presentes. En pocas palabras, aislar tiene como objetivo visualizar colonias que se encuentren separadas sin embargo cabe recalcar que (las colonias se forman a partir de una sola “unidad formadora de colonias”) de la cual se lograra conseguir un cultivo puro (Bonilla, 2016).

2.14. MÉTODO

2.14.1. Por diseminación en la superficie de un medio sólido en placa de Petri

Esta técnica es una de las más utilizadas. Su procedimiento es con un anillo de siembra previamente calentado al rojo vivo de un mechero, se espera a que se enfríe cerca para luego tomar una muestra del cultivo que se quiere estudiar, se extiende en la superficie de la placa con el medio agarizado, no se podrá hacer presión ya que se daña el agar. Seguidamente la placa se la lleva a incubar en posición invertida para que el agua condensada no se deposite en la superficie del medio porque puede dificultar la obtención de las colonias aisladas a temperatura adecuada.

Esta técnica se realiza cuando las muestras tienen un elevado número de microorganismos (Bonilla, 2016).

2.15. TINCIÓN DE GRAM

Este método consiguió clasificar las bacterias en solo dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, durante este método las bacterias positivas se tiñen de color morado y las negativas se marcan de color rojo o rosa, esto se dirige por la

diferencia de las estructuras de las paredes. Sin embargo, se ha presentado algunos cultivos donde el resultado sale negativo en la tinción Gram esto es porque los cultivos ya están envejeciendo; principalmente en los Bacillus ya que estos se los describe como Gram variables (Pajares, 2018).

2.16. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICAS

El estudio macroscópico es muy importante principalmente cuando el cultivo está en una superficie medio solida; en la multiplicación de los gérmenes se origina colonias formando la masa de mil de millones de gérmenes que se pueden observar a simple vista. Cada célula es derivada por la morfología, pero es importante porque es una característica de la masa celular.

Las principales características que se pueden observar y se analizan en cada colonia son: a) Tamaño: que sean uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones cuando varían desde muy pequeñas o apenas hasta que son visibles, y unos centímetros de diámetro.

b) Consistencia: blanda, seca o viscosa.

c) Forma: dependerá del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor va a depender de la elevación estas pueden ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc. Una vez observadas las características antes mencionadas se pueden definir los diferentes tipos de colonias (Pajares, 2018).

2.17. OBSERVACION MICROSCÓPICAS

La observación microscópica de microorganismos unicelulares requiere de microscopio con una dotación básica y de buena calidad, excepto de la observación vital, es necesario que el material se encuentre preparado de manera correcta. La preparación del material dependerá únicamente del tipo de microscopio a utilizar. Sin embargo, cuando el caso lo amerite las células y los cortes histológicos deberán ser sometidos a alguna acción de fluorocromos, para de esta manera observar con un microscopio de fluorescencia o con el microscopio confocal, en algunos otros casos se recurre a la utilización de algunas sales de metales pesados que actúan sobre cortes ultra finos para ser

estudiados con el microscopio electrónico de transmisión. Sin embargo, en cualquiera de los casos es necesario que para la identificación se tenga conocimiento de bases teóricas y ejercitar el método de observación (Castro, 2018).

2.18. HONGOS

Los hongos son organismos que contienen un núcleo definido y que tienen las características muy similares a los animales y plantas. Cuentan con las células alargadas y para alinearse todas, forman filamentos que se los denominan hifas. Estas se entrelazan en una masa similar al algodón llamada micelio (Moreno, 2016).

2.19. HONGOS EN EL SUELO

Estos microorganismos tienen una función vital dentro de los ecosistemas, como en la descomposición del material orgánico, el reciclaje de nutrientes y el mantenimiento de la rizosfera. Los impactos realizados por el humano sobre estos alteran la estructura, biodiversidad y dinámica (Ibáñez, 2012).

2.20. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN EL SUELO

La gran diversidad microbiana es uno de los principales indicadores de la salud del suelo, es muy importante cuando se consideran superficies con condiciones ambientales cambiantes. Los hongos mantienen una importancia excepcional en la descomposición del material orgánico, y también aumenta la fertilidad del suelo. Así mismo pueden formar las estructuras para la resistencia que les permitan sobrevivir en ambientes desfavorables (Ramírez, 2014).

2.21. BACTERIAS

Las bacterias son células sin un núcleo definido se comparan con células eucariotas, estas tienen una estructura sencilla, son de diversas formas y tamaños.

Las bacterias se clasifican según su forma y estas pueden ser bacilos bastones, cocos redondeados y espirilos de estructura espirales o helicoidales (Iracheta, 2009).

2.22. GÉNERO BACILLUS

Es un género concurrente en los diversos cultivos situado en la rizosfera, en vista de su alta capacidad de gestación de esporas brinda una ventaja de sobrevivencia en la rizosfera vegetal (Calvo y Zúñiga, 2010).

2.22.1. CLASIFICACIÓN

El género *Bacillus* en la actualidad incluye más de 336 especies y pertenecen al reino bacteria, por lo tanto, es descrito como bacterias productoras de endosporas, las cuales pueden llegar a ser resistente a altas temperaturas, (Villareal *et al.*, 2018).

2.22.2. ECOLOGÍA

Los *Bacillus* se encuentran distribuidas en diferentes medios donde su principal característica es la fuerza y potencia a su aislamiento en diferentes hábitats ya sean acuáticos o terrestres. (Villareal *et al.*, 2018).

2.22.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS

Entre las características más significativas del género *Bacillus* destaca su poder de crecimiento anaerobio como también anaerobio facultativo, morfología bacilar, tamaño variable (0.5 a 10 micrometro) y su movilidad flagelar. Su desarrollo ocurre mostrando un variado intervalo de temperaturas. (Villareal *et al.*, 2018).

2.23. BIODIVERSIDAD

La biodiversidad no solo se refiere a una diversidad ecológica sino como también a una variación biológica la cual es el fruto de un irrepetible desarrollo evolutivo, por lo tanto, es indispensable la información mas importante de la mayor variedad de organismos presentes para así continuamente utilizar diferentes cualidades de la diversidad biológica (Moreno, 2001).

2.24. MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD DE ESPECIES

El suceso de una medición de diversidad a menudo se muestra como indicador de un excelente manejo de los ecosistemas, el avance de un ecosistema involucra un incremento de la diversidad (Alvis, 2009).

2.25. ÍNDICE

El índice es un método estadístico que nos posibilita hacer una comparación de una magnitud ya sea simple o compleja en diferentes situaciones en relación al tiempo o el espacio (Fernández, 2013).

2.26. ÍNDICE SIMPSON (H Simpson)

El índice de Simpson se deriva y mide la probabilidad de hallar dos individuos de una misma especie. Este principio conforma una propiedad contraria a la diversidad, por lo tanto se define el problema de escoger una transformación adecuada para lograr una cifra asociada positivamente con la diversidad (Zarco *et al.*, 2010).

$$S = \frac{1}{\sum \frac{n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)}}$$

[2.1] ÍNDICE DE SIMPSON

Dónde:

n_i = número de individuos en la i ésima especie N = número total de individuos

La ecuación 2.2 también es muy característica y ampliamente usada para estimar el H de Simpson debido a que es muy práctica y sencilla.

$$S = \sum \frac{1}{N} (\overline{n_i}^2)$$

[2.2] H DE SIMPSON

Donde:

n_i = Número total de individuos por especie.

N = Número total de individuos en todo el hábitat estudiado.

El rango de H Simpson está comprendido entre 0–1; siendo el nivel de diversidad infinita 0 y 1, significa que no hay diversidad.

2.27. ÍNDICE DE SHANNON (H Shannon)

Este índice es empleado para cuantificar la biodiversidad específica conocida como Shannon–Weaver por lo cual muestra la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa (Pla, 2006).

$$H' = \sum_{i=1}^S P_i \ln(P_i)$$

[2.3] INDICE DE SHANON

Dónde:

S = número de especies

P_i = proporción de individuos de la especie i

A mayor valor de H_0 mayor diversidad de especies

El H Shannon puede comprender niveles de hasta 5; aunque también se ha reportado valores superiores a 5 para este índice, sobre todo en algunos casos de ecosistemas altamente diversos. Por su parte, Cedeño y Quinteros (2016) proponen categorías de diversidad mediante los niveles alcanzados en el H Shannon (cuadro 2.2).

Gráfico 2.1 Niveles que indican la diversidad de especies a través del Índice de Shannon

Categorías	Niveles
Baja	<2
Media	2–3
Alta	>3

2.28. FLORA ARBÓREA

La flora arbórea se define como la cobertura de masa de una comunidad vegetal que es clasificada por su altura, establecido por la vegetación que cubre la parte superior constituida por arboles (CONAFOR, 2017).

2.29. IDENTIFICACIÓN DE FLORA ARBÓREA

Proceso por el cual se establece el nombre científico a una especie, sus estructuras, las características, la descripción botánica de la especie mediante un examen y un material de apoyo anteriormente identificado. Esta identificación tiene como objetivo producir una base para la estructuración de planteamientos referidos a las comunidades vegetales (LAMPRECH, 1990).

2.30. INVENTARIO PARA FLORA

Tiene como fin empadronar de manera íntegra cada una de las especies encontradas en un sitio en específico, sin embargo, se puede decir que un Un diseño de muestreo decreta el éxito potencial, del cual depende el tipo de análisis e interpretación a ejecutarse. Para que la realización de un muestreo sea exitosa debe estar bien estructurado, por lo tanto, la muestra a coger debe estimar una mayor variabilidad en toda una población. Esta representatividad será dada por el número de réplicas a tomarse en cuenta y por el crecimiento inventario es una estructura puntual en el tiempo de más de un elemento de la biodiversidad, de

la misma manera pueden ser diseñados para establecer el número de individuos de una o unas pocas especies individuales de la especie que se localizan espacial o temporalmente en una región (Oliva *et al.*, 2017).

2.31. DISEÑO DE MUESTREO

de los factores que pueden contribuir en una determinación variable (Mostacedo y Fredericksen, 2000).

2.32. MUESTREO ALEATORIO SIMPLE

Esta técnica se basa en el extraer los individuos al azar de la lista. En cuanto a práctica se refiere cuando son muy pequeñas las poblaciones o estructuras simples es difícil llevarse a cabo con manera eficaz. (Casal y Mateu, 2003).

CAPÍTULO 3. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El presente proyecto se realizó en la estación experimental Portoviejo del INIAP en la provincia de Manabí. Las coordenadas geográficas de referencia son: 1°07'25.7"S y 80°24'50.9"W (figura 3.1).

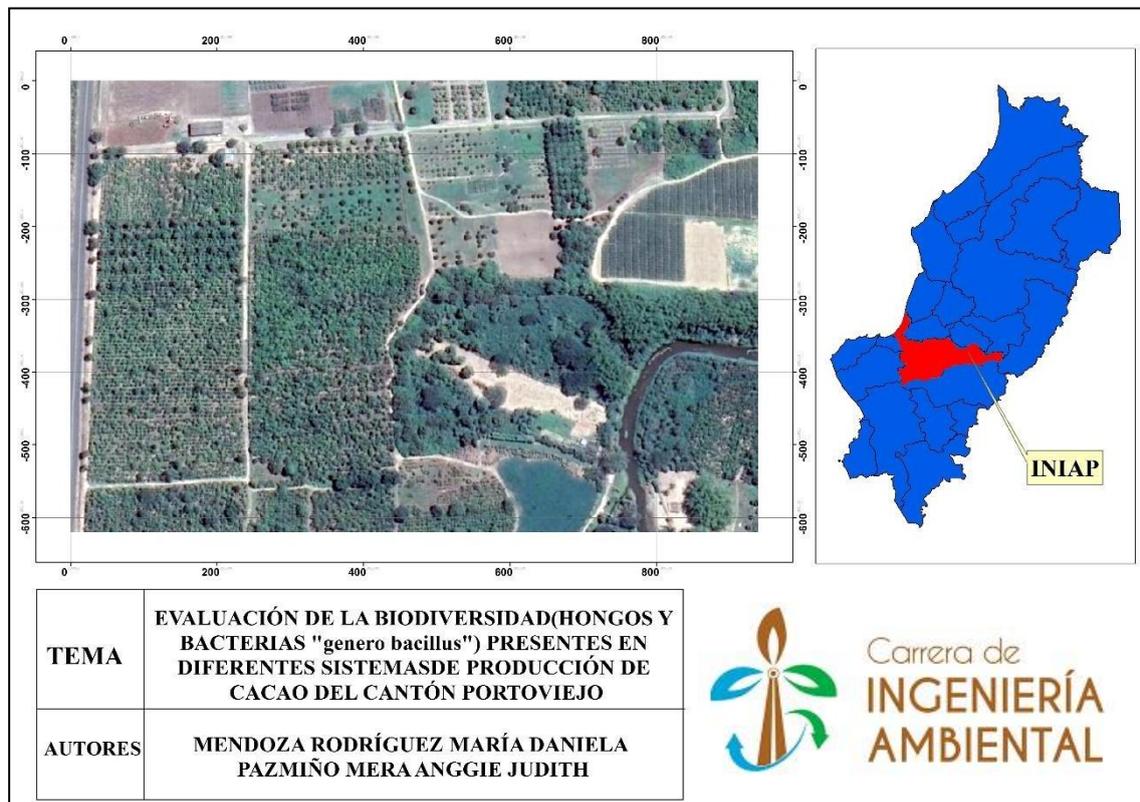


Figura 3.1 Mapa de ubicación

3.2. DURACIÓN

El desarrollo de la investigación comprendió una duración de nueve meses, se remontan a la época seca y época lluviosa; se realizaron los análisis en las diferentes épocas del año. Se utilizó el mes de agosto como época seca para la recolección de muestras en el suelo y sus análisis correspondientes; en época lluviosa se trabajó en el mes de febrero ya que es donde se intensifican las lluvias.

3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS

3.3.1. MÉTODOS

a. INDUCTIVO

Razonar el análisis con una porción de todo; esto parte en lo particular hasta lo general, y de lo individual a lo universal (Polo, 2015).

3.3.2. TÉCNICAS

b. OBSERVACIÓN DIRECTA

Mediante la técnica de observación directa se establecerá las características del sitio donde se realizará el proyecto; consistirá en contemplar sistemática y detenidamente (Polo, 2015).

c. BIBLIOGRÁFICA

Método que se dirige a la utilización de libros, artículos científicos, revistas científicas y páginas web, hacen referencia a informaciones recogidas de primera mano o datos originales recogidos por otras personas (Polo, 2015).

3.4. VARIABLES DE ESTUDIO

3.4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Sistemas de producción de cacao:

1). Cacao - Monocultivo 2). Cacao - Maderables 3). Cacao - Frutales

3.4.2. VARIABLES DEPENDIENTE

Diversidad de Hongos y bacterias

3.5. PROCEDIMIENTOS

3.5.1. FASE 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS DE GÉNERO BACILLUS Y HONGOS A NIVEL DE GÉNERO ASOCIADOS EN LA RIZOSFERA DE CACAO.

Actividad 1. Delimitar el área de estudio y establecer los puntos de muestreo

Para la delimitación del área de estudio se siguió lo planteado por Padilla *et. al* (2006) donde recomienda un reconocimiento *in situ* es la manera más factible para estudios en diferentes sistemas, de esta manera se tomó las coordenadas correspondientes a los sistema de producción de cacao monocultivo, maderable y frutales. Al tener identificado cada sistema de producción se realizó un transecto de 50 x 50m en cada sistema de producción. Esto siguiendo la

metodología planteado por (Alvis, 2009) donde menciona que espacio no mayores a 1 ha lo recomendable es realizar un transecto donde presente la mayor concentración de especies. Una vez teniendo identificado cada sistema y haber realizado cada transecto se procedió a seguir con la metodología planteada por Osorio y Casamitjana, (2011) para la recolección de muestras, donde menciona que una vez haber definido los límites de cada unidad de muestreo, se realice un recorrido del terreno en forma de zigzag tomando las submuestras en cada vértice, las distancias entre cada vértice eran de 50m de largo y 10m de ancho entre cada vértice. De esta manera se recolecto un total de 10 submuestras por cada sistema de producción de cacao. Así se formó una muestra homogénea con un peso de 1kg. Así mismo se realizó la limpieza en un área de 40 cm x 40 cm de diámetro en cada vértice del zigzag con el fin de remover las plantas y hojas fresca que se encuentran en la superficie siguiendo lo planteado por Osorio y Casamitjana, (2011).

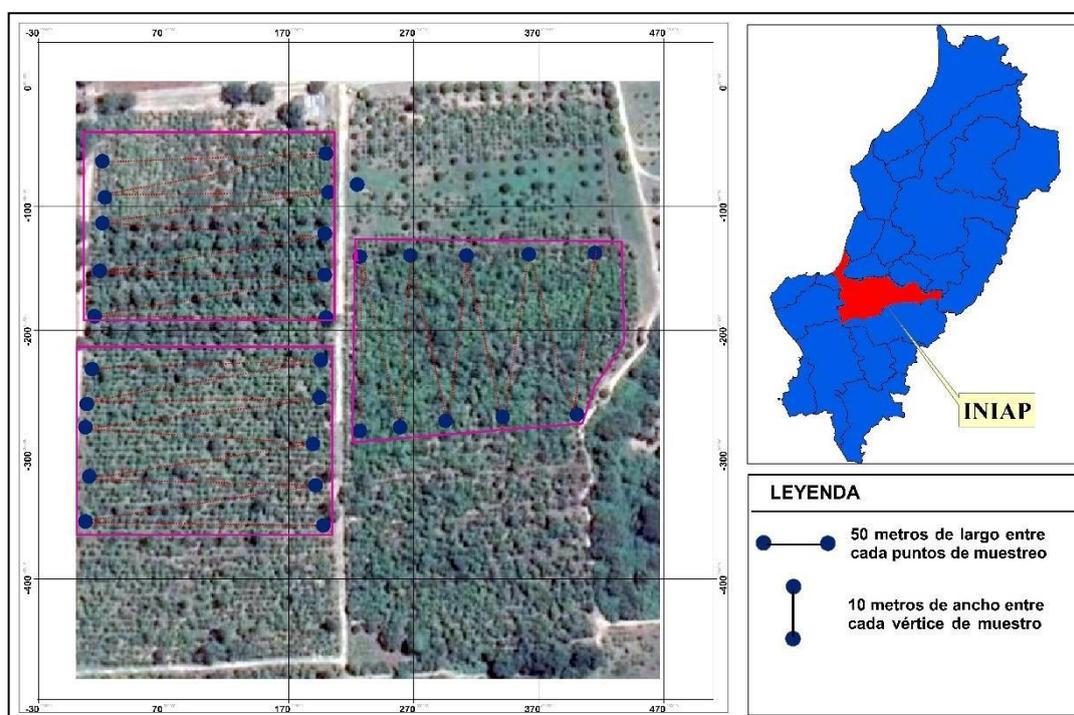


Figura 3.2. Croquis de toma de muestra.

Actividad 2. Identificación de bacterias de género bacillus y hongos.

En la identificación de hongos y bacterias de género bacillus se la desarrollo en dos épocas del año; en la época seca en el mes de agosto y en la época lluviosa en el mes de febrero ya que este es el mes donde se acrecientan las lluvias en la provincia. Esto siguiendo lo planteado por Morales (2015), donde recomienda que para un balance de diversidad de microorganismos en diferentes épocas del año es recomendable realizarlo en los meses donde la precipitación sea constante.

Preparación de los medios de cultivos

La preparación para los cultivos de bacterias del género bacillus, se realizó en agar plate count, en su preparación se colocó 23 g de agar plate count en 1000 ml de agua destilada, luego se le agrego en un beaker con capacidad de 2000 ml, se homogenizo la mezcla en un agitador magnético, posteriormente se dejó enfriar el medio a 50 °C para luego medir el pH nivelandolo a 7.2 ya que es nivel necesario para que el reactivo cumpla su función en el cultivo de bacterias, como lo propone Álvarez, Blandon, Cevallos y Mejia (2014).

La preparación para los cultivos de hongos se realizó en agar papa dextrosa, para su preparación se colocó 65 g de agar papa dextrosa en 1000 ml de agua destilada en un beaker con capacidad de 2000 ml, se homogenizo la mezcla en un agitador magnético. Posteriormente se dejó enfriar el medio a 50 °C para luego medir el pH nivelando el mismo a 6.0, el ph necesario para que los cultivos de hongos se desarrollen según la metodología empleada por Méndez, Camacho y Echeverry (2015) en un ensayo de identificación de bacterias y hongos en el suelo.

Obtencion de muestras biológicas (AISLAMIENTO)

Los microorganismos hongos y bacterias del género *bacillus* fueron aislados a partir de rizósferas de plantas de cacao en tres sistemas distintos. Se tomó muestras de suelo adherido al sistema radicular de la planta (Bowen y Velásquez (2014)).Posteriormente, se siguió la metodología empleada por Vázquez *et al.* (2018) en un estudio similar con cultivos de papaya.

Fueron pesados asépticamente 10 g de cada muestra de suelo, añadimos la muestra pesada en un primer matraz que contiene 90ml agua de peptona al 1%,

homogenizando para su respectiva dilución, luego se realiza las diluciones seriadas en tubos de ensayos que contienen 9 ml de solución de agua de peptona estéril hasta 1:1110000; sembramos 1 ml de las diluciones en 10000, 1 ml de las diluciones en 100000, 1 ml de las diluciones en 1000000 en placas con Agar plate count tal como lo indica Gonzáles (2016). Distribuimos la muestra con la espátula de Drigalsky en la caja Petri después se incubó la muestra durante 24-48 horas a 37 °C; para hongos se realizó el mismo procedimiento con la variante que cuya dilución final fue hasta 1:10000 y se sembró en placa con agar papa dextrosa según (López et al., 2015).

Este procedimiento se realizó por duplicado para descartar errores y aumentar la confiabilidad de los datos.

El mismo procedimiento se desarrolló en las dos épocas del año para tener un mayor número de observaciones y contraste de datos. Las muestras fueron rotuladas y codificadas por cada uno de los sistemas productivos, microorganismo a identificar, fecha y hora, como lo proponen Orruño y Barcina (2010).

Incubación

El material biológico que fue obtenido en las cajas de petri en su respectivo medio de cultivo específico, se incubó durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 35°C para las bacterias y a 72 horas a una temperatura de 24°C para hongos (García, 2011)

Bacterias de género bacillus

Después de 24 horas sometidas los cultivos en las diferentes cajas Petri en incubación se llevaron las muestras al contador de colonias de bacterias, en donde se contaron las unidades formadoras de colonias.

Para el proceso de purificación de los cultivos de bacterias, Se aplicó la técnica de coloración de Gram para determinar cuáles eran positivas (azules) y negativas (rosáceas), como lo proponen Bowen y Velásquez (2014).

Se extrajo una pequeña porción de la colonia pura; en un portaobjeto se colocó una gota de agua destilada, y se colocó la colonia (muestra); la misma que fue sometida a calor con el propósito de parar su proceso enzimático, posteriormente

se le agregó unas gotas de violeta de genciana por un minuto para teñir las paredes de las bacterias; luego se enjuagó con agua destilada, después se cubrió con la solución de lugol durante un minuto, se lavó nuevamente con agua destilada y se decoloró con alcohol cetona, a razón de cuatro segundos se lavó nuevamente con agua destilada y por último se tiñó con safranina durante un minuto y se enjuagó con agua destilada. Se dejó secar, y se observó en el microscopio las características morfológicas (Méndez, *et al.*, 2015).

Hongos

Se empleó por duplicado la técnica de *siembra directa de suelo* en la superficie de cajas petri; las mismas que después de 72 horas incubadas a temperatura 24°C se llevó al contador de colonia y se realizó el conteo de las unidades propagadoras de hongos (Bermúdez, 2015).

Con la ayuda de una cinta adhesiva se extrajo parte de la colonia, en una porta objeto se colocó una gota de azul de metileno y se colocó la muestra encima de la gota secando un poco la placa, posteriormente se llevó la placa al microscopio para su observación y la identificación (López *et al.*, 2015).

Se analizó las características de macroscópicas y microscópicas presentes en las colonias fúngicas para identificar los distintos géneros. Las características macroscópicas analizadas fueron, tipo de crecimiento de las colonias, color, forma, tamaño, entre otras.

Una vez que se obtuvo los datos de los géneros de hongos identificados, se procedió a seguir lo planteado por Pacasa *et al.*, (2017) donde recomienda comparar las características identificadas con la literatura de claves taxonómicas de Barnett y Hunter 1998; y Kirk *et al.* 2008.

3.5.2. FASE 2. ESTABLECER ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS GÉNERO BACILLUS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Actividad 3. Estimación de la biodiversidad de hongos y bacterias

Se estimó la riqueza y abundancia de hongos y bacterias en los tres sistemas de producción de cacao mediante la aplicación de dos de los índices de Biodiversidades más usadas y recomendadas: 1) H Simpson y 2) H Shannon. Previamente, se clasificó y agrupó los datos obtenidos en la Fase I, a través de

la identificación y conteo de especies observadas. La abundancia correspondió al número de aislamientos de una misma especie.

Siguiendo la metodología planteada por Zarco *et al.* (2010) y Pla (2006), se aplicó la ecuación 2.2 para determinar el H Simpson y 2.3 para H Shannon.

$$S = \sum \left(\frac{n_i^2}{N} \right) \quad [2.2]$$

$$H' = \sum_{i=1}^S P_i (P_i) \quad [2.3]$$

Adicionalmente, se estimó la representatividad de las especies de hongos y bacterias, en función de cada uno de los tres sistemas de producción y de forma general (tres sistemas producción agrupados). La representatividad corresponde a la medida de distribución en que una especie de hongo o bacteria se presenta en un sistema de producción de cacao y/o en el estudio general. Para estimar esta medida, se aplicó una ecuación básica de porcentaje que se presentan en la ecuación 3.1 y 3.2.

$$R_{es} = \frac{n}{N_s} \times 100.$$

Donde:

R_{es} = Representatividad de especies por sistema (%) n = Número de aislamientos de una especie.

N_s = Total de aislamientos en un sistema de producción.

$$R_{ge} = \frac{n}{N} \times 100 \quad [3.2]$$

Donde:

R_{ge} = Representatividad general de especies (%) n = Número de aislamientos de una especie.

N = Total de aislamientos en los tres sistemas

3.5.3. FASE 3. IDENTIFICAR LAS ESPECIES DE FLORA EXISTENTE EN CADA SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CACAO, COMO APORTANTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA RIZOSFERA

Actividad 4. Identificación de las especies de flora en los sistemas de producción.

Se estableció puntos de muestreo en zonas estratégicas de acuerdo a la característica que presente una mayor concentración de flora dentro de los sistemas producciones maderables y frutales, mientras que en el sistema monocultivo se lo realizó en el punto céntrico del sistema. De esta manera en donde se aplicó un transecto de 50x50m en cada sistema de producción según lo estipulado por (Alvis, 2009).

En la identificación de cada una de las especies de flora encontradas dentro de los sistemas de producción de cacao se la realizó mediante la metodología planteada por (FAO, 2005) en la cual nos mencionan que se debe proceder con una identificación preliminar en el campo apoyándonos con una guía forestal. Siguiendo con la metodología planteada se usó la guía Árboles del Ecuador, primera edición (Palacio 2016).

Actividad 5. Cuantificación del número de flora existente en cada sistema de producción de cacao

Se elaboró una matriz donde describe la parcela, número de especie, nombre común, nombre científico, familia. Siguiendo lo propuesto por (Roeder, 2004)

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICAR LAS BACTERIAS Y HONGOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

4.1.1. DELIMITACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO Y ESTABLECER LOS PUNTOS DE MUESTREO PARA RECOLECCIÓN MUESTRA DE SUELO.

Se realizó el levantamiento de las coordenadas de cada uno de los sistemas, que se presentan en el cuadro 4.1 y a la vez realización de polígonos de cada sistema de producción, mediante el programa ArcGIS 10.4 como se muestra en la figura 4.1 la misma que nos muestra desde otro punto de vista cada sistema de producción a estudiar.

Así mismo Espinosa y Roquera (2007) como Lasso *et al.*, (2011) menciona que la sectorización de territorios ayuda para la identificación de unidades geográficas como las características físicas, biológicas.

Tabla 4.1. Coordenadas de cada sistema.

Puntos	X	Y	H
Cítricos	568244	9870811	54
	568248	9870743	53
	568354	9870742	55
	568025	9870932	53
Monocultivo	568119	9870832	53
	568131	9870779	54
	568185	9870774	53
	568085	9870694	53
Maderables	568191	9870708	55
	568219	970602	52
	568325	9870594	52
	568323	9870695	52

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019)

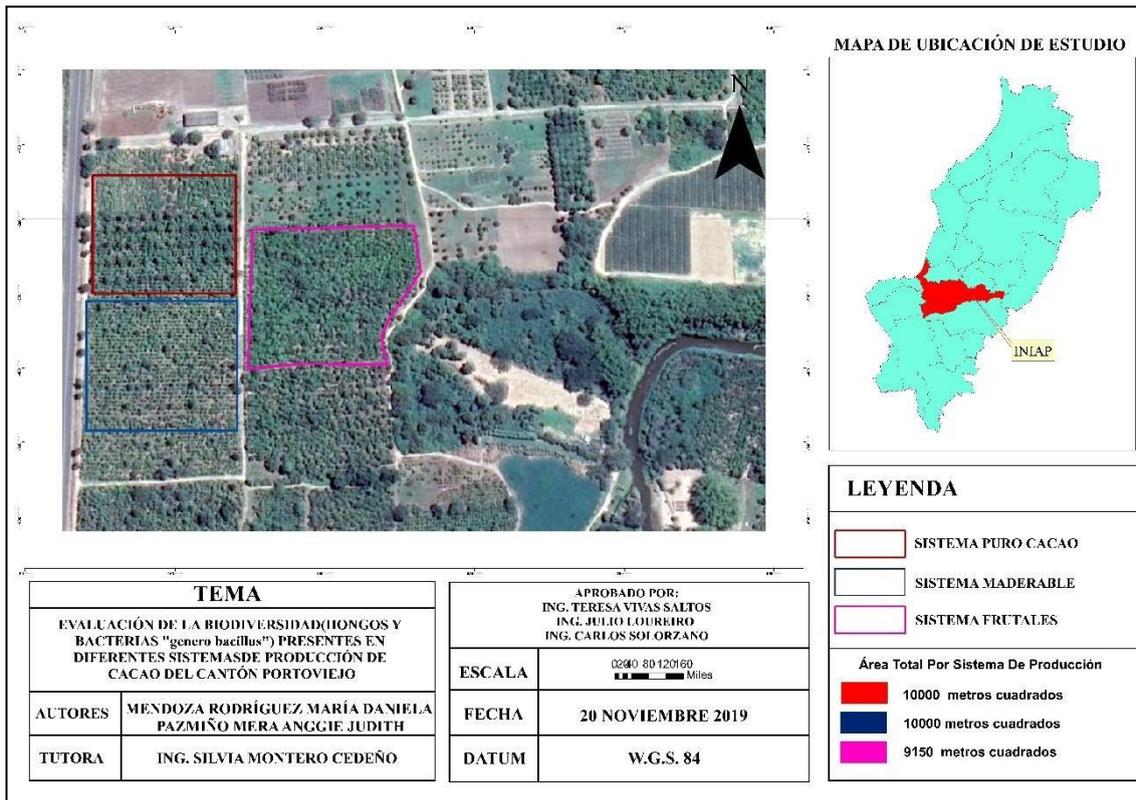


Figura 4.1. Polígonos de cada sistema de producción.

Se delimitaron los tres sistemas de producción; primer sistema de cacao monocultivo (color rojo), segundo sistema maderable (color azul) y tercer sistema frutales (color rosado) tal como se muestra en la figura 4.1.

De esta forma se procedió a realizar un transecto en cada uno de los sistemas de producción de cacao, al tener una área menor a 1 ha se realizaron los transectos donde se encontró la mayor concentración de vegetación, siguiendo con la metodología propuesta por Alvis, (2009).

4.1.2. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS

Se identificaron en los tres sistemas de producción de cacao un total de 177 unidades propagadoras de hongos, unificado en ambas épocas del año; distribuidos en ocho grupos: *Aspergillus*, encontrada en los sistemas de producción de cacao con maderables; en las épocas seca y lluviosa. La especie *Beauveria*, se encontró en el sistema de producción cacao con frutales; en las épocas seca y lluviosa. *Bipolaris tetramera*, se encontró en el sistema de producción cacao con maderables; en la época lluviosa. *Cladosporium*, se encontró en los tres sistemas de producción; en las épocas

seca y lluviosa.

Fusarium solani, se encontró en los sistemas de producción; monocultivo y cacao con maderables, en la época lluviosa. *Paecilomyces*, se encontró en los sistemas de producción; cacao con maderables y cacao con frutales, en las épocas seca y lluviosa. *Penicillium*, se encontró en los sistemas de producción; monocultivo y cacao con frutales, en las épocas seca y lluviosa. *Trichoderma harzianum*, se encontró en el sistema de producción de monocultivo, en la época seca.

Tabla 4.2. Total de hongos identificados en las dos épocas.

N°	Especies identificadas	Sistema de producción	Época	Unidades propagadoras de hongos
1	<i>Aspergillus</i>	Cacao con maderables	Seca - lluviosa	10
2	<i>Beauveria</i>	Cacao con frutales	Seca - lluviosa	5
3	<i>Bipolaris tetramera</i>	Cacao con maderables	Lluviosa	5
4	<i>Cladosporium</i>	Monocultivo-cacao. Maderables. Frutales	Seca - lluviosa	45
5	<i>Fusarium solani</i>	Monocultivo cacao. Maderables	Lluviosa	7
6	<i>Paecilomyces</i>	Cacao con maderables. Cacao con frutales	Seca - lluviosa	27
7	<i>Penicillium</i>	Monocultivo. Cacao con frutales	Seca - lluviosa	76
8	<i>Trichoderma harzianum</i>	Monocultivo	Seca	2
				177

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019)

Durante la época seca, se identificaron seis de los ocho grupos encontrados en esta investigación como se muestra en el (tabla 4.3) con un total de 60 unidades propagadoras de hongos, divididas de la siguiente manera: Se observó en el sistema de producción monocultivo un total de 19 unidades propagadoras de hongos de los cuales corresponden: seis *Cladosporium*, once *Penicillium* y dos a *Trichoderma harzianum*. Mientras que dentro del sistema de producción cacao con maderable se identificaron un total de 11 unidades propagadoras de hongos, distribuidos en tres especies de hongos:

tres *Aspergillus*, seis *Cladosporium* y dos *Paecilomyces*. Así mismo en el sistema de producción frutal se identificó 30 unidades propagadoras de hongos de los cuales fueron; un *Beauveria*, siete *Cladosporium*, cuatro *Paecilomyces* y 18 *Penicillium* (**tabla 4.3**).

Así mismo es apreciable que el sistema de producción de cacao con frutales reportó un mayor número de unidades propagadoras de hongos que

corresponde al (50%) de representatividad de especies general, mientras que sistema de producción de cacao monocultivo aportó un (31,67%) de representatividad de especies general y el sistema de cacao con maderables presentó el nivel más bajo de unidades propagadoras de hongos con un (18.33%) de representatividad de especies general (**tabla 4.3**).

Estos resultados coinciden en la investigación presentada por Arévalo-Gardini *et al.* (2020) encontraron seis géneros de hongos de los ocho descritos en esta investigación; excluyendo a 3) *Trichoderma harzianum* y 6) *Beauveria*. Estos autores pudieron identificar un total de veinticuatro géneros de hongos asociados a los sistemas agroforestales del cacao en la Amazonía peruana. A pesar de que los datos comparados varían en cuanto al número de géneros fúngicos, se destaca que la investigación descrita contempla condiciones climatológicas distintas y comprende una región amazónica a diferencia de este caso que es en la costa ecuatoriana.

Un aspecto importante a destacar es que en los tres sistemas de producción de cacao no se encontró hongos antagonistas comunes como la *Moniliophthora roreri*; causante de enfermar el fruto del cacao y se ha convertido en el problema más representativo en áreas productoras, incluido Portoviejo. Esto indica que las especies identificadas en la rizosfera de los sistemas de producción pueden combatir y controlar la proliferación de hongos. En este mismo contexto, se guarda correspondencia con lo establecido por Betancourt *et al.* (2016) quienes aislando y evaluando hongos nativos antagonistas de *Moniliophthora roreri* en el cultivo de cacao, llegaron a la conclusión que otras especies asociadas pueden ser agentes de control biológico de estos hongos patógenos.

Tabla 4.3. Especies de hongos identificadas durante la época seca.

Sistema de producción	Especie identificada	Unidades propagadoras de hongos	% de representatividad de especies	% de representatividad de especies general
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	6	31,58	10,00
	<i>Penicillium</i>	11	57,89	18,33
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	10,53	3,33
	Total	19	100,00	31,66
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	3	27,27	5,00
	<i>Cladosporium</i>	6	54,55	10,00
	<i>Paecilomyces</i>	2	18,18	3,33
Cacao con frutales	Total	11	100,00	18,33
	<i>Beauveria</i>	1	3,33	1,67
	<i>Cladosporium</i>	7	23,33	11,67
	<i>Paecilomyces</i>	4	13,33	6,67
	<i>Penicillium</i>	18	60,00	30,00
	Total	30	100,00	50,01

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

Durante la época lluviosa, se identificaron un total de 117 unidades propagadoras de hongos; aproximadamente dos veces más en comparación con la época seca. Asimismo, se reportó un mayor número de especies, el total siete (**tabla 4.4**) mencionadas previamente. En esta época del año, en el sistema de cacao con frutales se observó un total de 53 unidades propagadoras de hongos que corresponde al (45,30%) de la representatividad de especie general (**tabla 4.4**), distribuido en: Cuatro *Beauveria*, nueve *Cladosporium*, 16 *Paecilomyces*, 24 *Penicillium*. Mientras que en el sistema monocultivo se identificaron 36 unidades propagadoras de hongos (30%) de la representatividad de especie general distribuidos en: Nueve *Cladosporium*, cuatro *Fusarium solani* y 23 *Penicillium*. El sistema de producción de cacao con maderables se observó el nivel más bajo de unidades propagadoras de hongos, 28 total los que corresponde al (23,93%) de la representatividad de

especies general divididas en: siete *Aspergillus*, cinco *Bipolaris tetramera*, ocho *Cladosporium*, tres *Fusarium solani* y cinco *Paecilomyces* (**tabla 4.4**).

Estos resultados muestran que durante la época lluviosa se presentan mejores condiciones de adaptación y desarrollo para unidades propagadoras de hongos. Las condiciones de lluvia permiten que las plantas puedan mejorar su estado ya

que reciben un mayor aporte de nutrientes que ayudan al desarrollo de sus sistemas; incluido el radicular. Estos resultados tienen relación con lo mencionado por Gałazka *et al.* (2017) quienes concluyen que la aparición de un mayor número de unidades propagadoras de hongos está probablemente relacionada con un sistema radicular más desarrollado en suelos con buena aptitud para la agricultura, donde el crecimiento de las plantas es más extenso, y proveen un hábitat óptimo principalmente hongos micorrícicos, estableciendo simbiosis con las plantas.

Tabla 4.4. Especies de hongos identificadas durante la época lluviosa.

Sistema de producción	Especie identificada	Unidades propagadoras de hongos	% de representatividad de especies	% de representatividad de especies general
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	9	25,00	7,69
	<i>Fusarium solani</i>	4	11,11	3,42
	<i>Penicillium</i>	23	63,89	19,66
	<i>Total</i>	36	100,00	30,77
	<i>Aspergillus</i>	7	25,00	5,98
	<i>Bipolaris tetramera</i>	5	17,86	4,27
	Cacao con maderables	<i>Cladosporium</i>	8	28,57
<i>Fusarium solani</i>		3	10,71	2,57
<i>Paecilomyces</i>		5	17,86	4,27
<i>Total</i>		28	100,00	23,93
<i>Beauveria</i>		4	7,55	3,42
Cacao con frutales	<i>Cladosporium</i>	9	16,98	7,69
	<i>Paecilomyces</i>	16	30,19	13,68
	<i>Penicillium</i>	24	45,28	20,51
	<i>Total</i>	53	100	45,30

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En el gráfico 4.1 se muestra la representatividad de especies de hongos en los tres sistemas de producción de cacao identificadas durante las dos épocas del año. Se puede apreciar que, en la época seca, la especie con mayor abundancia fue el *Penicillium* este tipo de género de hongos es más abundante en suelos de sistemas agroforestales tradicionales (Tangjang *et al.*, 2009).

Mientras que la especie *Cladosporium* no es tan significativa como el *Penicillium*, su presencia puede ser un indicador para someter las plantaciones a un control biológico. Autores como Riascos *et al.* (2011) han asociado a enfermedades no

Específicas del cultivo del cacao con la presencia de especies del género *Cladosporium*; ocasionando muerte de las plántulas y ramas, retrasos en la producción y floración, afectación en la calidad de los frutos, y hasta pérdidas económicas severas

Las especies *Trichoderma harzianum* y *Beauveria* fueron las menos abundantes, en el sistema de producción monocultivo y el sistema de producción de cacao con frutales, respectivamente. Estos dos géneros fúngicos son menos abundantes en los sistemas de producción de cacao que reciben un mayor control. Es en este contexto autores como Arévalo-Gardini *et al.* (2020) no registran a estas dos especies en sistemas agroforestales de cacao cuya diversidad es alta.

Asimismo, en la época lluviosa, la especie con mayor abundancia fue el *Penicillium* en los sistemas de producción de monocultivo y frutales. Mientras que la especie *Beauveria* es la menos abundante en los sistemas de producción de cacao con frutales.

Los sistemas de monocultivos y asociación de cacao con frutales, en ambas épocas del año, no registran presencia de hongos claves como los del género *Aspergillus* que tienen la capacidad de liberar antibióticos y mantener el equilibrio. Esto puede reducir en la rizosfera la capacidad para sintetizar compuestos particulares a las plantas, facilitar la absorción de ciertos nutrientes del suelo y disminuir los problemas de enfermedades en las plantas (Hayat *et al.*, 2010).

A pesar de que en los tres sistemas de producción se predominan las plantaciones de cacao, la presencia de especies de hongos es variable. La única especie que se encuentra disponible en los tres sistemas de producción es el *Cladosporium* que es una especie saprófita que generalmente se presenta en medios donde hay disponibilidad de materia orgánica (Hulikere y Joshi, 2019) y las plantaciones de cacao aportan con este nutriente a través del proceso de degradación del follaje.

Otro factor que interviene en las fluctuaciones de especies de hongos en los sistemas de producción de cacao es la intervención de otras plantas debido a que cuando los sistemas presentan más de una especie de plantas, la diversidad de microorganismos también aumenta (Morocho y Leiva2019). Es por ello que en el sistema de monocultivos se encuentra disponible un menor número de especies de hongos, a diferencia de los sistemas combinados con plantas frutales y maderables.

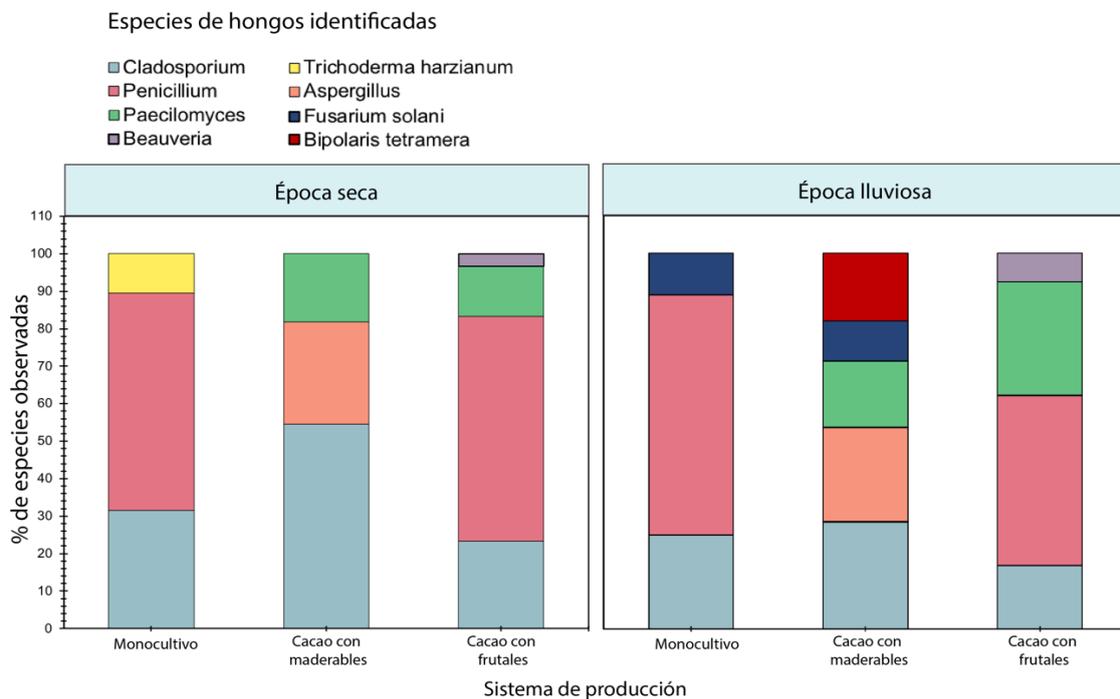


Gráfico 4.1. Representatividad de especies de hongos en los tres sistemas de producción de cacao identificadas durante las dos épocas del año

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En el caso de bacterias, durante la época seca se identificó únicamente una

población del género *Bacillus*, con un total de 5951 bacterias formadoras de colonias distribuidos en sistema de producción monocultivo 1492 bacterias formadoras de colonias de género *Bacillus* que corresponde al 25,07% en el sistema de producción de cacao con maderables se encontró 2758 bacterias formadoras de colonias los mismos que representa el 46,34% mientras que el sistema de producción de cacao con frutales se identificó 1701 bacterias formadoras de colonias de género *Bacillus* que representa el 28,59% (**tabla 4.5**). Autores como Alvarado *et al.* (2015) respaldan a bacterias del género *Bacillus* como “estimulantes de efectos antimicrobiano en plántulas de cacao y promotoras del desarrollo características físicas como las raíces, área y altura de tallo” es necesario considerar que una mayor diversidad también estimula el equilibrio y salud de los sistemas de producción.

Tabla 4.5. Especies de bacterias identificadas durante la época seca.

Sistema de producción	Características de la especie identificada	Tinción Gram	N de bacterias formadoras	% de representatividad general de especies
Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	-		
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+		
	Total		1492	25,07
Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano	-		
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+		
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados	+		
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	-		
	<i>Bacillus</i> largos encadenados	+		
	<i>Bacillus</i> encadenados largos y pequeños	-		
Total			2758	46,34
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> en cadenas con extremos redondeados y cuadrados	+		
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño medianos y grandes	+		
	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+		
Total			1701	28,59

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En la tabla 4.5 se muestra las características y representatividad de las especies de bacterias identificadas durante la época lluviosa. Al igual que en la época seca, se continuó observando e identificando bacterias formadoras de colonias del género *Bacillus*, con una mayor representatividad de 7137 teniendo en cuenta que es el total de la suma de cada bacteria formadora de colonias de género bacillus identificados en los tres sistemas de producción de cacao; es notorio un aumento de 1186 bacterias formadoras de colonias. En este caso, varió el patrón de la distribución de bacterias formadoras de colonias, siendo el sistema producción cacao con maderables el más representativo con 40,09% que corresponde a un total de 2861 bacterias formadoras de colonias. Luego se

encuentra el sistema de producción cacao con frutales 2477 bacterias formadoras de colonias, equivalente al 34,71% y finalmente el sistema de producción monocultivo que se encontró un total de 1799 bacterias formadoras de colonias 25,21% (**tabla 4.6**).

Tabla 4.6. Especies de bacterias identificadas durante la época lluviosa.

Sistema de producción	Características de la especie identificada	Tinción Gram	N de bacterias formadoras de colonias	% de representatividad general de especies
1 Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	-		
	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados y	+		
	Total		1799	25,21
2 Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados y	+		
	<i>Bacillus</i> redondeados de tamaño mediano	-		
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+		
	<i>Bacillus</i> largos en cadenas con extremos redondeados	-		
	<i>Bacillus</i> largos con extremos redondeados	+		

	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+		
	Total		2861	40,09
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+		
3	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+		
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+		
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	-		
	Total		2477	34,71

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En ambas épocas del año, únicamente fueron observadas bacterias del género *Bacillus*; predominando en las dos épocas de evaluación la representatividad de bacterias Gram positivas del género *Bacillus*, coincidiendo con Leiva *et al.* (2013)

quienes argumentan que los sistemas de producción de cacao son ricos en este tipo de bacterias.

Uno de los parámetros que podría generar esta condición es el pH, debido a que las bacterias son muy sensibles a cambios mínimos del mismo. Este argumento coincide con el de Grządziel y Gałązka (2018) quienes encontraron que la composición de las bacterias está estrechamente correlacionada con el tipo de suelo, pero principalmente con el pH. Por lo tanto, es necesario que en estudios futuros también se considere la evaluación de este parámetro para argumentar apropiadamente la ausencia de otro tipo de bacterias que no pertenecen al género *Bacillus*.

4.2. DETERMINAR ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS EN LA RIZOSFERA DE CACAO EN TRES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

4.2.1. ESTIMACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD DE HONGOS Y BACTERIAS.

Durante la época seca se encontró menor diversidad de especies de hongos, en comparación con la época lluviosa; comprendiendo niveles del H Shannon entre 0,92–1,03 para los distintos Sistemas de producción de cacao. Es así que haciendo una relación con las categorías propuestas por Cedeño y Quinteros (2016), se determinó una *Baja diversidad* de hongos para la época seca. Por otra parte, el H Simpson guarda correspondencia con los datos del primer hallazgo en que las especies identificadas de hongos durante la época seca, registran una Baja diversidad (Anexo 7g); a pesar que tiene una escala distinta de medición, que cuando el H se aproxima más a 1, la diversidad también disminuye. Para el H Simpson, durante la época seca oscila desde 0,36 para el sistema productivo de cacao con frutales hasta 0,45 para el sistema productivo de Monocultivo (**tabla 4.7**).

Este hallazgo se relaciona con lo indicado por Pasquale *et al.* (2019) en su bioensayo con hongos donde destacan al *Paecilomyces* como importante para los sistemas naturales por su poder de biomineralización. Además, también

pueden ser un indicador de calidad de suelos productivos por su aporte de minerales esenciales que sirven para el desarrollo y crecimiento de plantas.

Tabla 4.7. Biodiversidad de especies de hongos en la época seca.

Sistema de producción	Especie identificada	Unidades propagadoras de hongos	H Shannon	H Simpson
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	6	0,36	0,10
	<i>Penicillium</i>	11	0,32	0,34
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	0,24	0,01
	<i>Total</i>	19	0,92	0,45
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	3	0,35	0,07
	<i>Cladosporium</i>	6	0,33	0,30
	<i>Paecilomyces</i>	2	0,31	0,03
	<i>Total</i>	11	0,99	0,40
Cacao con	<i>Beauveria</i>	1	0,11	0,00
	<i>Cladosporium</i>	7	0,34	0,05
	<i>Paecilomyces</i>	4	0,27	0,02

frutales	<i>Penicillium</i>	18	0,31	0,36
	<i>Total</i>	30	1,03	0,43

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En el cuadro 4.8 se presentan los resultados obtenidos en la determinación del grado de biodiversidad de especies de hongos durante la época lluviosa mediante los H Shannon y H Simpson. Los valores obtenidos para el H Shannon oscilan entre 0,88–1,56 (Anexo 7h); demostrando baja biodiversidad para los tres sistemas de producción de cacao, especialmente en el sistema de monocultivo. Los hallazgos presentados en este estudio guardan correspondencia con los de Sangabriel *et al.* (2017) quienes también realizaron un estudio similar, pero en plantaciones de papaya; obteniendo como resultado ocho morfotipos distintos de hongos en diferentes cultivos y un H Shannon de hasta 0,89

Por otra parte, con el H Simpson se obtiene un mejor estado de la biodiversidad de hongos, sobretodo en el sistema de producción cacao con maderables (H Simpson= 0,22). A pesar de que en este sistema se reportó un menor número de unidades propagadoras de hongos (28 en total); la biodiversidad resultó ser más positiva; demostrando que no siempre la abundancia en un hábitat es indicador de mayor biodiversidad. Se puede asociar a que, en este sistema, al existir especies maderables, la biodiversidad de hongos es mayor ya que encuentran en estas plantaciones nutrientes para su desarrollo, como lo afirman Montano y Palomino (2012).

A pesar de que las condiciones tropicales de Ecuador permiten el desarrollo de un alto grado de biodiversidad, especialmente en la época lluviosa, para este estudio no se pudo obtener un resultado ajustado a una alta biodiversidad de hongos. Esto se asocia a que Portoviejo tiene una influencia importante de ecosistemas secos tropicales y según Gilbert y Sousa (2002) en este tipo de ecosistemas, a diferencia de los húmedos tropicales que presentan mejores condiciones para que los hongos puedan vivir en simbiosis o como hospedero en especies de plantas, particularmente arbustos o árboles

Tabla 4.8. Biodiversidad de especies de hongos en la época lluviosa.

Sistema de producción	Especie identificada	Unidades propagadoras de hongos	H Shannon	H Simpson
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	9	0,35	0,06
	<i>Fusarium solani</i>	4	0,24	0,01
	<i>Penicillium</i>	23	0,29	0,41
	Total	36	0,88	0,48
	<i>Aspergillus</i>	7	0,35	0,06
Cacao con maderables	<i>Bipolaris tetramera</i>	5	0,31	0,03
	<i>Cladosporium</i>	8	0,36	0,08
	<i>Fusarium solani</i>	3	0,24	0,02
	<i>Paecilomyces</i>	5	0,31	0,03
	Total	28	1,57	0,22
Cacao con frutales	<i>Beauveria</i>	4	0,20	0,01
	<i>Cladosporium</i>	9	0,30	0,03
	<i>Paecilomyces</i>	16	0,36	0,08
	<i>Penicillium</i>	24	0,36	0,21
	Total	53	1,22	0,33

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

En la tabla 4.9 se presentan los resultados obtenidos en la determinación del grado de biodiversidad de especies de bacterias durante la época seca y lluviosa mediante los H Shannon y H Simpson. En los tres sistemas de producción y durante ambas épocas, se reporta un grado de biodiversidad nulo: H Shannon= 0 y H Simpson= 1. A pesar de que las bacterias se han presentado en poblaciones altamente densas, en comparación con los hongos, los índices reportados demuestran que no hay diversidad.

Se reportó diversidad nula debido a que solamente existe un solo tipo de bacterias; lo cual significa que, aunque exista un alto número de individuos; los índices de diversidad solamente van a reportar el valor de “no diversidad de especies” (H Shannon= 0 y H Simpson= 1). Al no existir otra especie comparativa, la cantidad de microorganismos solamente podrá referirse a abundancia y no a diversidad.

Tabla 4.9. Biodiversidad de especies de bacterias en la época seca y lluviosa.

Época del año	Sistema de producción	Especie identificada	Bacterias formadoras de colonias	H Shannon $-\sum P_i \ln P_i$	H Simpson $\frac{n_i^2}{N}$
Seca	1 Monocultivo	<i>Bacillus</i>	1492	0,00	1
	2 Cacao con maderables	<i>Bacillus</i>	2758	0,00	1
	3 Cacao con frutales	<i>Bacillus</i>	1701	0,00	1
Lluviosa	1 Monocultivo	<i>Bacillus</i>	1799	0,00	1
	2 Cacao con maderables	<i>Bacillus</i>	2861	0,00	1
	3 Cacao con frutales	<i>Bacillus</i>	2477	0,00	1

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

Esto muestra que los hongos pueden generar un mayor equilibrio en la rizosfera de las plantaciones de cacao, a diferencia de las bacterias encontradas. El número de especies es importante para la salud del suelo y plantas, pero, sobre todo, la biodiversidad funcional que las especies proporcionan hace que el ecosistema funcione de manera eficiente y sostenible.

Los hongos presentes en el suelo tienen un papel importante en todos los procesos en la descomposición que permiten la mineralización y de esta manera se recicla muchos nutrientes de la planta. En los suelos, los hongos se interactúan por medio de una compleja comunidad microbiana que incluye:

bacterias, actinomicetos (Actino bacterias) y otros pequeños invertebrados. Cabe recalcar que los hongos son de gran importancia en la cadena alimenticia para el suelo, particularmente para la fauna que se encuentra en éste como fue declarado por Frac *et al.* (2018).

5.1. CARACTERIZAR LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CACAO, COMO APORTANTES EN LA COMPOSICIÓN DE LA RIZOSFERA.

5.1.1. IDENTIFICAR LA FLORA EXISTENTE EN LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CACAO

En el sistema cacao monocultivo, se encontraron tres tipos de clones de cacao, el EEP 95, EEP 96 y EPP 103, conocer los clones que hay en una plantación de cacao es importante, porque al ser este un cultivo auto compatible necesita la presencia de diferentes clones que sean compatibles entre ellos y de esta manera asegure su producción.

Para ANACACAO, (2015) la homogenización de clones de cacao asegura el éxito de su producción, ya que en el caso al sembrarse un solo clon se corre un alto riesgo de pérdida del sistema. De esta forma recomienda los clones EEP 95, EEP 96 y EPP 103 por su alta adaptabilidad a las mayorías de condiciones climáticas.

Se logró identificar en este sistema las siguientes especies de flora; (Malezas). *Dioscorea Communis*, *Conyza Sumatrensis*, *Croton Mononothogynus*, *Clematis Vitalba*, *Trifolium Repens*. Dentro del sistema de producción cacao frutal se identificó cuatro especies de cítrico distribuidas de la siguiente manera; *Lantana Camara*, *Citrus Reshni*, *Citrus Reticulata*, *Citrus X Sinensis*. Mientras que en el sistema de producción cacao maderable se identificaron las especies *Handroanthus Chrysanthus* y *Cedrus*, (cuadro 4.9).

El manejo de muestreo aleatorio para la identificación de la flora coincide con Mostacedo, B y Fredericksen, T (2000) donde mencionan que este tipo de muestreo se emplea cuando se posee con poca información previa sobre las características del lugar o tipo de especies.

El uso de una guía forestal para la identificación de la flora coincide con Gaviria y Sabogal (2013) donde nos mencionan que es una herramienta técnica que nos permite disponer de una serie de elementos que facilitan la identificación de especies.

5.1.2. CUANTIFICAR EL NÚMERO DE FLORA EXISTENTE EN CADA SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE CACAO

Tener una cuantificación correcta de la flora existente en cada sistema de producción de cacao nos ayuda a controlar los componentes de cada uno, es así que dentro de cada sistema varía la distancia entre especie. De esta manera dentro del sistema monocultivo de cacao se encuentran especies a 2,5 m de distancia, así mismo cada especie identificada dentro del sistema maderable hay 13 especies distribuidas a 10 m de separación entre especies, mientras que en el sistema frutales las especies identificadas la distancia varía entre 3 a 5 metros. De esta forma se logró cuantificar un total de 28 individuos de flora (malezas dentro del sistema de cacao monocultivo, dentro del sistema de producción frutales se registró 16 individuos de cítricos y en el sistema maderable 13 individuos de flora. Cabe mencionar que cada sistema de producción posee diferentes clones de cacao, además hay que tener en cuenta que dentro de cada sistema cada tipo de flora brinda sus beneficios ambientales.

La diversidad de flora en cada sistema de producción aporta nutrientes al suelo mediante sus hojas, frutos que al caer estos al descomponerse aportando a la proliferación de hongos y bacterias que usan los residuos de las plantas como alimentos. Estos residuos son liberados por debajo del suelo en forma que se pueda utilizar en las plantas.

Tabla 4.10. Especies de flora existentes en los tres sistemas de producción de cacao.

Sistema	N°	Nombre Común	Nombre Científico	Familia
Maderable	9	Amarillo	<i>Handroanthus chrysanthus</i>	Fabaceae
	4	Cedro	<i>Cedrela odorata</i>	Pinaceae
	1	Mandarina Cleopatra	<i>Citrus reshni</i>	Rutaceae
Frutales	2	Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae
	10	Naranja	<i>Citrus X sinensis</i>	Rutaceae

	3	Frutillo	<i>Lantana camara</i>	Rosaceae
	5	Viuda Negra	<i>Dioscorea communis</i>	Dioscoreaceae
	3	Erigeron Sumatrensis	<i>Conyza sumatrensis</i>	Asteraceae
Monocultivo	8	Crotón	<i>Croton mononothogynus</i>	Euphorbiaceae
	7	Abiatadera	<i>Clematis vitalba</i>	Ranunculaceae
	5	Trébol Blanco	<i>Trifolium repens</i>	Faboideae

Fuente: Mendoza y Pazmiño (2019).

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se identificaron un total ocho grupos de hongos: 1) *Cladosporium*, 2) *Penicillium*, 3) *Trichoderma harzianum*, 4) *Aspergillus*, 5) *Paecilomyces*, 6) *Beauveria*, 7) *Fusarium solani* y 8) *Bipolaris tetramera*; mientras que, para el caso de bacterias, solamente se identificó una especie del género *Bacillus*.
- Se determinó índices de biodiversidad bajos: H Shannon= 0,92–1,03 para la época seca y 0,88–1,56 para la época lluviosa; y H Simpson= 0,40–0,45 en época seca y 0,22–0,48 en época lluviosa; aunque en este último caso el 0,22 se aproxima más a 0 indicando una mayor biodiversidad del hábitat. La época lluviosa es más óptima para la abundancia de especies; registrando un total de 7137 vs 5951 colonias de bacterias en la época seca y 117 vs 60 aislamiento de colonias de hongos, respectivamente.
- Los sistemas de producción de cacao están constituidos por una diversidad de especies destacándose aquellos con frutales con especies de cítricos como: *Citrus Reshni*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* y maderables con las especies *Handroanthus chrysanthus* y *Cedrela odorata*.

5.2. RECOMENDACIONES

- Incorporar el análisis de otras variables asociadas a los sistemas de producción de cacao, tales como: pH y textura del suelo para relacionar su influencia en la biodiversidad de bacterias y hongos presentes en la rizosfera de estos cultivos.
- Aplicar otros métodos o índices de biodiversidad, p. eje: Índice de Magurran e Índice de la estructura vertical para contrastar los resultados encontrados en este estudio.
- Aislar hongos benéficos, p. eje: *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Penicillium* para experimentar en el rendimiento de los tres sistemas productivos de cacao, ya que estudios comprueban que los hongos contribuyen en más de un 50% a la biomasa total de las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro-Flores, A., Morales-Belpaire, I., & Schneider, M. (2015). Microbial biomass and cellulase activity in soils under five different cocoa production systems in Alto Beni, Bolivia. *Agroforestry systems*, 89(5), 789-798.
- Álvarez María del Mar, Blandón Lily J, Ceballos Valeria & Mejía Michelle. (2014). Preparación de medios de cultivo. (En línea). Consultado, 16 de mayo. 2020. Formato PDF. Disponible en: <file:///C:/Users/ROLANDO%20MENDOZA/Desktop/maroooooooooooo/3666-Texto%20del%20art%C3%ADculo-6053-1-10-20181029.pdf>
- Alvis, J. 2009. Análisis estructural de un bosque natural localizado en zona rural del municipio de Popayán. Cauca, CO. *Revista Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Obtenido de vol. 7. p. 115–122.
- Alvarado-Capó, Y., Martín, M. C., Mena, E., Suárez, M. A., Roque, B., Pichardo, T., & Padrón, L. (2015). Efecto de *Bacillus* spp. sobre el crecimiento y rendimiento agrícola de plantas in vitro de papa cv.Romano'en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*, 15(2).
- Anecacao, (2015). CACAO NACIONAL. (En línea). Consultado, 15 de mayo. 2019. Formato HTML. Disponible en: <http://www.anecacao.com/index.php/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>
- ANECACAO. 2015. Exportación Ecuatoriana De Cacao. (En línea). Consultado, 15 de mayo de 2019. Formato PDF. Disponible en: http://www.anecacao.com/uploads/estadistica/resumen-exportacion-de-cacao-2015-anecacao-ecuador_1.pdf
- Arévalo-Gardini, E., Canto, M., Alegre, J., Arévalo-Hernández, C., Loli, O., Julca, A., y Baligar, V. (2020). Cacao agroforestry management systems effects on soil fungi diversity in the Peruvian Amazon. *Ecological Indicators*, 115, 106404.
- Arvelo, M. A., González León, D., Maroto, S., Delgado, T., & Montoya Rodríguez, P. (2017). Estado actual sobre la producción, el comercio y cultivo del cacao en América (No. IICA F01–81). IICA, San José (Costa Rica)

Fundación Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, San Luis Huexotla (México).

- Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, Minnesota, USA, 1998. p. 218.
- Benitez, S; Benttley, J; Bustamante, P; Sanchez, L; Corrales, L. 2007. Aislamientos de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova* 5:147–153
- Bernal, G. 2005. Microbiología de suelos en Ecuador. (En línea). Consultado, 15 de mayo. 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/1.-La-Microbiologia-de-Suelos.pdf>
- Bermúdez Mora, L. L. (2015). Desarrollo de manjar a base de leche de cabra, con ajonjolí (*Sesamum indicum*) (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad Ciencias Químicas).
- Betancourt, M., Rodríguez, A., & Ybrahím, R. (2016). Evaluación in vitro de hongos nativos antagonistas de *Moniliophthora rerei* (Cif. & Par., Evans et al.) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria).
- Bonilla, M. (2016). Manual de practicas microbiológicas. (En línea). Consultado, 17 de agosto de 2020. (En línea). Consultado, 17 de agosto de 2020. Formato PDF. Disponible en: http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/23Manual%20de%20microbiologia_09diciembre2016.pdf
- Bowen, C., Mardones, M., & Velásquez, L. (2014). Guía de laboratorio de microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Medicina.
- Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31–39.
- Casal, J., & Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev*, 1(1), 3–7.
- Castro. F. (2018). Técnicas de observación microscópica. (En línea). Consultado, 17 de agosto de 2020. Disponible en: <https://www.raig.com/blog/tecnicas-de-observacion-en-microscopia-27/>

- Cedeño, A., y Quinteros, E. (2016). Determinación de la calidad del agua mediante la comunidad de macroinvertebrados bentónicos en la subcuenca del río carrizal. TESIS DE INVESTIGACIÓN, Bolívar. Recuperado el 31 de Julio de 2018.
- Chase, R. B., Aquilano, N. J., CIOCIANO GONZALEZ, M. I. L. D. R. E. D., GARCIA ROCHA, A. N. G. E. L. A., & JACOBS, F. R. (2000). Administración de producción y operaciones: manufactura y servicios. IRWIN:
- CONAFOR. (Comision Nacional Forestal), 2017. Glosario. (En línea). Consultado, 22 DE Nov. 2019. Formato HTML. Disponible en:https://www.conafor.gob.mx/innovacion_forestal/?page_id=436
- Correa, O. (2013). Los microorganismos del suelo y su rol indiscutido en la nutrición vegetal. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: <file:///ChapterLOSMICROORGANISMOSDELSUELOYSUROLINDISCUTIDOE NLAPRODUCCINAGRCOLA.pdf>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. I., & Weigend, M. (2011). Factsheet: Datos botánicos de cacao. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: http://www.botconsult.com/downloads/Hoja_Botanica_Cacao_2012.pdf
- Ecuador, P. (2013). Pro Ecuador. Recuperado el, 28. Handelsman, J; Rondon, MR; Brady, SF; Clardy, J; Goodman, RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & biology 5(10): R245–R249.
- Ecuador. (2008). Constitución de la República del Ecuador 2008. Año II. Quito, Lunes, 20.
- ESPINOSA, J. y A. ROQUERA: “Zonificación agroecológica del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en las provincias de: Bolívar, Cotopaxi, Chimborazo y Tungurahua”, Revista Rumipamba, Vol. 21(1): 54–56, 2007.
- ETCHEGARAY, M. 1998. Innovación productiva en el mundo rural: el impacto en pequeños productores. En: Seminario de transformaciones en el mundo rural: desafíos para superar la pobreza. Fundación Nacional para la Superación de la Pobreza e Instituto de Educación Rural. Santiago, Chile. Extraído de la Memoria: Evaluación cualitativa de la adopción de tecnología

- básica de manejo silvícola de la Tesis de Francisco Céspedes Luna para optar el título de Ing. Forestal, 2005. Chile. 125 p.
- FAO, (2005). INVENTARIO FORESTAL NACIONAL MANUAL DE CAMPO MODELO. (En línea). Consultado, 22 de Mayo de 2020. Formato PDF. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ae578s.pdf>
- Farrell, J. G., & Altieri, M. A. (1997). Sistemas agroforestales. Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. (Ed. MA Altieri). CLADES/ACAO. La Habana, Cuba, 163.
- Farrell, J. G., & Altieri, M. A. (1997). Sistemas agroforestales. Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. (Ed. MA Altieri). CLADES/ACAO. La Habana, Cuba, 163.
- Fernández, S. (2013). Números Índices. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://www.fuenterrebollo.com/Economicas2013/indices-teoria.pdf>
- Fraç, M., Hannula, S. E., Belka, M., & Jędrzycka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in microbiology*, 9, 707.
- Gaviria, A., & Sabogal, C. É. S. A. R. (2013). Sistematización de seis experiencias de manejo forestal comunitario en la Amazonía peruana. Proyecto Inventario Nacional Forestal y Manejo Forestal Sostenible del Perú ante el Cambio Climático. FAO-Finlandia/MINAG-MINAM, 94.
- Gałazka, A., Karolina, G., Jarosław, G., & Jerzy, K. (2017). Effect of different agricultural management practices on soil biological parameters including glomalin fraction. *Plant, Soil and Environment*, 63(7), 300-306.
- García I. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*. 2011; 43: 1-3
- Gilbert, G., & Sousa, W. (2002). Host Specialization among Wood-Decay Polypore Fungi in a Caribbean Mangrove Forest¹. *Biotropica*, 34(3), 396-404.
- Gómez, G. (2015). (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: http://www.secsuelo.org/wpcontent/uploads/2015/06/1.-La-MicrobiologiadeSuelos.pdf?fbclid=IwAR0Wav1SG8acthjINrlgjHdpP_MJL66EQev2OWCoqD8Mo w3WQArwm4J_YZg

- González, M. (2016). Verificación del método Simplate® Total Plate Count Color Indicator (TPC CI), comparado con el método estándar de recuento en placa por vertido, para el recuento total de microorganismos aeróbicos mesófilos en productos terminados y materias primas en una industria de alimentos deshidratados.
- González–Oliva, L., J. Ferro Díaz, D. Rodríguez–Cala y R. Berazaín. 2017. Métodos de inventario de plantas. Pp. 60–85. En: Diversidad biológica de Cuba: métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas (C. A. Mancina y D. D. Cruz, Eds.). Editorial AMA, La Habana, 502 pp.
- Grządziel, J., & Gałazka, A. (2018). Microplot long-term experiment reveals strong soil type influence on bacteria composition and its functional diversity. *Applied Soil Ecology*, 124, 117-123.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*, 5(10), R245-R249.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- Hulikere, M. M., & Joshi, C. G. (2019). Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides*. *Process Biochemistry*, 82, 199-204.
- Ibáñez, J. (2012). Hongos del Suelo. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato HTML. Disponible en: <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2012/05/17/140517>
- IICA, USAID, WCF y CICAD–OEA. 2006. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo de cacao en el Perú. Lima, Perú. 73 p.
- Iracheta, M. A. L. (2009). Bacterias y virus ¿Cómo nos defendemos? *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(1), 115–172.
- Jaimez, R. E., Tezara, W., Coronel, I., & Urich, R. (2008). Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*): su manejo en el sistema agroforestal. *Sugerencias*

- para su mejoramiento en Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 52(2), 253–258.
- Jaramillo, D. 2002. Introducción a la ciencia del suelo. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia. (En línea). Consultado, 15 de mayo. 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10a. ed. CABI. Wallingford, UK. 2008. p. 771.
- LAMPRECH, H, 1990. *Silvicultura de los trópicos*. Antonio Carrillo Dr.Escchborn; Alemania GTZ. 335p.
- LASSO B., CRUZ G., HARO P.: Zonificación agroecológica de tres cultivos estratégicos (Maíz, *Zea mays*; Arroz, *Oryza sativa*; Caña de azúcar, *Saccharum officinarum*) en catorce cantones de la cuenca baja del río Guayas, Centro de Levantamientos Integrados de Recursos Naturales por Sensores Remotos (CLIRSEN), Venezuela, 2011.
- Leiva, E., Osorio, M., & Ramírez, R. (2013). Microorganismos asociados a la rizosfera del cacao (*Theobroma cacao* L) en condiciones de bosque húmedo premontano (Bh-PM). *Suelos Ecuatoriales*, 43(1), 35-45.
- Martínez, O., Valenzuela, E., & Godoy, R. (2006). Poblaciones viables y grupos funcionales de hongos presentes en suelos de bosque de *Araucaria-Nothofagus* post-incendio. *Boletín Micológico*, 21.
- Maycotte M, (2011). *Sistemas Agroforestales*. . (En línea). Consultado, 30 de mayo. 2019. Formato PDF. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/4779/sistemas_agroforestales.pdf
- Moreno, A. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
- Moreno, J. A. C. (2016). Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/art69.pdf>
- Mostacedo, B y Fredericksen, S. (2000). *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. (En línea). Consultado, 22 de Nov

- de 2019. Formato PDF. Disponible en:<http://www.bionica.info/biblioteca/mostacedo2000ecologiavegetal.pdf>
- Morales, E. R. B. (2015). Manejo de cultivos andinos del Ecuador. *EL AGRO*, 63-64.
- Méndez, C.A. Camacho, J. E. Echeverry, S. (2015). Identificación de bacterias y hongos en el aire de Neiva, Colombia. *Salud Pública*. 17 (5). p 732. Recuperado de: https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rsap/v17n5/v17n5a07.pdf
- Montano, R., & Palomino, E. (2012). Diversidad de hongos e insectos xilófagos en bosque y aserraderos de selva central.
- Navarro, H. (2005). Sistemas de producción y desarrollo agrícola. Consultado, 26 de junio. 2019. Formato PDF. Disponible en: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/carton01/010011625.pdf
- Ochoa, M. C., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65–71.
- Ortíz–Castro R, Contreras–Cornejo H, Macías–Rodríguez L, López–Bucio J. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*. 2009;4(8):701–12
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2010). Como abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Enumeración de microorganismos. Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología.
- Osorio, W., & Casamitjana, M. (2011). Toma de muestras de suelo para evaluar la fertilidad del suelo. *Suelos Ecuatoriales*, 41(1), 23–28.
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K iphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25.
- Padilla-Velarde, E., Cuevas-Guzmán, R., Ibarra-Manríquez, G., & Moreno-Gómez, S. (2006). Riqueza y biogeografía de la flora arbórea del estado de Colima, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 77(2), 271-295

- Pajares, S. (2018). Manual de practicas. (En línea). Consultado, 17 de agosto de 2020. Disponible en: http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/23Manual%20de%20microbiologia_09diciembre2016.pdf
- Pasquale, V., Fiore, S., Hlayem, D., Lettino, A., Huertas, F. J., Chianese, E., & Dumontet, S. (2019). Biomineralization of carbonates induced by the fungi *Paecilomyces inflatus* and *Plectosphaerella cucumerina*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 140, 57-66.
- Polo, M. 2015. Métodos y Técnicas de Investigación. (En línea). Consultado, 20 De Jun. 2019. Formato pdf. Disponible en:<http://www.redalyc.org/pdf/310/31043005061.pdf>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583–590.
- Priego–Castillo, G. A., Galmiche–Tejeda, A., Castelán–Estrada, M., Ruiz–Rosado, O., & Ortiz–Ceballos, A. (2009). Evaluación de la sustentabilidad de dos sistemas de producción de cacao: estudios de caso de unidades de producción rural en Comalcalco, Tabasco. *Universidad y ciencia*, 25(1), 39–57.
- PROECUADOR. 2013. Análisis sectorial de café. Instituto de Promociones de Exportaciones de cacao. (En línea). Consultado, 15 de mayo. 2019. Formato HTML. Disponible en: <https://www.proecuador.gob.ec/>
- Ramírez A. (2014). Estudio de la biodiversidad fúngica en el suelo del viñedo de la finca La Grajera. (En línea). Consultado, 22 de Nov de 2019. Formato PDF. Disponible en: https://biblioteca.unirioja.es/tfe_e/R000001909.pdf
- Riascos, D., Quiroga, I., & Hoyos, L. (2011). Análisis de la sintomatología de la roña en gulupa (*Pasiflora edulis* f. *edulis* SIMS). *Agron*, 19(1), 20-30.
- Roeder, A. 2004. Diversidad y Composición Florística de un área de Bosque de Terrazas en la Comunidad Nativa Aguaruna Huascayacu, en el Alto Mayo, San Martín – Perú. (En línea). Consultado, 7 de Dic de 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1733/F70–R6–T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rolf, D. 2004. The soil metagenome – A rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology* 15(3): 199–204.

- Rosero, L. 2002. Cacao. (En línea). Consultado, 15 de mayo de 2019. Formato HTML. Disponible en: <http://myslide.es/documents/cacao-55a234ed70c80.html>
- Ruiz, Sandro. (2011). Influencia de microorganismos sobre características fisicoquímicas de los suelos de cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.), en Tingo María (en línea). Consultado, 27 de jun de 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/903/T.EPG-32.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sangabriel, W., Trejo, D., Soto, A., & Alvarado, G. (2017). Diversidad y funcionalidad de hongos micorrízico-arbusculares en plantaciones de *Carica papaya* L., con diferente manejo agronómico. In CAB ABSTRACTS.
- Tangjang, S., Arunachalam, K., Arunachalam, A., & Shukla, A. K. (2009). Microbial population dynamics of soil under traditional agroforestry systems in Northeast India. *Research Journal of Soil Biology*, 1(1), 1-7.
- Tanya Morocho, M., & Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46(2), 93-103
- Tividor sebastian. (2019). Preparación de medios de cultivo para realizar siembras microbianas. (En línea). Consultado, 17 de agosto de 2020. Formato PDF. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/332916726_preparacion_de_medios_de_cultivos_para_siembras_microbianas_apuntes
- Vázquez, R., Martínez, A., Montiel, M., & Moya, X. (2018). Identificación y antibiosis de hongos filamentosos asociados a la rizosfera de papayo en la finca San Andrés. *Agricultura Tropical*, 4(2).
- Villarreal-Delgado, M. F, Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. L., Parra-Cotra, F. I., & Santos-Villalobos, S. D. L.(2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad Agrícola. *Revista Mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.
- Walter Palacio. (2016). Guía Dendrológica para los taxones arbóreos. (En línea). Consultado 22 de mayo del 2020. Formato HTML. Disponible en: <http://www.utn.edu.ec/ficayaemprende/?tag=arboles&print=print-search>

Willis. (2013). The Ecology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Sciences*, 32, 1–20. doi:10.1080/07352689.2012.68337

Zarco–Espinosa, 2010. Estructura y diversidad de la vegetación arbórea del Parque Estatal Agua Blanca, Macuspana, Tabasco. *Universidad y ciencia*, 26(1), 1–17.

ANEXOS

ANEXO 1
DELIMITACIÓN DEL
ÁREA DE ESTUDIO



A) Recorrido del área de estudio B) Toma coordenadas



limpieza del área de estudio



D) Toma de muestra

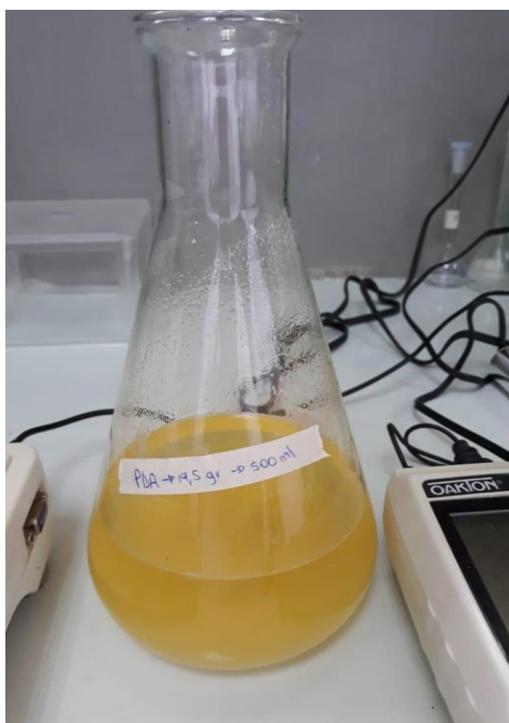
ANEXO 2 PREPARACIÓN DE MEDIO CULTIVO



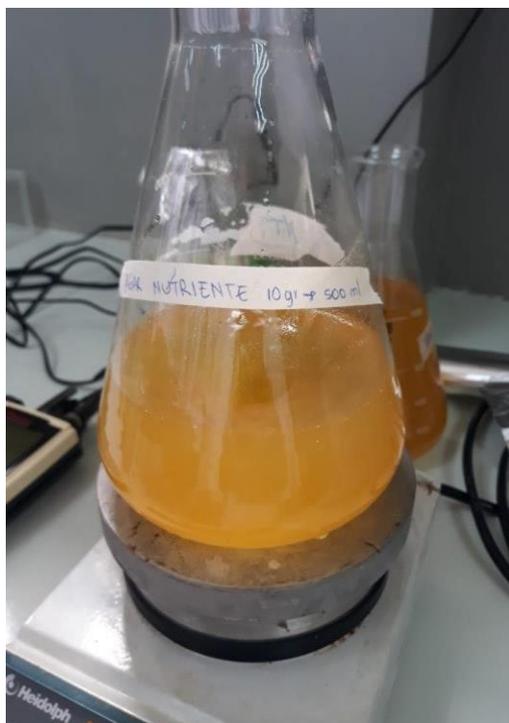
E) Muestras tomadas en cada sistema de producción



F) Preparación de medio de cultivo del agua peptona



G) Preparación de medio de cultivo PDA



H) Preparación de medio de cultivo de Agar Nutriente

ANEXO 2 PREPARACIÓN DE DILUCIONES



I) Mezcla de las muestras con los medios de cultivo



J) Realización de las diluciones de los medios de cultivo de bacterias



K) Diluciones realizadas en las placas



L) Diluciones en la estufa para mantener la temperatura óptima

ANEXO 3

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GENERO BACILLUS



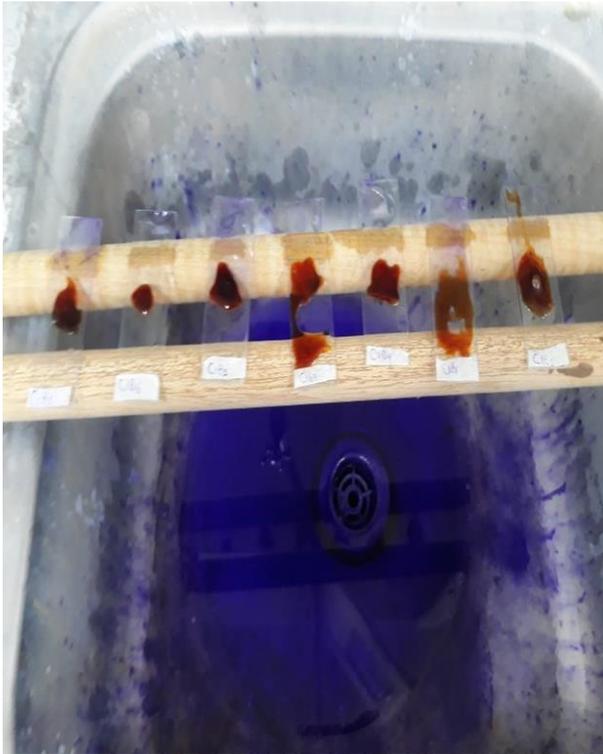
M) Conteo de colonia de bacterias



N) Contador de colonias de bacterias



Ñ) Purificación de bacterias del género bacillus



P) Aplicación de la técnica de tinción de Gram en bacterias del género bacillus



Q) Observación mediante el microscopio de las cepas del género bacillus para la definición de criterios de selección encontrados

T. GRAM	ENDOSPORAS	CEPARIO	CATALASA	CARACTERÍSTICAS
+	++	+		Bacillus en cadena con extremos redondeados y algunos cuadrados
+	+++	+		Bacillus en cadena con extremos redondeados y algunos cuadrados
+	+	+		Bacillus en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande
+/-	+++	+		Bacillus en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande
+	+++			Bacillus en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande
+	+	+		Bacillus en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano
-/+	-	+		Bacillus con extremos redondeados de tamaño mediano y cuadrado

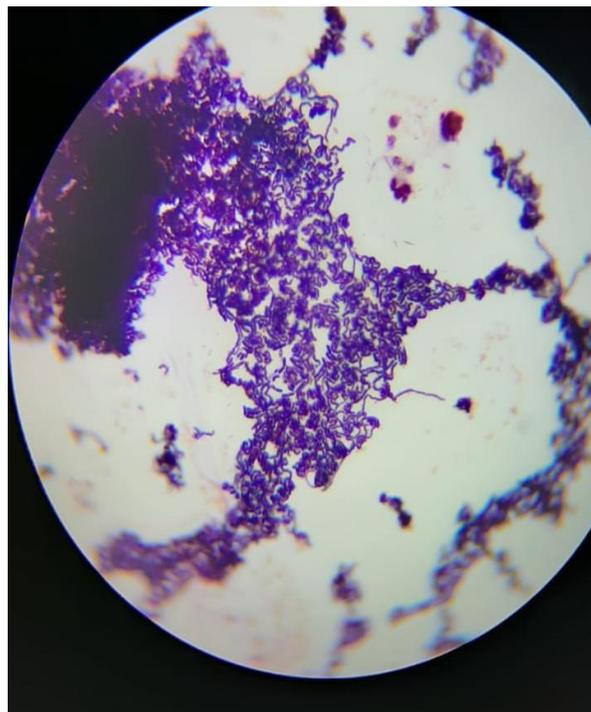
R) resultados de los criterios de selección del género bacillus



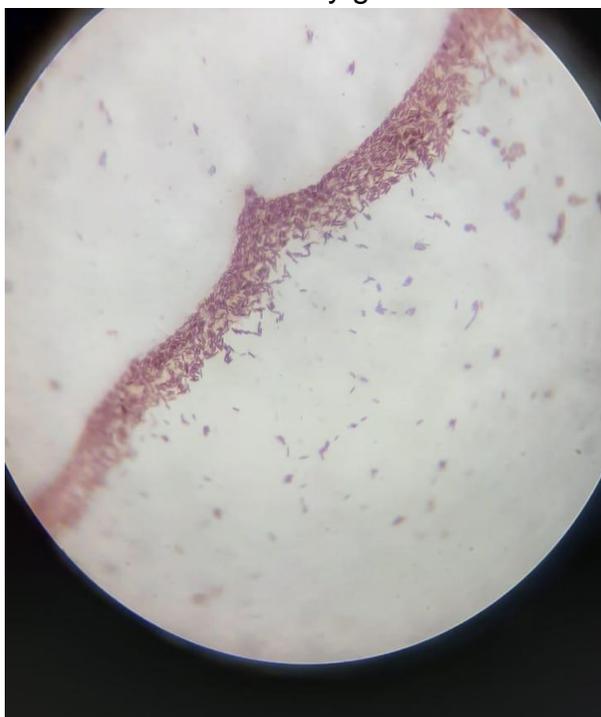
S) Bacillus en cadena con extremos redondeados y cuadrados



R) Bacillus en cadenas con extremos redondeados de tamaño mediano y grande



S) Bacillus cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano



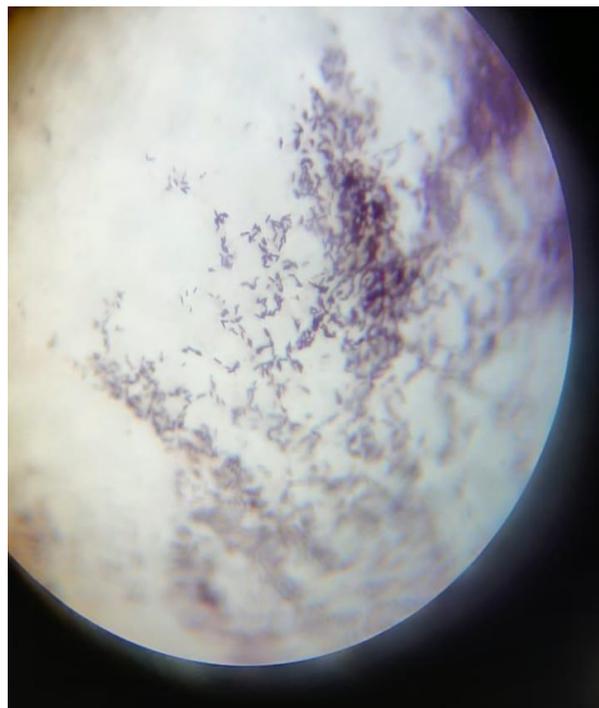
T) Bacillus con extremos redondeados de tamaño mediano



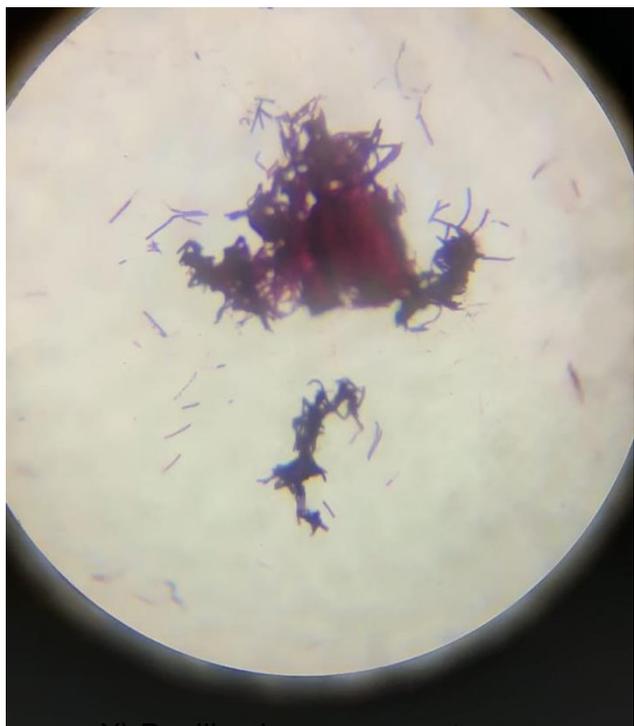
U) Bacillus con extremos redondeados de tamaño pequeño, grande y mediano



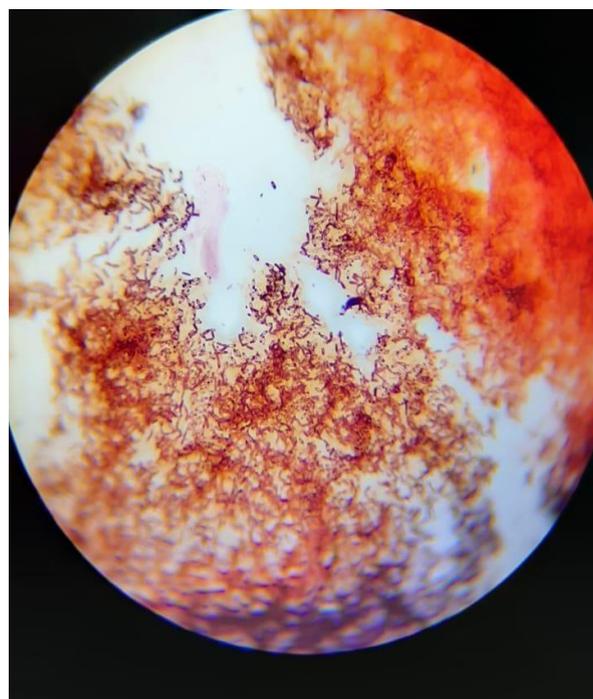
V) Bacillus largos en cadenas con extremos redondeados



W) Bacillus medianos con extremos redondeados



X) Bacillus largos con extremos redondeados.



Y) Bacillus medianos con extremos redondeados

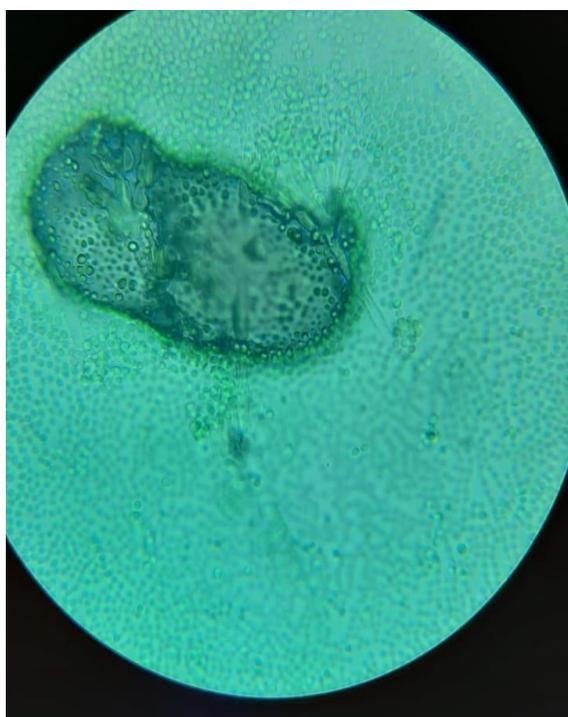
ANEXO 4
IDENTIFICACIÓN DE HONGOS



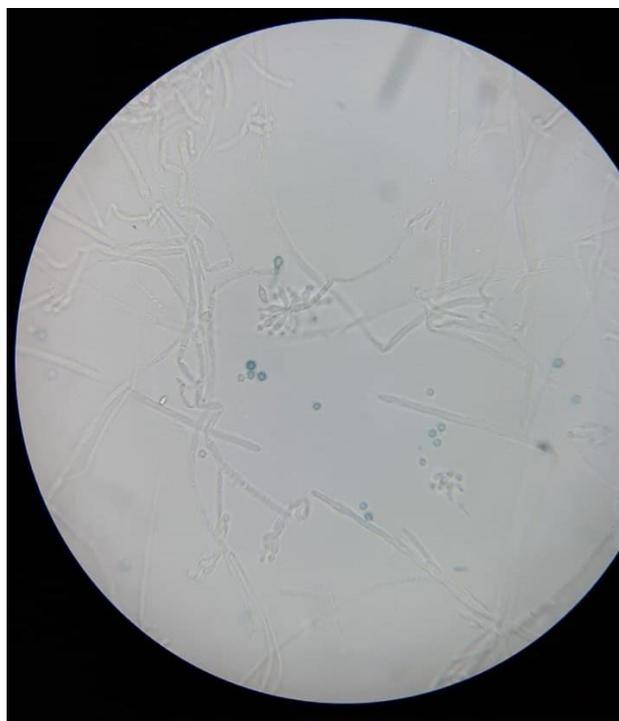
Z) Hongo Aspergillus



B 2) Hongo Cladosporium



A 2) Hongo Penicillium



C 2) Hongo Paecilomyces



.D 2) Hongo Trichoderma Harzianu

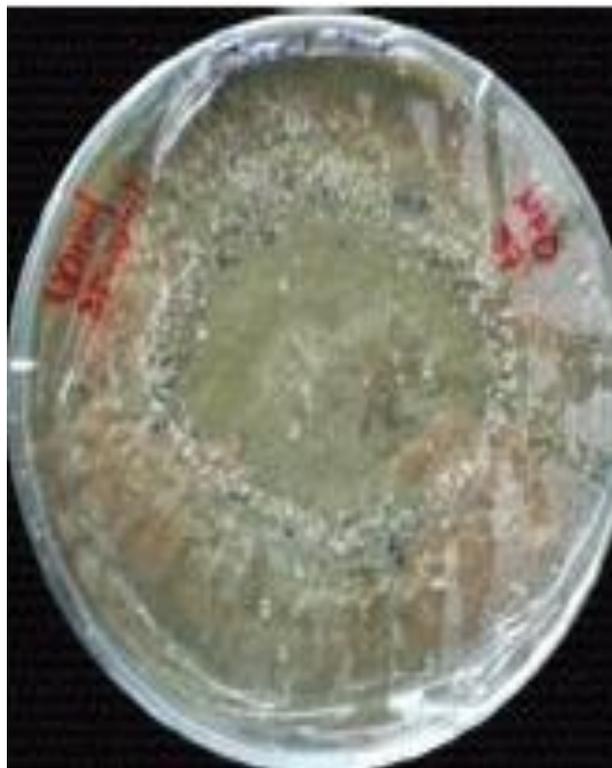
F



G 2) Hongo Bipolaris Tretamera



2) Hongo Beauveria



E 2) Hongo Fusarium Solani

ANEXO 5
IDENTIFICACIÓN DE FLORA



ANEXO 7

CÁLCULO DE RESULTADOS

Sistema de producción	Especie identificada	N de colonias	Representatividad de especies por sistema				Representatividad general de especies			
			N colonias de especie / N total de colonias del sistema		%		N colonias de especie * N total de colonias en tres sistemas		%	
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	6	6/19	0,32	0.32*100	31,58	6/60	0,10	0.10*100	10,00
	<i>Penicillium</i>	11	11/19	0,58	0.58*100	57,89	11/60	0,18	0.18*100	18,33
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2/19	0,11	0.11*100	10,53	2/60	0,03	0.03*100	3,33
	N total de colonias en sistema Monocultivo	19	0.25+0.64+0.11	1,00	31.58+57.89+10.53	100,00	0.10+0.18+0.03	0,32	10.00+18.33+3.33	31,67
Cacao con frutales	<i>Beauveria (hongo benéfico)</i>	1	1/30	0,03	0.03*100	3,33	1/60	0,02	0.02*100	1,67
	<i>Penicillium (hongo benéfico)</i>	18	18/30	0,60	0.60*100	60,00	18/60	0,30	0.30*100	30,00
	<i>Cladosporium</i>	7	7/30	0,23	0.23*100	23,33	7/60	0,12	0.12*100	11,67
	<i>Paecilomyces (hongo benéfico)</i>	4	4/30	0,13	0.13*100	13,33	4/60	0,07	0.07*100	6,67
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales	30	0.25+0.29+0.17+0.11+0.18	1,00	3.33+60.00+23.33+13.33	100,00	0.02+0.30+0.12+0.07	0,50	1.67+30.00+11.67+6.67	50,00
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	3	3/11	0,27	0.27*100	27,27	3/60	0,05	0.5*100	5,00
	<i>Cladosporium</i>	6	6/11	0,55	0.55*100	54,55	6/60	0,10	0.10*100	10,00
	<i>Paecilomyces (hongo benéfico)</i>	2	2/11	0,18	0.18*100	18,18	2/60	0,03	0.03*100	3,33
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables	11	0.08+0.45+0.17+0.30	1,00	27.27+54.55+18.18	100,00	0.05+0.10+0.03	0,18	5.00+10.00+3.33	18,33
N total de colonias en tres sistemas		60							31.67+50+18.33	100,0

7a) Cálculo de la representatividad de especies de hongos identificados durante la época seca.

Sistema de producción	Especie identificada	N de colonias	Representatividad de especies por sistema				Representatividad general de especies			
			N colonias de especie / N total de colonias del sistema		%		N colonias de especie / N total de colonias en tres sistemas		%	
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	9	9/36	0,25	0.25*100	25,00	9/117	0,08	0.076*100	7,69
	<i>Penicillium</i>	23	23/36	0,64	0.638*100	63,89	23/117	0,20	0.196*100	19,66
	<i>Fusarium solani</i>	4	4/36	0,11	0.111*100	11,11	4/117	0,03	0.034*100	3,42
	N total de colonias en sistema Monocultivo	36	0.25+0.64+0.11	1,00	25.00+63.89+11.11	100,00	0.08+0.20+0.03	0,31	0.307*100	30,77
Cacao con frutales	<i>Beauveria</i>	4	4/53	0,08	0.075*100	7,55	4/117	0,03	0.034*100	3,42
	<i>Penicillium</i>	24	24/53	0,45	0.452*100	45,28	24/117	0,21	0.205*100	20,51
	<i>Cladosporium</i>	9	9/53	0,17	0.169*100	16,98	9/117	0,08	0.076*100	7,69
	<i>Paecilomyces</i>	16	16/53	0,30	0.301*100	30,19	16/117	0,14	0.136*100	13,68
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables	53	0.08+0.45+0.17+0.30	1,00	7.55+45.28+16.98+30.19	100,00	0.03+0.21+0.08+0.14	0,45	0.452*100	45,30
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	7	7/28	0,25	0.25*100	25,00	7/117	0,06	0.059*100	5,98
	<i>Cladosporium</i>	8	8/28	0,29	0.285*100	28,57	8/117	0,07	0.068*100	6,84
	<i>Paecilomyces</i>	5	5/28	0,18	0.178*100	17,86	5/117	0,04	0.042*100	4,27
	<i>Fusarium solani</i>	3	3/28	0,11	0.107*100	10,71	3/117	0,03	0.025*100	2,56
	<i>Bipolaris tetramera</i>	5	5/28	0,18	0.178*100	17,86	5/117	0,04	0.0427*100	4,27
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales	28	0.25+0.29+0.17+0.11+0.18	1,00	25.00+28.57+17.86+10.71+17.86	100,00	0.06+0.07+0.04+0.03+0.04	0,24	0.239*100	23,93
N total de colonias en tres sistemas	117							30.77+45.30+23.93	100,0	

7b) Cálculo de la representatividad de especies de hongos identificados durante la época lluviosa.

Sistema de producción	Especie identificada	Tinción Gram	N de colonias	Representatividad general de especies			
				N colonias de especie / N total de colonias en tres sistemas		%	
Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	–					
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+					
	N total de colonias en sistema Monocultivo		1492	1492/5951	0,25	0.2507*100	25,07
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+					
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+					
	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+					
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables		1701	1701/5951	0,29	0.295*100	28,58
Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano	–					
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+					
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+					
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	–					
	<i>Bacillus</i> en cadenas con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+					
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales		2758	2758/5951	0,46	0.463*100	46,35
N total de colonias en tres sistemas			5951				100

7c) Cálculo de la representatividad de especies de bacterias identificadas durante la época seca.

Sistema de producción	Especie identificada	Tinción Gram	N de colonias	Representatividad general de especies			
				N colonias de especie / N total de colonias en tres sistemas		%	
Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	-					
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+					
	N total de colonias en sistema Monocultivo		1799	1799/7137	0,25	0.252 *100	25,21
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+					
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+					
	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+					
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	-					
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables		2477	2477/7137	0,35	0.347 *100	34,71
Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+					
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano	-					
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+					
	<i>Bacillus</i> largos en cadenas con extremos redondeados	-					
	<i>Bacillus</i> largos con extremos redondeados	+					
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+					
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales		2861	2861/7137	0,40	0.409 *100	40,09
N total de colonias en tres sistemas			7137				100

7d) Cálculo de la representatividad de especies de bacterias identificadas durante la época lluviosa

Sistema de producción	Especie identificada	#	%		DIVERSIDAD			
					ÍNDICE DE SHANNON		ÍNDICE SIMPSON	
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	6	6/19*100	31,58	$(6/19)*\ln(6/19)$	-0,36	$(6/19)^2$	0,10
	<i>Penicillium</i>	11	11/19*100	57,89	$(11/19)*\ln(11/19)$	-0,32	$(11/19)^2$	0,34
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2/19*100	10,53	$(2/19)*\ln(2/19)$	-0,24	$(2/19)^2$	0,01
	N total de colonias en sistema Monocultivo	19	31.58+57.89+10.53	100,00	$-1*(-0.92)$	0,92	$0.10+0.34+0.01$	0,45
Cacao con frutales	<i>Beauveria</i>	1	1/30*100	3,33	$(1/30)*\ln(1/30)$	-0,11	$(1/30)^2$	0,00
	<i>Penicillium</i>	18	18/30*100	60,00	$(18/30)*\ln(18/30)$	-0,31	$(18/30)^2$	0,36
	<i>Cladosporium</i>	7	7/30*100	23,33	$(7/30)*\ln(7/30)$	-0,34	$(7/30)^2$	0,05
	<i>Paecilomyces</i>	4	4/30*100	13,33	$(4/30)*\ln(4/30)$	-0,27	$(4/30)^2$	0,02
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables	30	3.33+60.00+23.33+13.33	100,0	$-1*(-0.1.03)$	1,03	$0.0+0.36+0.05+0.02$	0,43
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	3	3/11*100	27,27	$(3/11)*\ln(3/11)$	-0,35	$(3/11)^2$	0,07
	<i>Cladosporium</i>	6	6/11*100	54,55	$(6/11)*\ln(6/11)$	-0,33	$(6/11)^2$	0,30
	<i>Paecilomyces</i>	2	2/11*100	18,18	$(2/11)*\ln(2/11)$	-0,31	$(2/11)^2$	0,03
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales	11	27.27+54.55+18.18	100,00	$-1*(-0.99)$	0,99	$0.07+0.30+0.03$	0,40
N total de colonias en tres sistemas		60						

7e) Cálculo de diversidad de hongos durante la época seca.

Sistema de producción	Especie identificada	#	%		DIVERSIDAD			
					ÍNDICE DE SHANNON		ÍNDICE SIMPSON	
Monocultivo	<i>Cladosporium</i>	9	9/36*100	25,00	$(9/36)*LN(9/36)$	-0,35	$(9/36)^2$	0,06
	<i>Penicillium</i>	23	23/36*100	63,89	$(23/36)*LN(23/36)$	-0,29	$(23/36)^2$	0,41
	<i>Fusarium solani</i>	4	4/36*100	11,11	$(4/36)*LN(4/36)$	-0,24	$(4/36)^2$	0,01
	N total de colonias en sistema Monocultivo	36	25.00+63.89+11.11	100,00	$-1*(-0.88)$	0,88	$0.06+0.41+0.01$	0,48
Cacao con frutales	<i>Beauveria</i>	4	4/53*100	7,55	$(4/53)*LN(4/53)$	-0,20	$(4/53)^2$	0,01
	<i>Penicillium</i>	24	24/53*100	45,28	$(24/53)*LN(24/53)$	-0,36	$(24/53)^2$	0,21
	<i>Cladosporium</i>	9	9/53*100	16,98	$(9/53)*LN(9/53)$	-0,30	$(9/53)^2$	0,03
	<i>Paecilomyces</i>	16	16/53*100	30,19	$(16/53)*LN(16/53)$	-0,36	$(16/53)^2$	0,09
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables	53	7.55+45.28+16.98+30.19	100,0	$-1*(-0.103)$	1,22	$0.01+0.21+0.03+0.09$	0,33
Cacao con maderables	<i>Aspergillus</i>	7	7/28*100	25,00	$(7/28)*LN(7/28)$	-0,35	$(7/28)^2$	0,06
	<i>Cladosporium</i>	8	8/28*100	28,57	$(8/28)*LN(8/28)$	-0,36	$(8/28)^2$	0,08
	<i>Paecilomyces</i>	5	5/28*100	17,86	$(5/28)*LN(5/28)$	-0,31	$(5/28)^2$	0,03
	<i>Fusarium solani</i>	3	3/28*100	10,71	$(3/28)*LN(3/28)$	-0,24	$(3/28)^2$	0,01
	<i>Bipolaris tetramera</i>	5	5/28*100	17,86	$(5/28)*LN(5/28)$	-0,31	$(5/28)^2$	0,03
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales	28	25.00+28.57+17.86+10.71+17.86	100,00	$-1*(-0.99)$	1,01	$0.06+0.08+0.03+0.01+0.03$	0,22
N total de colonias en tres sistemas		117						

7f) Cálculo de diversidad de hongos durante la época lluviosa.

Sistema de producción	Especie identificada	Tinción Gram	N de colonias	%		DIVERSIDAD			
						ÍNDICE DE SHANNON		ÍNDICE SIMPSON	
Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	-							
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+							
	N total de colonias en sistema Monocultivo			1492	1492/1492*100	100,00	$(1492/1492)*LN(1492/1492)$	0,00	$(1492/1492)^2$
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+							
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+							
	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+							
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables			1701	1701/1701*100	100,00	$(1701/1701)*LN(1701/1701)$	0,00	$(1701/1701)^2$
Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano	-							
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+							
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+							
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	-							
	<i>Bacillus</i> en cadenas con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+							
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales			2758	2758/2758*100	100,00	$(2758/2758)*LN(2758/2758)$	0,00	$(2758/2758)^2$
N total de colonias en tres sistemas			5951						

7g) Cálculo de diversidad de bacterias durante la época seca

Sistema de producción	Especie identificada	Tinción Gram	N de colonias	%		DIVERSIDAD			
						ÍNDICE DE SHANNON		ÍNDICE SIMPSON	
Monocultivo	<i>Bacillus</i> medianos con extremos redondeados	-							
	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+							
	N total de colonias en sistema Monocultivo			1799	$1799/17992*100$	100,00	$(1799/1799)*LN(1799/1799)$	0,00	$(1799/1799)^2$
Cacao con frutales	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+							
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+							
	<i>Bacillus</i> cuadrados con extremos redondeados de tamaño mediano	+							
	<i>Bacillus</i> largos en cadena con extremos redondeados	-							
	N total de colonias en sistema Cacao con maderables			2477	$2477/2477*100$	100,00	$(2477/2477)*LN(2477/2477)$	0,00	$(2477/2477)^2$
Cacao con maderables	<i>Bacillus</i> pequeños y medianos con extremos redondeados	+							
	<i>Bacillus</i> con extremos redondeados de tamaño mediano	-							
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados y cuadrados	+							
	<i>Bacillus</i> largos en cadenas con extremos redondeados	-							
	<i>Bacillus</i> largos con extremos redondeados	+							
	<i>Bacillus</i> en cadena con extremos redondeados de tamaño mediano y grande	+							
	N total de colonias en sistema Cacao con frutales			2861	$2861/2861*100$	100,00	$(2861/2861)*LN(2861/2861)$	0,00	$(2861/2861)^2$
N total de colonias en tres sistemas			7137						

7h) Cálculo de diversidad de bacterias durante la época