



Identificación y cuantificación de dípteros (*Ceratopogonidae*) polinizadores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Granja Luker (Palestina, Caldas) a través de la utilización de materia orgánica en descomposición

Carolina Gómez Carmona

**Trabajo de grado para optar por el título de
BIÓLOGA**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de biología
Bogotá D.C. 2018**

Identificación y cuantificación de dípteros (*Ceratopogonidae*) polinizadores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Granja Luker (Palestina, Caldas) a través de la utilización de materia orgánica en descomposición

Carolina Gómez Carmona

Aprobado

Concepción Judith Puerta Bula PhD

Decana facultad de ciencias

Jorge Hernán Jácome Reyes PhD

Director carrera de Biología

Identificación y cuantificación de dípteros (*Ceratopogonidae*) polinizadores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Granja Luker (Palestina, Caldas) a través de la utilización de materia orgánica en descomposición

Carolina Gómez Carmona

Aprobado

Igor Dimitri Forero PhD.

Director

Giovanny Fagua González PhD.

Codirector

Dumar Ariel Parrales-R Biol. Cand MsC.

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23, Resolución N° 13 de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Tabla de contenido

1. Introducción	6
2. Justificación y planteamiento del problema	9
3. Marco teórico:	11
3.1 Orden Diptera	11
3.1.1 Familia Ceratopogonidae	12
3.2 Cacao	13
3.3 Polinización del cacao	16
4. Objetivos:	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	17
5. Metodología	17
5.1 Área de estudio	17
5.2 Árboles utilizados	19
5.3 Tratamientos utilizados	20
5.5 Trampas utilizadas para el muestreo	21
5.6. Análisis estadístico	21
6. Resultados	23
7. Discusión:	28
8. Conclusiones	35
9. Recomendaciones	35
10. Agradecimientos	36
11. Bibliografía	36

Identificación y cuantificación de dípteros (*Ceratopogonidae*) polinizadores de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Granja Luker (Palestina, Caldas) a través de la utilización de materia orgánica en descomposición.

Resumen:

El cacao, fruto del árbol *Theobroma cacao*, representa un sustento para muchas familias en Colombia. Para su obtención es necesaria la polinización ya sea manual o entomófila. Esta última es realizada por dípteros perteneciente a la familia Ceratopogonidae, géneros *Forcipomyia*, *Dashyelea* y *Atrichopogon*, siendo *Forcipomyia* el más efectivo. No obstante, la abundancia de ceratopogónidos es baja en muchos cultivos pues se remueve la hojarasca (su hábitat) y la ausencia de polinizadores suele ser un factor limitante en la producción. En Colombia la información en esta área del conocimiento es muy reducida y poco reciente. En este sentido lo que se busca es evaluar la abundancia de ceratopogónidos en cuatro tratamientos: control, pseudotallos de banano, estiércol de equino y por último estiércol de equino y pseudotallos de banano, con el fin de determinar cual de estos alberga la mayor cantidad de ceratopogónidos.

Forcipomyia fue el género más abundante en el presente estudio, asimismo, se encontraron los otros dos géneros polinizadores, en menor cantidad. Se realizó un MLG para determinar si los diferentes tratamientos y SAF en los que se trabajó, se relacionan estadísticamente con el número de individuos encontrado. Se encontró mayor abundancia en el tratamiento con pseudotallos de banano, seguido del tratamiento control, posteriormente el tratamiento con estiércol y pseudotallos de banano y, por último, el tratamiento con estiércol. Adicionalmente en el SAF 12, se encontró mayor abundancia de Ceratopogonidae lo cual puede ser explicado por el sombrero en este lote. Gracias a este estudio se puede reconocer que utilizando el banano se puede aumentar el número de Ceratopogonidae en una plantación comercial de cacao en Colombia y se puede recomendar el uso de éste en otros cultivos. Sin embargo, es importante realizar un estudio de eficacia de polinización para determinar si el género más abundante en este caso es el polinizador efectivo.

1. Introducción

Las moscas son insectos que pertenecen al orden Diptera, uno de los más abundantes con 154.157 especies conocidas (Roskov et al., 2017). De hecho, el número de especies conocidas aumenta un 1% por ciento por año (Brown, 2009). Los dípteros están presentes en casi todos

los ambientes del planeta incluyendo todos los continentes, algunas especies incluso, viven en la antártica (Pape, Bickel y Meier, 2009). Sin embargo, son más abundantes en el neotrópico, la región tropical del continente americano (Borkent et al., 2018). En esta región hay 31,000 especies registradas, lo que corresponde a una quinta parte de la diversidad mundial del orden Diptera (Pape et al., 2009), siendo la fauna más diversa y menos conocida de todas las regiones. Algunos dípteros matan millones de personas alrededor del mundo por su transmisión de enfermedades, pero la gran mayoría, son benéficas para el ser humano y la naturaleza debido a que cumplen funciones como control biológico de insectos plaga, aprovechamiento de los desechos como estiércol, carroña o materia orgánica y contribuyen a la polinización (Marshall, 2012).

Familias como Simuliidae y Culicidae son las más conocidas y estudiadas debido a que algunas especies son transmisoras de enfermedades tales como la fiebre amarilla y la malaria (Pape et al., 2009). A pesar de que familias como Ceratopogonidae son muy comunes en la región Neotropical aún se desconocen varios aspectos de su biología básica y taxonomía (Marshall, 2012). Los Ceratopogonidae están estrechamente relacionados con los humanos, debido a que algunos de ellos son vectores de enfermedades; no obstante, la picadura de un *Culicoides* puede generar piquiña e hinchazón (Maes y Wirth, 1990). Asimismo, son portadoras de virus y nematodos que pueden transmitir a los vertebrados de los que se alimentan tales como ovejas, caballos, vacas, aves de corral e incluso, humanos. Entre las múltiples enfermedades que pueden transmitir, la más importante es la lengua azul en bovinos (Marshall, 2012). En contraste con lo anterior, los ceratopogónidos desempeñan una función que es crucial para la agricultura: la polinización de árboles de cacao, descrita por primera vez por Billes (1941).

La polinización ocurre cuando los granos de polen con los gametos masculinos son transferidos desde las anteras de una flor hasta el estigma de otra (o la misma). Esta transferencia permite la fertilización de los óvulos y la reproducción sexual en plantas (Raskin y Vuturro, 2012), un prerequisite para la fertilización y el desarrollo de las semillas. El polen puede ser transportado por diferentes vectores tales como el viento, el agua y algunos animales (Córdoba, 2011), siendo los más comunes insectos, aves, murciélagos y pequeños vertebrados. En retorno a la transferencia de polen, las plantas les ofrecen a visitantes y polinizadores: comida en forma de néctar y polen rico en azúcares, proteínas y otros elementos esenciales (Raskin y Vuturro, 2012). En el caso específico de las moscas, los adultos visitan las flores en busca de comida u otros beneficios como un lugar de apareamiento, abrigo, calor, presas o sitios para la

oviposición y en este proceso, a su cuerpo cubierto de pelos, se adhieren granos de polen que llevarán a otra flor (Marshall, 2012).

El cacao es el fruto del árbol *Theobroma cacao* L. 1753 y su polinización es estrictamente realizada por un insecto (entomófila), en este caso, por dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae (Glendinning, 1972). Los géneros más importantes son *Forcipomyia* spp., *Dasyhelea* spp. y *Atrichopogon* spp; siendo *Forcipomyia* el más efectivo (Glendinning, 1972; Bravo, Somarriba y Arteaga, 2010; Córdoba, Cerda, Deheuvels, Hidalgo y Declerck, 2013; Mavisoy, Cabezas, Ballesteros y Somarriba, 2013; Martínez, Narváez y Spinelli, 2000). Las anteras de la flor de *T. cacao* están protegidas por los pétalos de tal forma que solamente un organismo de un tamaño menor a 4 mm pueda pasar por el espacio donde está el polen. Las especies menores a 2 mm no son polinizadoras efectivas, pues su cuerpo no queda impregnado de polen ya que no tocan el estilo cuando pasan por el estaminodio (Somarriba et al., 2010; Córdoba, 2011). Adicionalmente, muchas variedades de cacao son auto incompatibles lo cual hace necesario la presencia de un vector, como los dípteros para poder hacer exitosa la transferencia de polen (Toledo-Hernández, Wanger, Tschardtke 2017).

. La polinización natural en varios casos no es efectiva y en algunos cultivos comerciales la polinización se realiza a mano para mejorar la productividad y garantizar el éxito del intercambio genético. Es un esfuerzo extra, pero en algunos casos, necesario, debido a que se desconoce la abundancia o incluso la presencia de los insectos que realizan la polinización. A causa de esto, el agricultor no puede garantizar que las flores vayan a ser polinizadas.

Entender la relación entre la planta y el polinizador es necesario para manejar apropiadamente los sistemas agroforestales (SAF) teniendo en cuenta la taxonomía y la ecología de los polinizadores más comunes (Córdoba, 2011). La interacción polinizador-planta es clave para la diversidad, la agrobiodiversidad y para lograr entender dinámicas poblacionales (Szymank, Kearns, Pape y Thomposon, 2008). Adicionalmente, estudios que profundicen en el mecanismo de polinización, son cruciales para entender el ciclo de vida, la taxonomía y el comportamiento de estos dípteros ceratopogónidos, pues su biología es poco conocida debido a su pequeño tamaño y su cuerpo blando (Marshall, 2012). Alrededor del mundo se han realizado diversos estudios para entender esta relación dinámica, pero muy pocos han sido realizados en Colombia y ninguno de estos es reciente (Soria y Wirth, 1979; De la Cruz y Soria 1973; de Jesús Soria, 1971; Figueroa y de la Cruz, 1984). Colombia es un país donde hay sembradas casi 147.000 hectáreas desde el nivel del mar hasta los 1200 metros con un rendimiento promedio de unos

400 kg/ha/año (Perea, Martínez, Aranzazu y Cadena, 2013). Adicionalmente el país es gran exportador de su cacao, un producto muy apetecido en el mercado internacional por su calidad.

Un primer paso para mejorar la polinización es definir un tipo de sustrato que resulte ser eficiente para atraer y permitir el establecimiento y desarrollo de ceratopogónidos. Pues cualquier progreso en los servicios de polinización puede resultar en una mejora del rendimiento de cacao (Groeneveld, Tschardtke, Moser, Clough, 2010). Para lograr lo anterior se fabricaron 40 trampas tipo Malaise para la captura y posterior identificación de dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae presentes en hojarasca bajo árboles de cacao. Adicionalmente, bajo los árboles se utilizó materia orgánica en descomposición, proveniente de plantas de banano y estiércol de equinos. Todo lo anterior con el fin de determinar si los sustratos funcionan como atrayente para los dípteros y verificar su efectividad como sustrato para ovoposición crecimiento y desarrollo de Ceratopogonidae.

2. Justificación y planteamiento del problema

En Colombia, el cultivo de cacao constituye una de las principales actividades agrícolas para cerca de 38.000 familias campesinas. La producción actual nacional es aproximadamente de 60.000 toneladas por año. En el 2016 se reportaron 56,785 toneladas de producción de cacao en grano y en el 2017 se alcanzó un récord con 60.535 toneladas (Federación nacional de cacao [FEDECACAO], 2018). La productividad por hectárea en los cultivos colombianos no tecnificados comparados con la de otros países es muy baja, donde se reportan entre 300 y 400 kilos por hectárea. Por otro lado, en otros países como México el promedio nacional es 499 kg/ha, en Tailandia el promedio es 1.090 kg/ha y en Indonesia 813 kg/ha (Espinosa-García et al., 2015).

La polinización del cacao es realizada por dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae. Sin embargo, el porcentaje de flores polinizadas por árbol es muy bajo. Se poliniza solamente del 5 al 10% del total de flores producidas por el árbol y éste puede producir entre 6.000 y 10.000 flores por año (Somarriba et al., 2010; Orozco-Aguilar y López, 2017). Lo anterior genera una gran limitante para la producción de cacao en todos los países productores en África y Suramérica (Winder, 1978).

El bajo porcentaje de polinización en estos cultivos se debe a que (1) las flores son de unos 2 centímetros, (2) las anteras de los estambres se encuentran ocultas bajo los pétalos, (3) las flores no se pueden autopolinizar, (4) las flores solo están abiertas en horas de la mañana y si no son polinizadas, se caen (5) los granos de polen sólo son viables 3 días (6) algunas variedades de cacao son auto incompatibles (Córdoba, 2011; Somarriba et al., 2010; Mavisoy et al., 2013; Orozco- Aguilar y López, 2017).

Debido a que el porcentaje de polinización es bajo, pues solo se polinizan entre el 5 y 10% de flores producidas por el árbol, para garantizar el éxito de la entrada de polen al estigma de la flor, se realiza polinización manual. Este es un proceso dispendioso ya que, para utilizar el polen en cada estambre, hay que remover los pétalos y los sépalos de la flor. Posteriormente, el polen puede ser utilizado en el estigma de 2 flores diferentes, después se debe tomar el siguiente estambre y utilizarlo en otras 2 flores que se quieran polinizar y así sucesivamente. El proceso demora aproximadamente 50 segundos por cada flor (un agricultor muy experimentado puede tomar la mitad de este tiempo), mientras que los ceratopogónidos polinizadores pueden visitar entre 300 y 7000 flores en un día (Winder, 1978) cargando en su cuerpo más de 40 granos de polen, número necesario para la exitosa fecundación.

En los cultivos en Ecuador, Costa Rica, Brasil, entre otros, donde no se realiza polinización manual, la hojarasca que cae de los árboles de cacao no se remueve del suelo y ésta es utilizada por los dípteros para la oviposición y cría. Según Córdoba (2011) existe una relación positiva, entre la abundancia de ceratopogónidos y la productividad por hectárea en los sitios donde éstos se encuentran. Es decir, en los sitios donde hay mayor cantidad de dípteros polinizadores, se encuentran los árboles con mayor cantidad de frutos cosechados (Córdoba, 2011). Sin embargo, la abundancia de estos insectos en plantaciones de cacao es muy baja pues con el fin de evitar cultivos de plagas y hongos, se retira la hojarasca y cáscaras de mazorcas de cacao en el suelo, necesarios para la supervivencia y cría de polinizadores (Young, 1982). Por tal razón, reconocer sustratos atrayentes y hábitats óptimos es clave para aumentar la productividad por hectárea a un bajo costo, tomando en cuenta a los polinizadores y no plagas. Sin embargo, ha estado y continúa el interrogante si estos ceratopogónidos son los únicos polinizadores del cacao.

En la mayoría de los estudios consultados, los experimentos se realizaban removiendo la hojarasca del sitio, esta se ubicaba en trampas de emergencia en el laboratorio para incubarla

en temperaturas óptimas, realizando posteriormente el conteo de adultos, aunque el método utilizado es adecuado, los resultados son irreales y no corresponden a lo que se encontraría en la naturaleza por ende no sería posible garantizar que los resultados obtenidos reflejen la realidad. En dichos experimentos se controla la humedad, se remueven depredadores y se ofrece todas las condiciones adecuadas de luz, humedad, agua, etc., mientras que, en el hábitat natural, las variables como el sol, la lluvia y la humedad fluctúan.

En la Granja Luker, el área de estudio de la presente investigación, se educan y capacitan agricultores, y además del cacao se siembran plátano, árboles frutales y maderables. En diversos estudios (Adjaloo, Banful y Oduro, 2013; Bravo et al., 2011 Ramos, 2011; Córdoba, 2011; Young, 1982; Mavisoy et al., 2013), se ha hecho el esfuerzo de comparar poblaciones de ceratopogónidos en diferentes ambientes con biomasa proveniente de árboles frutales y maderables. En todas las ocasiones el banano ha sido el mejor sustrato para retener humedad. Adicionalmente en un estudio realizado en Ghana por Kaufmann (1974) se utilizó estiércol de oveja y cabra como atrayente para los dípteros polinizadores, dando resultados positivos y prometedores (Kaufmann, 1974). Por lo anterior, se decidió utilizar en el presente estudio pseudotallos de plantas de banano y estiércol de herbívoros para ser probados como hábitats adecuados para el establecimiento, crecimiento y desarrollo de dípteros de la familia Ceratopogonidae siendo una aproximación al estudio comparativo en esta área de estudio en Colombia.

3. Marco teórico:

3.1 Orden Diptera

Los insectos pertenecientes al orden Diptera tienen un par de alas anteriores soportadas por el mesotórax, y las alas posteriores modificadas en halterios los cuales les ayudan a mantener estabilidad en el vuelo (Brown, 2009; Marshall, 2012). El orden está dividido en dos subórdenes: Brachycera y Nematocera. Brachycera es un grupo natural o monofilético, definido por unas características que se originaron en un ancestro común no compartidas con otros grupos. Por otro lado, Nematocera es un grupo parafilético, un ensamblaje artificial. Por esta razón, esta clasificación no es usada en los últimos años (Marshall, 2012) y se utilizan otros nombres para referirse a este suborden.

Los dípteros tienen metamorfosis completa y cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. La larva es el estadio principal de alimentación, el más largo del ciclo de vida y es usado para caracterizar los linajes de acuerdo con su biología -acuáticos, terrestres, saprófagos, fitófagos, predatoras, parasíticas etc.; (Marshall, 2012). Como son holometábolos requieren de dos mudas, la primera es la muda larva-pupa para evertir las alas durante el estadio larval y la segunda pupa-adulto, permite la transformación de una pupa con alas no desarrolladas a un adulto desarrollado (Marshall, 2012).

3.1.1 Familia Ceratopogonidae

Hasta la fecha existen 1095 especies de la familia Ceratopogonidae reportados en la región Neotropical (Borkent y Spinelli, 2007). Dípteros de esta familia están presente en casi todas las latitudes y en los ambientes donde haya un poco de humedad. Son de tamaño pequeño, aproximadamente 1 a 4 milímetros (Borkent, Spinelli y Grogan, 2009). Las larvas son depredadoras, detritívoras se alimentan de bacterias, hongos y microorganismos presentes en los sustratos en descomposición (Soria, Wirth y Besemer, 1978), viven en ambientes acuáticos y semiacuáticos. Por otro lado, los adultos son herbívoros, succionan néctar de flores, hemolinfa de invertebrados de mayor tamaño o sangre de vertebrados (Ronderos et al., 2011). Con relación a lo anterior, algunas hembras de los géneros *Leptoconops*, *Culicoides* y *Forcipomyia* (Subgénero *Lasiohelea*) son hematófagas de vertebrados y necesitan la sangre para el desarrollo de sus huevos (Borkent y Spinelli, 2007). Los ceratopogónidos y nematóceros en general, se alimentan de fluidos, de néctar o de los desechos de los insectos chupadores de plantas (Marshall 2012). Dentro de la familia hay 4 subfamilias: Leptoconopinae, Dasyheleinae, Forcipomyiinae y Ceratopogonininae (Borkent y Spinelli, 2007).

Se cree que los Ceratopogonidae son más abundantes en la temporada de lluvia (Kaufmann, 1975; Narváez y Marín, 1996) pero se desconoce cómo se desarrollan en temporada seca (Borkent y Spinelli, 2007). En total hoy en día se reconocen 5.639 especies (Roskov, et al., 2017) distribuidas en todas las regiones del mundo. En la Afrotropical hay 916 registradas, en la Neártica 614, en la Oriental 876, en la Paleártica 1537, en Australasia 839 (Pape et al., 2009) y por último en la Neotropical hay 1095 especies registradas (Borkent y Spinelli, 2007).

Las características principales de los ceratopogónidos son no tener ocelos; antenas largas generalmente con 13 flagelomeros; casi todos los machos tienen antenas plumosas y las hembras tienen partes bucales prominentes para morder; las venas radiales 1-2 de las alas llegan hasta el margen anterior y usualmente hay una ramificación que llega hasta el margen del ala. Las alas se superponen una sobre la otra cuando están descansando (Borkent et al., 2009; Borkent y Spinelli, 2007).

El huevo dura de 3 a 4 días, la larva de 10 a 17 días, la pupa de 3 a 4 días y el adulto de 12 a 16 (Córdoba, 2011; Borkent y Spinelli, 2007). Es decir, el tiempo de vuelo disponible de un adulto para polinizar son solamente 10 días. Las flores pentámeras contienen un ovario que tiene 40 óvulos y éstas puedan tener 4 o 3 moscas dentro de ellas, lo cual garantiza el intercambio genético y la exitosa polinización de los múltiples óvulos (Córdoba, 2011; Córdoba et al., 2013; Bravo et al., 2011).

Forcipomyia, el género polinizador más efectivo dentro de la familia Ceratopogonidae, y otras especies dentro de esta familia, se reproducen y completan su ciclo de vida en materia en descomposición; por tal razón la disponibilidad de materia en descomposición, en un cultivo de cacao, debe ser alta; para así ofrecer un sustrato para el desarrollo a la población de dípteros polinizadores (Kaufmann, 1975; Young, 1982; Soria et al., 1978).

3.2 Cacao

El cacao (*T. cacao*) es un árbol frutal perteneciente a la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae (antes Sterculiaceae; Dostert et al., 2012), originario de la selva húmeda tropical de Suramérica y tiene como centro de origen las laderas bajas del este ecuatorial de los Andes entre Perú, Ecuador, Colombia y afluentes el río Napo, Putumayo y Caquetá (Perea et al., 2013; Dostert et al., 2012). Los indígenas de la región lo usaban como bebida y moneda de uso exclusivo de la nobleza del imperio azteca (Caffrey, 2017; Perea et al., 2013). Como las demás especies pertenecientes al género *Theobroma*, *T. cacao* tiene hojas simples casi siempre asimétricas alternas y glabras, un fruto indehiscente carnoso conocido comúnmente como mazorca (Dostert et al., 2012).

Es un cultivo que requiere una temperatura entre 22 y 30 grados centígrados, alta precipitación (2.500 mm al año), humedad cercana al 80%, calor durante todo el año, sombra y protección

contra el viento (Suárez, Moreira y Vera, 1994; CONABIO, 2008) por esta razón generalmente se asocia en sistemas agroforestales (SAF) con árboles maderables o frutales que le ofrecen la protección necesaria. Adicionalmente ofrecen un beneficio económico al agricultor para obtener un ingreso mientras puede obtener frutos del cacao.

La flor de *T. cacao* (Fig. 1) varía de un color crema a rosado, dependiendo de la variedad. Son producidas durante todo el año, incluso, en un mismo árbol se pueden encontrar frutos en crecimiento y flores al mismo tiempo (Suárez et al., 1994). A pesar de ser hermafrodita, hay algunas variedades de cacao que son auto incompatibles, incapaces de polinizarse ellas mismas; por ende, necesitan de algún agente externo para su polinización. El tamaño de las flores varía de 1 a 3 centímetros y crecen sobre el tronco del árbol (Fig. 2). La fórmula floral es: S5, P5, E5 + 5 + G (Suárez et al., 1994; CONABIO, 2008).

En las plantaciones comerciales los árboles empiezan a producir flores después de los 12-14 meses de ser plantados. El árbol produce entre 6.000 y 10.000 flores por cosecha, solamente el 10% aproximadamente, son polinizadas y las que no son fecundadas o sufren de incompatibilidad genética caen después de 24-36 horas de su apertura pues son abortadas como mecanismo natural de la planta (Somarriba et al., 2010; Orozco-Aguilar y López, 2017; Córdoba, 2011). Del total de flores polinizadas menos del 5% se desarrollan a frutos maduros (Groeneveld et al., 2010).

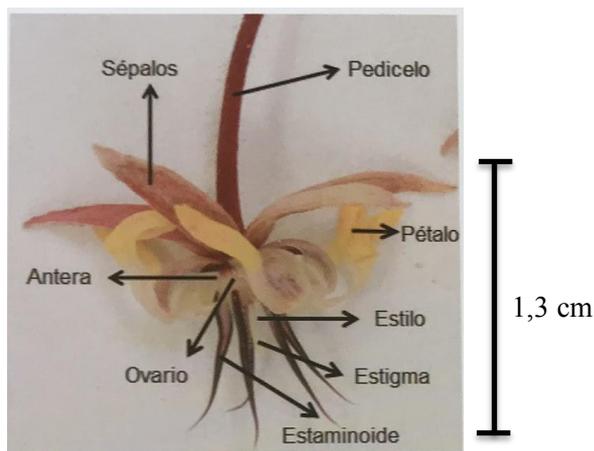


Figura 1. Estructura de la flor de *T. cacao*. Imagen tomada de Perea et al. (2013).

La flor polinizada, después de unos 6 meses, va a dar origen a una drupa grande generalmente ovalada, llamada comúnmente mazorca (Córdoba, 2011). Dentro del fruto se encuentran las semillas que son la materia prima de la industria del chocolate, cosmética, repostería entre

otros, pues de estas se obtienen el chocolate y todos los derivados del cacao como manteca y polvo de cacao (Caffrey, 2017).



Figura 2. Detalle de flores y frutos creciendo simultáneamente sobre ramas del árbol.

En el mundo existen 3 grandes grupos comerciales y genéticos de cacao: criollo, forastero y trinitario (Caffrey, 2017; Dostert et al., 2012). El grupo criollo es escaso y propenso a enfermedades, su fruto es rugoso y puntiagudo y de sus semillas se obtiene cacao de alta calidad (Casa Luker, 2017). El forastero es el más común y producido en el mundo; tiene un perfil típico de sabor fuerte a chocolate, su fruto es liso y amelonado, es producido principalmente en Brasil, África y Asia y es resistente a plagas y enfermedades (Casa Luker, 2017). Por último, el grupo trinitario es un híbrido entre criollo y forastero (Dostert et al., 2012) tiene un amplio rango de sabores aromáticos y menor sabor a chocolate, es producido principalmente en Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador (Casa Luker, 2017).

En el presente estudio se utilizaron 3 clones Luker40, FSV41 y TCS01. Luker 40 es un clon desarrollado por Casa Luker en la Granja Luker, pertenece al grupo genético trinitario y es auto compatible, es decir, las flores de un mismo árbol pueden ser polinizadas por material genético proveniente de otra flor en el mismo árbol, pero los ovarios no pueden ser fecundados por polen de la misma flor.

FSV41 es un árbol seleccionado por la federación colombiana de cacaoteros por ser resistente a la monilia y por su calidad. Es un híbrido auto compatible perteneciente al grupo genético

trinitario y tiene un rendimiento de 1.993 kg/ha/año. Cuando es inmaduro es rojo intenso mientras que en su estado de madurez es rojo naranja, muy rugoso. La F en su nombre proviene de Fedecacao y la SV se le da por su origen de San Vicente de Chucurí en Santander, Colombia (Perea et al., 2013).

TCS01, *Theobroma* corpoica La suiza, es un clon desarrollado por Corpoica, es auto compatible, su rendimiento es muy alto pues contiene 38 semillas por mazorca y se necesitan 9 para obtener un kilo de cacao. También pertenece al grupo genético trinitario (ICA, 2014).

3.3 Polinización del cacao

La reproducción sexual en las plantas es un proceso que inicia con la transferencia de polen proveniente del estigma (parte masculina) hacia el gineceo, la parte femenina (Abrol, 2012). Este proceso permite la fertilización de los óvulos y posteriormente la formación de las semillas (Raskin y Vuturro, 2012). Es decir, primero ocurre la polinización, posteriormente la fertilización de los gametos femeninos por los masculinos y por último maduración de semillas (Kearns y Inouye, 1993). Vectores abióticos como el agua y viento o bióticos como vertebrados e invertebrado, facilitan el proceso de polinización. En muchos casos la variabilidad genética de las plantas depende del fenómeno de polinización cruzada donde los vectores entran a jugar un rol clave; como es el caso del cacao. En *T. cacao* hay muchas variedades autoincompatibilidad e incluso, incompatibilidad entre variedades. Billes (1941) fue el primero en mencionar que la polinización de *T. cacao* era realizada por Ceratopogonidae. Desde ese momento su presencia y eficacia como polinizador se ha confirmado en África (Kaufmann, 1974; Winder 1978), Costa Rica (Young, 1982, 1986; Bravo et al., 2011), Panamá (Córdoba, 2011; Córdoba et al., 2013), Venezuela (Narváez y Marín, 1996), Brasil (Winder y Silva, 1972; Winder, 1978; Soria, Wirth, Y Besemer, 1978) , Bolivia (Chumacero de Schawe et al., 2016) Indonesia (Groeneveld et al., 2010), Ecuador (Ríos, 2015) y Colombia (Soria, 1971; De la Cruz y Soria, 1972).

El recorrido que hacen los dípteros en las flores es en primer lugar llegar a los estaminodios pues son atraídos por sus colores o aromas (Young y Severson, 1994), pasan a través de ellos y lo prueban con sus partes bucales (Córdoba 2011). Si llevan polen en el tórax, éste es depositado en el estilo cuando sus cuerpos entran en contacto con él. Continúan arrastrándose entre los estaminodios y siguen por los pétalos hasta que el tórax hace contacto con la antera,

posteriormente salen con sus cuerpos impregnados de polen a otras flores y el proceso se repite (Glendinning, 1972).

En las flores de cacao hay muchos visitantes pero no todos son polinizadores, un visitante se vuelve polinizador si: sus alas miden de 0.3 a 0.9 mm de tal manera que su cuerpo quede impregnado de polen cuando pasa por las anteras; su cuerpo debe tener pelos o escamas de donde se pegue el polen; sus picos de actividad deben estar sincronizados con la receptividad de las flores y el polen adherido a su cuerpo debe ir a otras flores (Willmer, 2011; Chumacero de Schawe et al., 2016).

4. Objetivos:

4.1 Objetivo general

4.1.1 Identificar y cuantificar la abundancia de ceratopogónidos asociados a plantas de cacao en distintos tratamientos con materia orgánica en descomposición.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Identificar los géneros de Ceratopogonidae asociados a diferentes tipos de materia orgánica en descomposición.

4.2.2 Identificar el sustrato óptimo para el establecimiento, crecimiento y desarrollo de ceratopogónidos.

5. Metodología

5.1 Área de estudio

La Granja Luker (Fig. 3) está ubicada en el municipio de Palestina en el departamento de Caldas a una elevación de 1050 msnm. La granja tiene un área total de 21 hectáreas y de las cuales 18 están sembradas con cacao. En el espacio restante hay otros árboles frutales y maderables como melina (*Gmelina arborea*), banano (*Musa paradisiaca*), plátano (*Musa balbisiana*), teca (*Tectona grandis*), Asaí (*Euterpe oleracea*), entre otros. Adicionalmente se encuentra un vivero y una construcción para funcionarios y empleados (Casa Luker, 2017).

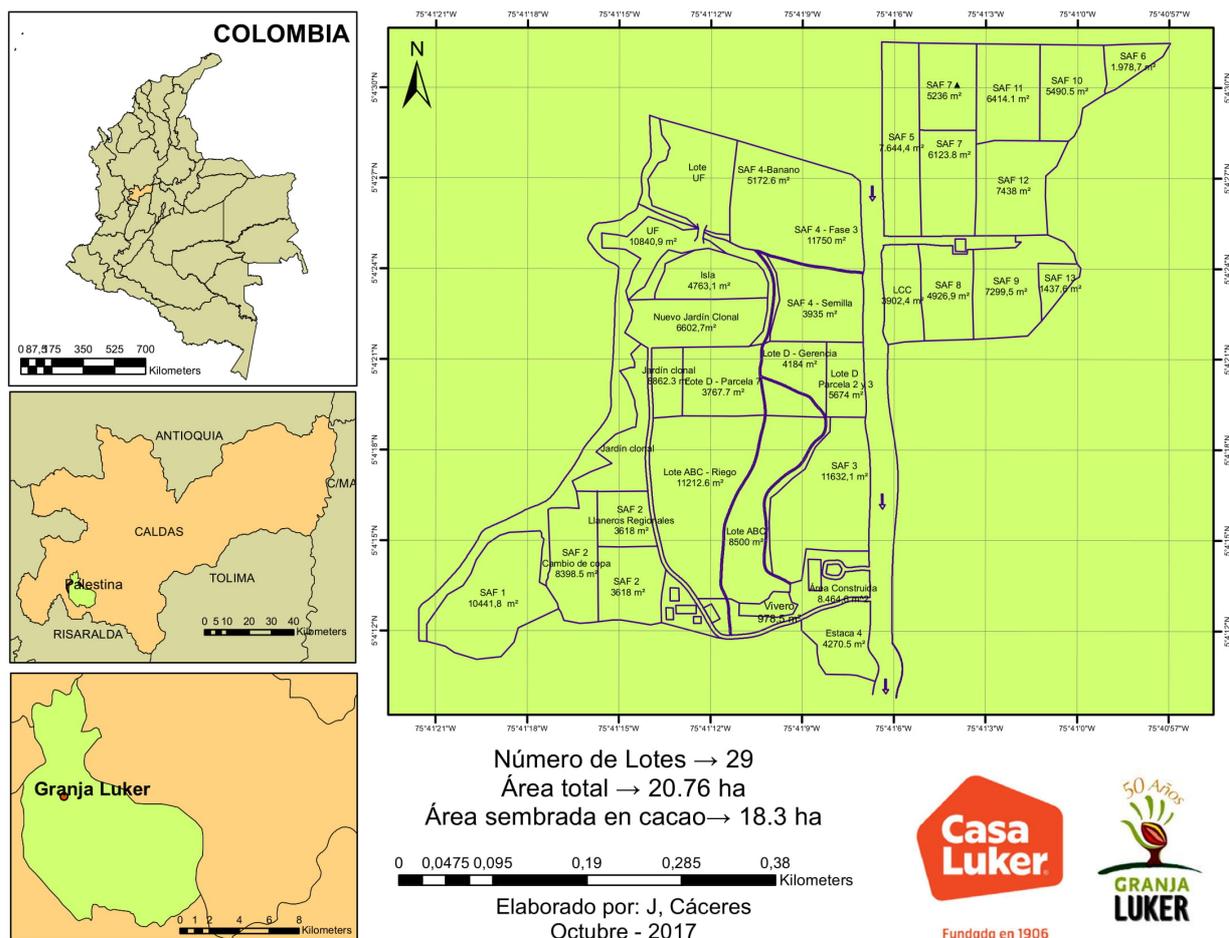


Figura 3. Mapa de la Granja Luker, elaborado por Cáceres, J (2017).

En el municipio de Palestina la temporada de lluvia se presenta en los meses de abril, mayo y junio y, septiembre, octubre y noviembre, mientras que los meses más secos son enero y febrero y el resto del año se mantiene una precipitación promedio de 163 mm por mes (Climate data, 2017). Ya que el muestreo fue llevado a cabo entre los meses de febrero y marzo, se afirma que fue realizado en temporada seca. El sitio cuenta con las características típicas de un bosque entre húmedo tropical y húmedo premontano (Hernández y Valero, 2005), la temperatura promedio es de 25°C y la precipitación anual es de 2500 mm (Climate data, 2017). Se tomaron los datos meteorológicos del sitio durante el lapso que duró la toma de muestras del proyecto y se encuentran consignados en la tabla 1.

La colecta de datos fue realizada durante 30 días. El tiempo 1 son las semanas comprendidas entre el 23 de febrero y el 8 de marzo de 2018 (13 días) estas dos semanas fueron suficientes para que ocurriera el proceso de descomposición de los tratamientos aplicados bajo cada árbol, los adultos emergieran de las pupas y pudieran volar hasta ser capturados por la trampa. Por

otro lado, el tiempo 2 son las semanas del 9 de marzo hasta el 23 de marzo de 2018 (14 días), la población que se encuentra en este tiempo corresponde a la generación que se desarrolló en los tratamientos aplicados, por esta razón se toman en cuenta estos datos para la realización de los análisis estadísticos.

Tabla 1. Datos climatológicos provenientes de la estación meteorológica ubicada en la granja Luker

Periodo de muestreo estudio	Temperatura promedio °C	Precipitación promedio en mm	Humedad relativa promedio en porcentajes (%)	Horas promedio de sol
1	23,7	13,1	77	7,2
2	24,3	11,1	75,8	6,5

Se realizó un promedio con la información de cada día durante el mes de trabajo y se obtuvieron los datos de la temperatura, precipitación, humedad relativa y horas de sol registrado.

5.2 Árboles utilizados

Para la ubicación de las trampas bajo los árboles de cacao y realizar la toma de muestras. Se utilizaron 2 sistemas agroforestales dentro de la granja SAF1 y SAF12 con 10441,8 metros cuadrados y 7438 metros cuadrados respectivamente. El SAF 1 fue sembrado en el 2015 y en este hay un total de 811 árboles, 396 del clon FSV41 y 415 clones de TCS01. Por otro lado, el SAF12, sembrado en 2015, alberga 747 clones de cacao LUK40. Todos los mencionados anteriormente son clones auto compatibles.

Para la selección de árboles se utilizó un modelo de los sistemas agroforestales de la Granja Luker realizados por Cáceres, J. (2017). Se seleccionaron al azar 5 árboles en el SAF1, y 5 en el SAF12, por tratamiento para un total de 10 árboles por tratamiento y 40 árboles por los 4 tratamientos (20 ubicados en el SAF1 y 20 en el SAF12). Por medio de un generador de números aleatorios sin repetición en línea (<http://www.alazar.info/generador-de-numeros-aleatorios-sin-repeticion>), se seleccionaron los 10 árboles por tratamiento, 5 en cada SAF.

5.3 Tratamientos utilizados

Bajo cada árbol previamente seleccionada se aplicó el tratamiento estipulado: (1) control, solo hojarasca proveniente de cacao, a estos árboles no se les añadió ningún tratamiento y en las figuras 4 y 5 se encuentran de color negro (2) pseudotallos de banano marcados con color naranja, (3) estiércol de equino marcado con color morado y por último (4) con estiércol de equino y pseudotallos de banano marcado con color azul. Los tratamientos fueron dejados durante 3 días (miércoles, jueves y viernes), como explica Kaufmann (1975) hay que dejar expuestos los sustratos por lo menos 3 días para que las hembras realicen la oviposición y posteriormente realizar el montaje de trampas bajo cada árbol.

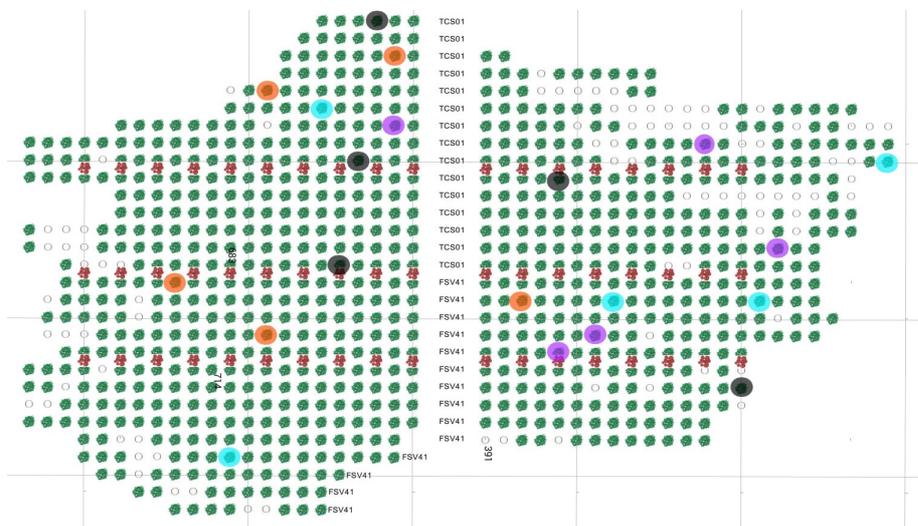


Figura 4. Árboles seleccionados aleatoriamente en el SAF1

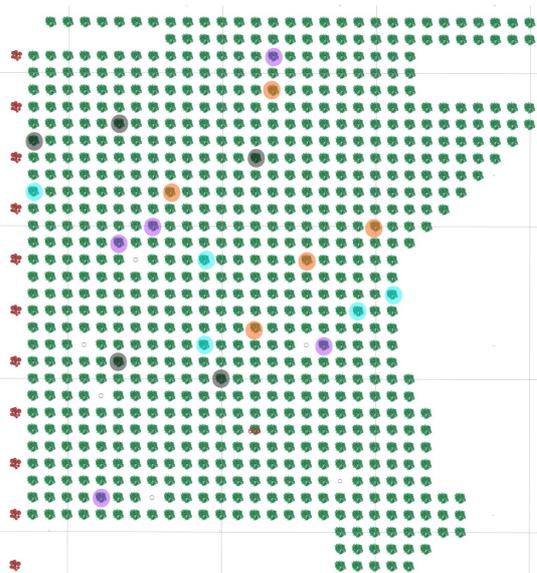


Figura 5. Árboles seleccionados aleatoriamente en el SAF12

5.5 Trampas utilizadas para el muestreo

Las trampas fueron construidas basadas en el modelo propuesto por Shimabukuro et al, (2015). Se construyeron 40 trampas de 80 cm de diámetro y 70 de alto. Para la elaboración se utilizó tela velo suizo blanco y en el borde se usó alambre galvanizado de 4mm de grosor. La trampa se ató desde el extremo más superior al árbol encima de ella y se aseguró en un tallo o rama del árbol con hilo.



Figura 6. Detalle de las trampas utilizadas bajo los árboles de cacao

Transcurridas 2 y 4 semanas se recogió lo que se encuentra en cada frasco colector y se depositó en un recipiente con alcohol. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de entomología de la universidad Javeriana donde fueron separadas por orden, identificadas y analizadas por la estudiante. La identificación de los adultos de la familia Ceratopogonidae se realizó con la clave taxonómica de Borkent y Spinelli (2007).

5.6. Análisis estadístico

Se realizó una base de datos donde por cada trampa se consignó el género, el número de individuos por género separado por sexo -hembra, macho o indefinido cuando no era posible ver la genitalia carácter clave para la separación de sexo-, el tratamiento utilizado, el tiempo en el que se realizó la captura, y el SAF en donde estaba ubicada la trampa. Los datos se analizaron con el software Rstudio v 3.4.4 (R Core team, 2018), para las gráficas se utilizó el paquete ggplot2 (Wickham, 2009).

Se llevó a cabo una prueba de normalidad de Shapiro Wilk, en esta el valor de p resultó ser menor a 0.05 lo cual indica que los datos no siguen una distribución normal y no se puede asumir la normalidad en esta distribución. Debido a lo anterior se utilizó un modelo lineal generalizado (MLG).

Los modelos lineales generalizados (MLG) se construyen con el fin de especificar la relación entre una variable respuesta observada y co-variables o variables explicativas, son útiles con datos que no tienen distribución normal ni homogeneidad de varianzas (Hardin y Hilbe, 2007), como ocurrió en el presente caso. Con el fin de la generación del MLG, se seleccionaron las variables explicativas (tratamientos y SAF) y una variable respuesta (número de individuos), una distribución de probabilidad (poisson), por último, se selecciona una función de relación entre las variables (Müller, 212; Hardin y Hilbe, 2007). Para ésta última, se utilizaron 2 relaciones diferentes (1) una interacción entre las dos variables y la variable respuesta simbolizada con el signo “:” y (2) cada variable explicativa interactuando independientemente con la variable respuesta. La escogencia del mejor modelo se logró mediante la comparación de estos por medio del AIC (criterio de información de Akaike) - utilizado para comparar modelos- con el fin de buscar el que tenga el número más bajo, que se traduce a menor pérdida de información durante la generación del modelo (Hardin y Hilbe, 2007).

En este caso el MLG se usó para determinar qué variables estaba influenciando la abundancia de los 3 géneros de Ceratopogonidae potencialmente polinizadores, las variables SAF y tratamientos fueron definidas como co-variables o variables explicativas y la abundancia de los géneros de Ceratopogonidae fue definida como la variable respuesta.

Al realizar los modelos lineales se obtiene una tabla en dónde se presenta: un estimado que son los coeficientes de máxima verosimilitud para la regresión logística, el símbolo antes del número indica si se relacionan positiva o negativamente con la variable respuesta. El error estándar corresponde al error asociados a los coeficientes de máxima verosimilitud. El valor Z es el estadístico de prueba para el test de Wald se obtiene mediante la división del estimado por el error estándar. Por último, el $\Pr(>|z|)$ es el valor que da el área bajo la curva en una prueba de dos colas. Este valor permite verificar si las variables explicativas, se conectan de una forma estadísticamente significativa a la variable respuesta sí $p>0,05$ se acepta la H_0 si $p<0,05$, se rechaza (Lillis, 2018). El número de asteriscos asociados al número en $\Pr(>|z|)$

muestran mayor o menor conexión o relación entre las variables explicativas con la variable respuesta, 3 asteriscos es el máximo de relación y 0 el mínimo.

Para la selección de variables con un efecto significativo sobre la abundancia de potenciales polinizadores se tomó en cuenta el valor $\Pr(>|z|)$ para cada interacción de las variables explicativas con la variable respuesta.

Adicional a lo anterior, se hizo una separación entre hembras y machos con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre ellas. Para este fin se realizó una prueba de Wilcoxon, pues esta se utiliza para dos muestras relacionadas que no tienen distribución normal. Si $p > 0.05$ se acepta la hipótesis nula, es decir, las medias de las dos poblaciones no son significativamente diferentes y si $p < 0.05$, son significativamente diferentes (Zar, 2014).

Por último, se realizó una estimación de dípteros potencialmente polinizadores por metro cuadrado. Para lo anterior, se calculó el área de la circunferencia de la trampa utilizada con el fin de determinar el tamaño en metros cuadrados de la trampa circular utilizada, con este valor se estimó cuántas trampas se podrían ubicar en los lotes y por último se hizo una regla de 3 con los datos recolectados en el tratamiento control, para determinar cuántos dípteros posiblemente podría haber en todo el lote. Adicionalmente con los datos recolectados en el tratamiento de banano, el cual resultó ser más efectivo, se realizó una estimación de cuantos dípteros potencialmente polinizadores se podrían encontrar si se utiliza el tratamiento en todo el lote.

6. Resultados

En total se encontraron 1522 dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae; 887 en el tiempo 2 y 635 en el tiempo 1. Como se explicó anteriormente la población del tiempo 2 es la que representa la generación que surgió después de los tratamientos así que este dato es el que se utiliza para los análisis y resultados. En este orden de ideas, se encontraron 481 especímenes pertenecientes al género *Forcipomyia*, 300 pertenecientes al género *Culicoides*, 16 pertenecientes al género *Atrichopogon*, 10 al género *Dasyhelea* y por último hubo 82 especímenes clasificados en una categoría denominada: *otros*, en donde se encuentran otros géneros de Ceratopogonidae no reportados e individuos sin alas o antenas, caracteres claves para la identificación a género (Fig. 7), solo en 2 trampas se encontraron a los tres géneros

juntos, en las 38 trampas restantes se encontró *Forcipomyia* con *Atrichopogon* o con *Dasyhelea* pero no los tres juntos.

Al separar por hembras y machos se encontró casi el doble de hembras que machos pues de los géneros polinizadores hubo 329 hembras y 178 machos. Sin embargo, al realizar una prueba de Wilcoxon, se obtuvo que $p=0.1682$. Por tal razón se acepta la hipótesis nula, es decir las medias de las dos poblaciones son estadísticamente similares y no existen diferencias entre ellas.

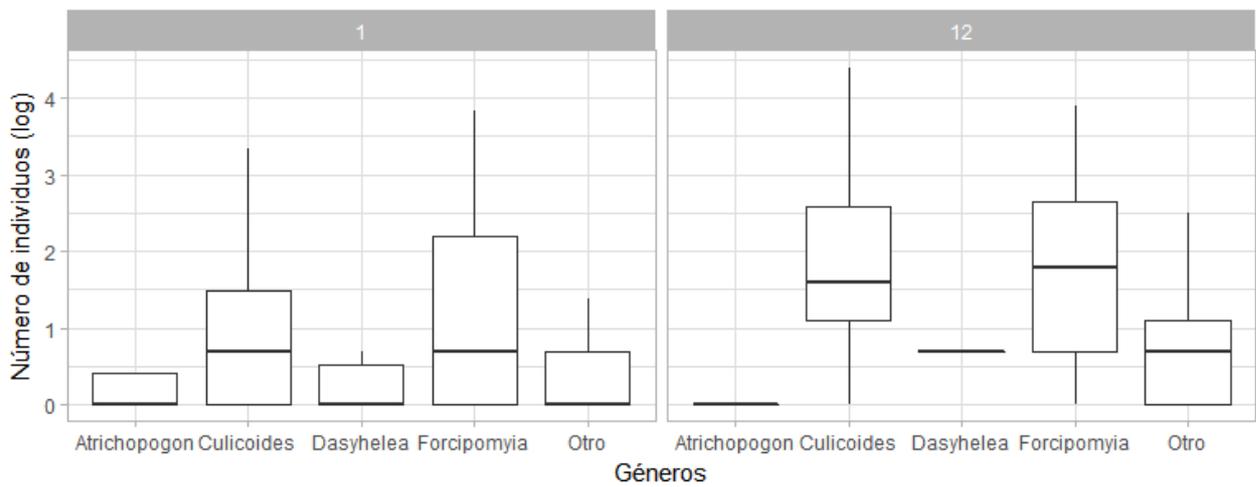


Figura 7. En el eje x se encuentran los géneros y en el eje y el número total de individuos en escala logarítmica. Se observan dos cajas diferentes pues los datos están, separados por SAF (1 al lado derecho y 12 al lado izquierdo). La gráfica muestra un límite superior representado por una línea trazada verticalmente encima de la caja y un límite inferior delimitado por las líneas que hay trazadas verticalmente debajo de la caja blanca; los puntos que se encuentran encima o debajo de estas líneas son valores atípicos. La barra horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos, es decir divide la distribución en dos partes iguales. El tercer cuartil es el extremo superior de la caja y el primer cuartil es el extremo inferior.

En la figura 7 se observa que los datos de *Culicoides* están más dispersos, pues la caja y los bigotes son más largos, sobre todo en el SAF 12. La línea que representa la mediana indica la simetría de la distribución. Si se acerca al primer cuartil es una asimetría positiva y los datos tienen a concentrarse a la parte inferior de la distribución y la media suele ser mayor que la mediana como en el caso de *Atrichopogon* y *Dasyhelea* en el SAF 1. Si por el contrario la mediana se acerca al tercer cuartil, extremo superior, la asimetría es negativa e indica que los

datos se concentran hacia la parte superior de la distribución la media suele ser menor que la mediana como ocurrió en *Forcipomyia* y otros en el SAF12.

Adicionalmente se realizó un filtro en dónde se observan solo los géneros polinizadores por tratamiento, sin tener en cuenta *Culicoides* y otros pues estos géneros no están reportados como polinizadores (Figura 8). *Forcipomyia*, fue el género más abundante en todos los tratamientos y, asimismo, fue el más abundante dentro del tratamiento con pseudotallos de banano. Los tratamientos hojarasca y banano fueron los tratamientos con mayor presencia de dípteros polinizadores. Los valores medios de número de individuos por tratamiento fueron en hojarasca 6.05, en banano 11.56, en estiércol 1.43 y en estiércol y banano 4.44.

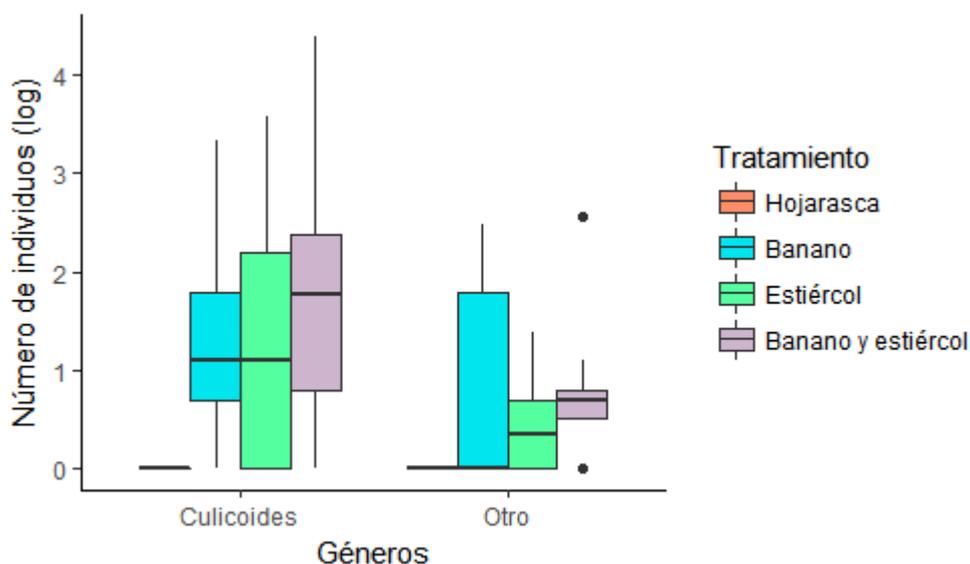
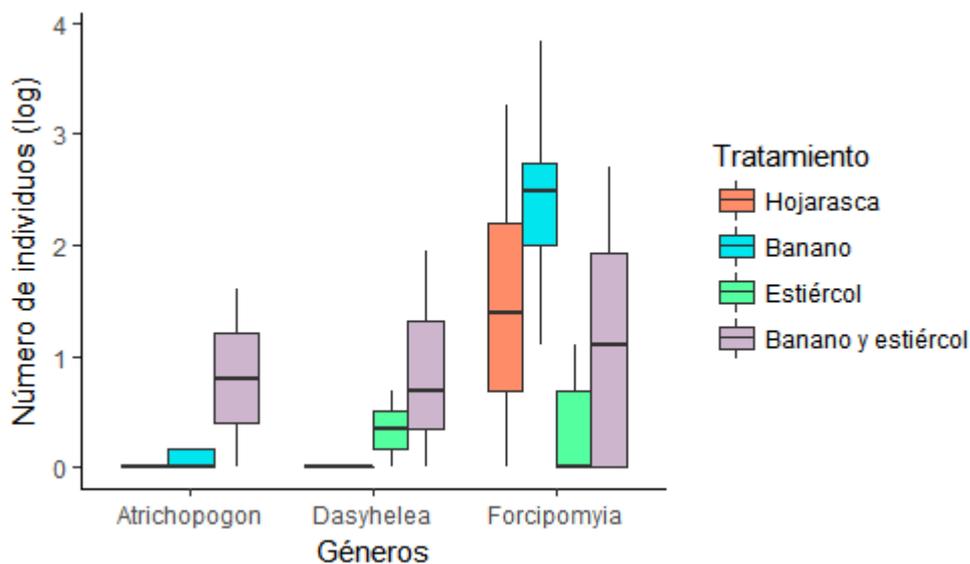


Figura 8. Gráfica con número total de individuos en escala logarítmica por géneros potencialmente polinizadores (en la parte superior) y géneros no reportados como polinizadores (en la parte inferior). En cada género se encuentra como se distribuyen por tratamiento utilizado. El límite superior se evidencia con la línea trazada verticalmente encima de la caja y límite inferior con la línea trazada verticalmente debajo de la caja, los límites cambian de acuerdo con los datos y dependiendo de la dispersión de los datos se encuentran unos límites variables que hacen las cajas mas largas como en el caso del banano y estiércol (en la parte superior) y si los datos no varían tanto, los límites se encuentran mas cercanos entre si haciendo la caja mas angosta. La barra horizontal dentro de cada caja representa la mediana de los datos, es decir divide la distribución en dos partes iguales. El tercer cuartil es el extremo superior de la caja y el primer cuartil es el extremo inferior.

Se utilizó el modelo en el cual las variables explicativas interactúan entre ellas e influenciaron la variable respuesta. Los resultados del modelo lineal generalizado se muestran en la tabla 1.

	Estimado	Error estándar	Valor Z	Pr(> z)
(Intercepto)	0,9555	0,1961	4,872	1,10 ^{-06****}
Banano	1,3636	0,2160	6,313	2,74 ^{-10****}
Estiércol	-0,5137	0,3315	-1,550	0,12124
Banano y estiércol	0,5669	0,2380	2,382	0,01772*
saf 12	1,2617	0,2199	5,737	9,62 ^{-09****}
Banano:saf 12	-1,0278	0,2501	-4,110	3,96 ^{-05****}
Estiércol:saf 12	-1,4522	0,4805	-3,022	0.00251**
Banano y Estiércol: saf 12	-1,3978	0,3592	-3,891	9,97 ^{-05****}

Tabla 2. Resumen del modelo lineal generalizado. Los “.” en la primera columna indican que las dos variables están interactuando en el modelo construido. El símbolo antes del número en la columna de estimados en este caso indica que el banano, banano y estiércol y SAF, mostraron una relación positiva con el número de individuos. Por otro lado, el estiércol, banano:SAF,

estiércol:SAF y banano y estiércol: SAF mostraron una relación negativa con el número de individuos. Los asteriscos en la última columna, el valor p, demuestran mayor o menor relación con el número de individuos.

En los modelos lineales simples, el coeficiente de las variables explicativas indica un aumento o disminución en la variable respuesta a medida que estas cambian. En el caso de los MLG no se puede determinar que tanto aumenta el número de individuos (variable respuesta) con razón a el tratamiento y SAF (variables explicativas) porque (1) los tratamientos no son variables de tipo cuantitativo ni pertenecen a una escala ordinal, sino más bien son cualitativos y pertenecen a una escala nominal, pues son simplemente una categoría aleatoria en la que se agrupan unos datos y (2) porque la interacción entre las dos variables explicativas está incluida y el símbolo antes del número en la columna de estimado (+ o -) indica la relación de esta interacción con la variable respuesta. No obstante, si se puede hacer una estimación y afirmar que hay una relación positiva o negativa es decir hay menor o mayor abundancia de Ceratopogonidae con el uso de un determinado sustrato y adicionalmente los tratamientos obtuvieron resultados diferentes dependiendo del SAF.

En la tabla 2 el valor P (última columna), usado para estimar la significancia, resultó ser menor a 0,05 en todos los casos excepto para el caso del tratamiento de estiércol. Lo anterior quiere decir que, en todos los casos, excepto en el tratamiento de estiércol, las variables explicativas están relacionadas de una forma estadísticamente significativa a la variable respuesta. De esta forma se puede inferir que afectan la variable respuesta en mayor medida aquellas que tienen un p más bajo tales como; tratamiento banano, SAF 12, tratamiento banano: SAF 12, y banano y estiércol: SAF 12. Por otro lado, otras variables explicativas están conectadas de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, no influyen tanto la variable respuesta como las mencionadas anteriormente estiércol: SAF12 y por último como las variables que menos afecta la variable respuesta se encuentra banano y estiércol. El tratamiento de solo estiércol no tiene ninguna influencia estadística sobre el número de individuos.

Basándose en los individuos colectados en el tratamiento de control (hojarasca) se generó una estimación del posible total de ceratopogónidos potencialmente polinizadores en los SAFs utilizados. En el SAF 1, lote de 10.441,8 m², habría aproximadamente 279.840 individuos de ceratopogónidos. Es decir, 26,8 dípteros potencialmente polinizadores por metro cuadrado. Por otro lado, en el SAF 12 cuya extensión son 7.438 m², habría un total de 511.734

ceratopogónidos aproximadamente. Es decir, 68.8 dípteros potencialmente polinizadores por metro cuadrado.

Con el fin de contrastar las cifras anteriores, se realizó nuevamente un estimado esta vez basándose en los individuos colectados en los árboles en los cuales se utilizó banano. En este caso en el SAF1 habría aproximadamente 735.102 dípteros, 70 por metro cuadrado. Y en el SAF 12 habría aproximadamente 809.254 dípteros, 108 por metro cuadrado, disponibles para la polinización de las plantas de cacao. En concordancia con lo anterior, teóricamente, el uso del banano bajo los árboles ayudaría a aumentar la densidad de población en un 263% en el SAF 1 y en un 158% en el SAF 12.

Aparte de los dípteros polinizadores en las trampas se encontraron otros órdenes de artrópodos tales como Diptera (no Ceratopogonidae) y Coleoptera en gran cantidad, adicionalmente se lograron identificar especímenes pertenecientes a Lepidoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Aracnida, Collembola, Orthoptera, Blattodea y Thysanoptera.

7. Discusión:

El género más reportado como polinizador: *Forcipomyia* (Glendinning, 1972; Bravo et al., 2011; Córdoba et al., 2013; Mavisoy et al., 2013; Martínez et al., 2000,) fue el más abundante en el presente estudio. Seguido de éste se encontraron los géneros *Atrichopogon* y *Dasyhelea*, con menor abundancia. Adicionalmente, otro género identificado, *Culicoides*, no ha sido reportado como polinizador; sin embargo, las hembras de este género son conocidas por ser hematófagas de vertebrados y puede transmitir enfermedades que afectan el ganado, por ende, determinar si su abundancia incrementa con el uso de algún tratamiento, sirve para establecer si se genera un riesgo adicional para el agricultor y sus animales. Adicionalmente, se observó que los machos *Culicoides* también tienen antenas plumosas y vellosidades en el cuerpo dónde probablemente podría albergar polen y no se han estudiado como posibles polinizadores del cacao. Sin embargo, este género es de menor tamaño comparado con los otros ceratopogónidos y al pasar por el espacio entre la antera y el estaminodio tal vez su cuerpo, al no estar en estrecho contacto con la estructura, no puede impregnarse de polen. Dentro de los especímenes clasificados como “*otros*” también pueden existir géneros no reportados como polinizadores al

ser nativos de la región o al ser menos abundantes, así pues, un estudio en el que se capturen dípteros con alguna trampa que no contenga alcohol, haría posible que se cuente polen de los cuerpos de sus cuerpos y se pueda determinar si son polinizadores o no. Lo anterior no fue posible en este caso pues los especímenes caían en alcohol y este líquido desprendía todo el polen adherido.

Aún cuando los tres géneros (*Forcipomyia*, *Dasyhelea* y *Atrichopogon*) están reportados como polinizadores, es importante recalcar que estos nunca estuvieron juntos en una misma trampa, dicho resultado resulta similar al reportado por Córdoba (2011) y Córdoba et al. (2013), que corroboraron la presencia de los tres géneros distribuidos en diferentes parcelas, pero nunca juntos en una sola.

El MLG mostró una relación entre el número de individuos y el tratamiento y SAF utilizados. Asimismo, permitió evidenciar que las variables explicativas, tratamiento y SAF, interactúan entre ellas. De manera general, los tratamientos sí influyen sobre la variable respuesta e interactuaron con el SAF en el que están. Los tratamientos tuvieron una relación estadística positiva con el número de individuos, dentro de éstos, sólo uno de los tratamientos, estiércol, no tuvo relación estadísticamente significativa con la variable respuesta, tema que más adelante será discutido.

En concordancia con la literatura el tratamiento en el cual se utilizaron pseudotallos de banano albergó a la mayor población de ceratopogónidos. Contrastando los resultados de Kaufmann (1975) quién afirmó que las hembras preferían el estiércol de herbívoros sobre los pseudotallos de banano y cáscaras de cacao, el tratamiento con estiércol resultó ser el que atrajo menos cantidad de dípteros de todos y el tratamiento control, solo hojarasca, fue el que atrajo mas dípteros, después del de banano.

Los tratamientos que menor número de ceratopogónidos albergaron, fueron el tratamiento de estiércol y el tratamiento con pseudotallos de banano y estiércol. La discrepancia entre estos resultados con los de Kaufmann, se puede deber a que la fauna presente en el área de estudio difiere de la fauna en Ghana (África), donde Kaufmann realizó su estudio. En razón a lo expuesto, añadir estiércol pudo haber atraído a más hembras a realizar la oviposición, pero de la misma manera atrajo a depredadores de larvas y pupas de ceratopogónidos como ácaros, colémbolos, hormigas, dermápteros y quilópodos (Kaufmann, 1975; Córdoba, 2011;

Chumacero de Schawe, 2016). Dichos depredadores, posiblemente, no dejaron que la población de dípteros creciera y se desarrollaran en los sustratos aplicados.

Aparte de los factores mencionados anteriormente, la población de ceratopogónidos es dependiente de cambios climatológicos locales y tienden a sincronizarse con los factores meteorológicos de la zona (Young, 1986). Se puede afirmar que la temperatura, durante los ensayos, fue la adecuada ya que los ceratopogónidos, se desarrollan óptimamente en temperaturas de 24°C (Córdoba, 2011; Kaufmann, 1974). Adicionalmente, los dípteros requieren una alta humedad relativa que en el presente estudio fue de 77% en el tiempo 1 y de 75,8% en el tiempo 2. Por último, las horas de sol (7,2 horas en el tiempo uno y 6,5 horas en el tiempo dos), indican que hubo abundante radiación solar, por lo que este factor cobra importancia debido a que los ceratopogónidos evitan el sol muy fuerte, ya que a pesar de ser ectotermos si es muy fuerte, se desecarían (Soria et al, 1978). Este es el motivo por el cual necesitan de sombrero ya sea bajo los árboles de cacao u otros maderables o frutales.

En cuanto a la precipitación promedio, en ambos casos fue similar y en total durante la duración del muestreo se registraron 134,1 mm de lluvia. En Palestina la época de lluvia empieza en abril, así que se puede decir que el estudio fue realizado en época seca. Kaufmann (1974) afirma que las poblaciones de *Forcipomyia* y otros dípteros polinizadores, son mayores en época lluviosa y menores en temporada seca. Sin embargo, Young (1986) dice que son más abundantes en temporada seca debido a que en épocas de lluvia los polinizadores se dispersan pues la humedad retenida en el suelo permite que cualquier sustrato sea apto para la cría (Ramos, 2011). Por otro lado, en época seca, los dípteros acudirían a un lugar con sombra ya sea bajo la hojarasca de los árboles de cacao o bajo otros árboles dentro del SAF (Kaufmann, 1974; Córdoba, 2011). Esto se da principalmente debido a que los estadios de larva y pupa requiere lugares húmedos en donde vivir y materia en descomposición de la cual alimentarse (Kaufmann, 1974; Córdoba, 2011; Soria, 1971; Borkent et al., 2009; Borkent y Spinelli, 2007; Marshall, 2012). Un estudio en temporada de lluvias sería necesario para poder afirmar si en la Granja Luker son más abundantes en temporada seca o lluviosa y poder contrastar los datos.

Otro factor importante definido como una variable explicativa, es el lote o SAF en el que se ubicaron las trampas debido a que las siembras de los clones de cacao en estos sitios fueron en tiempos diferentes; el SAF 12 fue sembrado en 2014 y el SAF 1 fue sembrado en 2015. Se esperaría que un cultivo más joven tuviera menos abundancia de ceratopogónidos pues estos

van llegando gradualmente, no obstante, este no fue el caso en el presente muestreo ya que el lote más joven tuvo una menor abundancia de dípteros potencialmente polinizadores. Sin embargo, hay muchos otros factores que pueden estar explicando la diferencia en abundancia como lo son mayor sombrero en un lote que en el otro (Kaufmann, 1974; Young, 1986; Mavisoy et al., 2009) el sombrero por los árboles de cacao se descarta pues en la Granja Luker se realizan podas constantes de las ramas en los dos lotes por igual, sin embargo, la distribución de los lotes difiere un poco y esto podría estar influenciando las poblaciones de dípteros. En el caso del SAF 1 se encuentran 3 surcos de melina (*Gmelina arborea*) entre los árboles de cacao, por otro lado, el SAF 12 tiene solo un surco de *G. arborea* en el borde. Tanto el cacao como los ceratopogónidos necesita sombra, pues los dípteros la buscan para huir del calor (Mavisoy et al., 2009) y según Young (1986) hay más actividad polinizadora en árboles con sombra cerca. Pero, por otro lado, la sombra excesiva disminuye la floración (Young 1986), si no hay alta disponibilidad de flores y mucha sombra los dípteros no se establecerán en dicho terreno porque necesitan sombra y asimismo sol para sus procesos fisiológicos.

Adicional a lo anterior hubo variables que no se midieron, que a lo largo de la realización del estudio fueron tomando importancia y no habían sido tenidas en cuenta al comienzo de este, de igual manera no se tomaron en cuenta por estar fuera del objetivo del trabajo. Sin embargo, dichas variables podrían estar explicando la diferencia en abundancias y sería importante medirlas tales como cambios en la pendiente del terreno, pues un lote con una menor pendiente albergaría mayor cantidad de dípteros (Mavisoy et al., 2009; Ramos, 2011). La presencia de depredadores y enemigos naturales de Ceratopogonidae. Las diferencias entre los dos genomas de los clones utilizados, pues algunos insectos son atraídos de mayor manera por determinado árbol pues su material genético, producto de la selección artificial en clones e híbridos, resulta ser más atractivo para los dípteros (Soria, 1978; Narváez y Marín, 1996). Las variables mencionadas anteriormente no fueron medidas y pueden ser objeto de estudios posteriores.

Córdoba (2011) menciona que la abundancia de ceratopogónidos potencialmente polinizadores tiene una relación positiva con la abundancia de árboles de cacao y una relación negativa con la abundancia de árboles maderables, frutales, musáceas y palmáceas. En los SAFs trabajados solamente hay sembrado, aparte del cacao, madera, banano y plátano. Esta es una variable para realizar una comparación con otros lotes que tengan otro tipo de árboles plantados. En el presente estudio no se midieron frutos ni flores polinizadas por cuestiones de tiempo, sin embargo, para estudios a futuro se recomienda hacerlo pues, Narváez y Marín (1996)

reportaron que no había relación entre los frutos grandes cosechados y la abundancia de Ceratopogonidae en cultivo, sino que la abundancia estaba relacionada con los frutos pequeños. Lo anterior se da debido a que las flores debidamente fecundadas pueden abortar frutos, la nutrición puede no ser buena o suficiente para la cantidad de mazorcas que podrían desarrollarse y finalmente los insectos, enfermedades y hongos dañan los frutos antes de ser cosechados.

Aparte de los ceratopogónidos, en observaciones realizadas en el cacaotal y mirando los otros órdenes encontrados en los resultados, las flores de cacao son visitadas por múltiples insectos en el presente estudio se observaron grupos de ácaros en los pedicelos de las flores sin entrar a ellas. Adicionalmente un himenóptero que visitó la flor aproximadamente 1 minuto antes de volar (Fig. 9) Además en otros estudios se han observado abejas, áfidos, ácaros, hormigas, trips, coleópteros, entre otros (Martínez, Narváez y Spinelli, 2000; Ríos, 2015). La mayoría de los visitantes florales llegan a las flores en busca de alimento pues el néctar es fuente de energía y algunos, de hecho, se alimentan del polen (Ssymank et al., 2008, Willmer, 2011); en otros casos las flores son utilizadas por insectos como los ceratopogónidos como hábitats dado que las moscas adultas encuentran allí un lugar de abrigo, protección contra el clima, depredadores, parásitos y asimismo como sitio de apareamiento o para la oviposición (Willmer, 2011; Marshall, 2012).



Figura 9. Izquierda: Ácaros presentes en el pedicelo y la parte posterior de la flor (encerrados en un círculo rojo), no adentro de ella. Derecha: Himenóptero no identificado de color amarillo, dentro de la flor, encerrado en un círculo rojo.

Normalmente las flores tienen atributos para atraer visitantes y polinizadores tales como color, forma y esencia. En el caso particular del cacao no hay consenso de cuáles de ellos sirven para atraer a los polinizadores, puesto que hay autores que afirman que no hay aromas sino que es el color el que tiene que ver en la atracción; otros dicen que las flores no tienen ningún aroma ni esencia en particular; por ejemplo Young y Severson (1994) probaron que los aceites florales destilados del tallo atraen a dípteros ceratopogónidos y cecydomiidae (también dípteros nematóceros) e himenópteros halictidos y meliponinos. Mientras que compuestos volátiles que intentan imitar estos aceites, los atraen menos. Es decir, que los aceites florales sirven como señales para atraer a los visitantes. Sin embargo, los clones de *T. cacao* derivan de un proceso de selección genética y artificial lo cual pueden llevar a una pérdida de aromas naturales y atributos que ancestralmente atraían a numerosos himenópteros y otros insectos que hoy en día no son considerados polinizadores (Young y Severson, 1994). Por otro lado, hay autores que afirman que las flores sí tienen esencias o aromas y estos son los que atraen a potenciales polinizadores.

Los visitantes florales y por consiguiente polinizadores son un ensamblaje temporal de insectos en un espacio y tiempo determinado (Chumacero et al., 2016), es decir, las poblaciones fluctúan y un polinizador particular de relativa importancia, puede variar con el paso de los años o incluso de las estaciones meteorológicas (Szymank et al., 2008; Chumacero et al., 2016). Con relación a lo anterior, desde hace tanto tiempo diversos autores han reportado a *Forcipomyia* y ceratopogónidos como polinizadores efectivos (Kaufmann, 1975; Brew 1984; Winder, 1978). Dichos resultados indicarían que las poblaciones de ceratopogónidos se han mantenido en el ecosistema de una plantación de cacao formando poblaciones permanentes pues allí logran suplir todas sus necesidades ecológicas (Kaufmann, 1987). Tales como protección a la desecación por el sol y de depredadores, sustratos húmedos y materia en descomposición para la alimentación de las larvas y flores ricas en néctar y azúcares para la alimentación de los adultos (Maes y Wirth, 1990; Ronderos et al., 2011).

En el caso de los polinizadores de cacao, no hay consenso si los vectores de polen son las hembras o los machos. Estudios han demostrado que son las hembras las que realizan la polinización (De la Cruz y Soria, 1973). Kaufmann (1975) afirmó que los machos superan a las hembras en una proporción 4:1, Brew (1984) por otro lado, afirma ambos sexos son igual de participativos en el proceso de polinización. Otros autores afirman que son las hembras quienes polinizan (Billes, 1941; Winder, 1978; Ramos, 2011). En el presente estudio se hizo

una comparación preliminar contrastando hembras y machos, pues se esperaba mayor presencia de hembras ya que éstas son quienes utilizan la materia orgánica como sitio de oviposición. Se realizó una prueba de Wilcoxon con la que se demostró que no había diferencias significativas en las dos poblaciones, es decir, sus medias eran estadísticamente similares. Dentro de este resultado no se pueden hacer afirmaciones de si son vectores o no, debido a que la presencia y abundancia de un sexo u otro puede estar relacionada con otros factores y no precisamente con la polinización.

En el presente estudio se estimó que se pueden encontrar aproximadamente desde 200.000 a 500.000 ceratopogónidos potencialmente polinizadores por hectárea, Winder (1977) encontró que en Brasil se pueden encontrar desde 3.000 hasta 300.000 polinizadores por hectárea. Narváez y Marín (1996) en Venezuela reportaron 5500-1800 polinizadores por hectárea. Por último, Córdoba et al. (2013) en bocas del toro, Panamá encontraron 1700 a 19.500 individuos por hectárea por último Córdoba (2011), también en Panamá, afirmó que se pueden encontrar desde 1800 polinizadores por hectárea, hasta 195.100

El presente trabajo representa una aproximación al conocimiento de grupos taxonómicos representativos en un cultivo de cacao en Colombia, es un acercamiento para posteriormente utilizar dicha información y poder orientar estudios de polinización o en el área de estudio. Pues como se mencionó anteriormente los estudios en Colombia aparte de ser muy antiguos (Soria y Wirth, 1979; De la Cruz y Soria 1973; de Jesús Soria, 1971; Figueroa y de la Cruz, 1984), hablan acerca del comportamiento del insecto y no de detalles de biología como sitios de cría, oviposición, preferencias por un árbol u otro etc. Además, este estudio permitió corroborar si sustratos que anteriormente habían resultado atractivos en otros sitios. En este caso solo el banano tiene influencia en el cambio de abundancia de ceratopogónidos. De lo anterior se puede afirmar que aún cuando los géneros polinizadores son los mismo, la diversidad es tan grande que se abre una ventana para determinar si en Colombia podría haber otras especies del mismo género (o de otro) polinizadores efectivas no reportadas en África u otros países del continente sur americano, pues la planta es nativa en este último.

Los resultados obtenidos son un primer paso para apoyar prácticas de manejo de la biodiversidad asociadas a fincas cacaoteras en Colombia. Lo anterior con el fin de aumentar la presencia de visitantes y potenciales polinizadores en el cultivo y que trae consigo una mayor

producción de frutos, por ende, mayor rendimiento del cultivo que se traduce a mayor ingreso para los campesinos y agricultores.

8. Conclusiones

Entre los tratamientos utilizados el que atrajo mayor cantidad de dípteros de la familia Ceratopogonidae, fueron los pseudotallos de banano. Los tallos retienen la humedad para la oviposición y en el proceso de descomposición crecen microorganismos para la alimentación de las larvas. Por este motivo, el uso de pseudotallos de plátano o banano se recomienda en las plantaciones comerciales para aumentar el número de individuos de potenciales polinizadores.

El estiércol no es recomendado como sustrato atrayente, pues atrae a otros insectos que podrían ser depredadores de ceratopogónidos y a un mayor número de Culicoides, vectores de enfermedades y virus.

Se pudo evidenciar que el tratamiento y el sistema agroforestal en el que se trabajó, tuvieron una relación estadísticamente significativa con el número de individuos. En algunos casos dicha relación fue positiva, es decir, mayor número de individuos dependiendo del tratamiento y SAF utilizado, como ocurrió con el tratamiento de banano. En otros casos, se encontró una relación negativa menor número de individuos como ocurrió con el estiércol.

Es común que el cacao se asocie con otros árboles para proveer sombra e ingresos adicionales a los agricultores, sin embargo, es importante recalcar que los árboles plantados alrededor tienen una clara influencia en la abundancia de dípteros potencialmente polinizadores de cacao. Así pues, se hace importante la evaluación de árboles y plantas que se sembrarán de tal manera que no perjudique el número de potenciales polinizadores que puedan ser atraídos.

9. Recomendaciones

- Se recomienda medir las variables que podrían estar influenciando la abundancia de los potenciales polinizadores tales como el porcentaje de sombra, la presencia de depredadores, la pendiente del terreno y altura del dosel tanto de los árboles sombra como del cacao.
- Realizar un estudio en temporada de lluvias en la misma área de estudio y con las mismas condiciones. Con el fin de comparar los presentes resultados.
- Es importante complementar los estudios de abundancia con un estudio de eficacia de polinización. Es decir, relacionar el número de polinizadores con el número de frutos pequeños y posteriormente con el número de frutos cosechados.
- Ya que se identificaron sustratos óptimos para el crecimiento y desarrollo de Ceratopogonidae, un segundo paso puede ser la cría de estos dípteros en laboratorio para liberarlos en plantaciones recientes donde todavía no se hayan establecido o en plantaciones donde se deba hacer la polinización manual para garantizar la producción de frutos.

10. Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los operarios, empleados y practicantes de la granja Luker quienes estuvieron participes en toda la fase de campo del proyecto. A Dimitri Forero y Giovanni Fagua por el apoyo desde el comienzo del trabajo. A Emily Kearney por su colaboración en la identificación de los dípteros polinizadores y finalmente a Oscar Laverde por el asesoramiento y acompañamiento durante la elaboración del trabajo.

11. Bibliografía

- Abrol, D. P. (2012). *Pollination biology : biodiversity conservation and agricultural production*. Dordrecht ; London: Springer.
- Adjaloo, M., Banful, B. K. B., & Oduro, W. (2013). Evaluation of breeding substrates for cocoa pollinator, *Forcipomyia* spp. and subsequent implications for yield in a tropical cocoa production system. *American Journal of Plant Sciences*, 4(02), 204.
- Billies, D. (1941). Pollination of *Theobroma cacao* L. in Trinidad, BWI. *Tropical Agriculture, Trinidad*.
- Borkent, A., Brown, B. V., Adler, P. H., Amorim, D. S., Barber, K., Bickel, D., . . . Zumbado, M. A. (2018). Remarkable fly (Diptera) diversity in a patch of Costa Rican cloud forest: Why inventory is a vital science. *Zootaxa*, 4402(1), 53-90.
- Borkent, A., & Spinelli, G. R. (2007). *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera, Insecta): Ceratopogonidae Neotropicales (Diptera, Insecta)* (Vol. 4): Pensoft Publishers.

- Borkent, A., Spinelli, G. R., & Grogan Jr, W. L. (2009). Ceratopogonidae (biting midges, punrujas). *Manual of Central American Diptera*, 1, 407-435.
- Bravo, J. C., Somarriba, E., & Arteaga, G. (2011). Factores que afectan la abundancia de insectos polinizadores del cacao en sistemas agroforestales. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 28(1), 119-131.
- Brown, B. V. (2009). *Manual of Central American Diptera*. Ottawa: NRC Research Press.
- Caffrey, C. (2017). Cacao. Salem Press enciclopedia (en línea). Recuperado de: <http://search.ebscohost.com.ezproxy.javeriana.edu.co:2048/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87320985&es&site=eds-live>
- Chumacero de Schawe, C., Kessler, M., Hensen, I., & Tschardtke, T. (2016). Abundance and diversity of flower visitors on wild and cultivated cacao (*Theobroma cacao* L.) in Bolivia. *Agroforestry Systems*, 92(1), 117-125.
- CONABIO. (2008). *Theobroma cacao*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf
- Cáceres, J. (2017). Mapas Granja Luker. In M. d. SAFs (Ed.). Sin publicar.
- Córdoba, C., Cerda Bustillos, R., Deheuvels, O., & DeClerck, F. A. (2013). Polinizadores, polinización y producción potencial de cacao en sistemas agroforestales de Bocas del Toro, Panamá.
- Córdoba, C. T. (2011). Efecto de la estructura de sistemas agroforestales de cacao y de su contexto local, sobre las poblaciones de dípteros polinizadores del cacao y su relación con la producción en Bocas del Toro, Panamá (Tesis de posgrado). Catie, Turrialba, Costa Rica.
- de Jesus Soria, S. (1971). La polinización del cacao por las mosquitas *Forcipomyia* spp. (Diptera, cera topoconidae) en Palmira, Colombia. *Acta Agronómica*, 21(2), 77-82.
- De la Cruz, L., & Soria, V. (1973). Estudio de fluctuaciones de polinización del cacao por las mosquitas *Forcipomyia* spp. (Diptera, Ceratopogonidae), en Palmira, Valle, Colombia. *Acta Agronómica (Colombia)* v. 23 (3-4) p. 1-17.
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M. I., Weigend, M., & Luebert, F. (2012). Hoja botánica: Cacao. *Theobroma cacao* L.
- Espinosa-García, J. A., Uresti-Gil, J., Vélez-Izquierdo, A., Moctezuma-López, G., Inurreta-Aguirre, H. D., & Góngora-González, S. F. (2015). Productividad y rentabilidad potencial del cacao (*Theobroma cacao* L.) en el trópico mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 1051-1063.
- FEDECACAO. (2018). En 2017 Colombia alcanzó nuevo récord en producción de cacao. Retrieved from <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-04-23-20-00-33/551-en-2017-colombia-alcanzo-nuevo-record-en-produccion-de-cacao>
- Figuerola, M. A., & de la Cruz, J. (1984). Dinámica e incidencia de *forcipomyia* spp (Diptera, ceratopogonidae) en la polinización del cacao (*Theobroma cacao* L.) en palmira, valle. *Acta Agronomica*, 34(2), 42-52.
- Glendinning, D. (1972). Natural pollination of cocoa. *New Phytologist*, 71(4), 719-729.

- Groeneveld, J. H., Tschardtke, T., Moser, G., & Clough, Y. (2010). Experimental evidence for stronger cacao yield limitation by pollination than by plant resources. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 12(3), 183-191.
- Hardin, J. W., & Hilbe, J. M. (2007). *Generalized linear models and extensions* (2nd ed. ed.). College Station, Tex.: Stata Press.
- Hernández, L., & Valero, N. (2005). Desarrollo sustentable del Bosque húmedo Tropical. Características, ecología y uso. *Venezuela: Edit. Fondo Editorial Uneg*.
- ICA (2014). Corpoica lanza los primeros dos clones de cacao con registro en Colombia. Disponible en: [https://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-\(1\)/Corpoica-lanza-los-primeros-dos-clones-de-cacao-co.aspx](https://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2013-(1)/Corpoica-lanza-los-primeros-dos-clones-de-cacao-co.aspx) . Consultado 6 Abril de 2018.
- Kaufmann, T. (1974). Behavioral biology of a cocoa pollinator, *Forcipomyia inornatipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Ghana. *Journal of the Kansas entomological society*, 541-548.
- Kaufmann, T. (1975). Studies on the ecology and biology of a cocoa pollinator, *Forcipomyia squamipennis* I. & M. (Diptera, Ceratopogonidae), in Ghana. *Bulletin of Entomological Research*, 65(2), 263-268.
- Kearns, C. A., & Inouye, D. W. (1993). *Techniques for pollination biologists*: University Press of Colorado.
- Lillis, D. (2018). Generalized Linear Models in R, Part 6: Poisson Regression for Count Variables. Retrieved from <https://www.theanalysisfactor.com/generalized-linear-models-in-r-part-6-poisson-regression-count-variables/>
- Luker, C. (2017). *The Chocolate Dream* (P. Aparte Ed. Vol. 1). Bogotá, Colombia: Casa Luker.
- Maes, J.-M., & Wirth, W. *Catalogo de los Diptera de Nicaragua. 6. Ceratopogonidae (Nematocera)*. Rev. Nica. Ent. 14B:1-17
- Marshall, S. A. (2012). *Flies : the natural history & diversity of Diptera*. Richmond Hill, Ont. ; Buffalo, N.Y.: Firefly Books.
- Martínez, A., Narváez, Z., & Spinelli, G. (2000). Mosquitas polinizadoras (Diptera: Ceratopogonidae) del cacao colectadas en comunidades Piaroa en Amazonas, Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, 15(2), 249-253.
- Mavisoy, M., Karol, H., Cabezas, M., Servio, R., Ballesteros, P., & Somarriba Chávez, E. (2013). *Evaluación de la abundancia de ceratopogonidos (Diptera) polinizadores de cacao (Theobroma cacao L.) en la hojarasca de 7 árboles de sombra, Talamanca-Costa Rica*. (Tesis de pregrado). Universidad de Nariño. Pasto, Colombia,
- Müller, M. (2012). Generalized linear models. In *Handbook of Computational Statistics* (pp. 681-709): Springer.
- Narváez, Z., & Marín, C. Abundancia de Ceratopogónidos (Diptera) en una plantación de cacao, *Theobroma cacao* (Sterculiaceae), en Chuao, Edo. Aragua, Venezuela. *Agrotrópica*, 8(1), 15-22.
- Pape, T., Bickel, D. J., & Meier, R. (2009). *Diptera diversity: status, challenges and tools*: Brill.
- Ramos , R. M. (2011). *Estudio de la diversidad de insectos polinizadores en sistemas agroforestales de cacao y su relación con la productividad y diversidad de especies*

- del dosel* (Tesis de pregrado). Universidad de San Pedro Sula, San Pedro Sula, Honduras.
- Raskin, N. D., & Vuturro, P. T. (2012). *Pollination : Mechanisms, Ecology, and Agricultural Advances*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Ronderos, M. M., Marino, P. I., Díaz, F., & Estévez, A. L. (2011). Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Martín García Island, Argentina. *Revista de biología tropical*, 59(3), 1183-1194.
- Ríos, D. F. (2015). *Descripción de la diversidad entomológica asociada a la flor de Theobroma cacao* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica de Ecuador, Quito, Ecuador.
- Shimabukuro, E., Pepinelli, M., Perbiche-Neves, G., & Trivinho-Strixino, S. (2015). *A new trap for collecting aquatic and semi-aquatic insects from madicolous habitats* (Vol. 8).
- Somarriba Chávez, E., Cerda Bustillos, R., Astorga Domian, C., Quesada Chaverri, F., Vásquez Morera, N., & Orozco Aguilar, L. (2010). Sexual reproduction of cacao. *World Cacao Foundation*. Retrieved from http://www.worldcocoafoundation.org/wpcontent/uploads/files_mf/somarribachavez2010genomicsphysiologysexualreproduction.english6.5mb.pdf.
- Soria, S. d. J., & Wirth, W. (1979). Ceratopogonid, midges (Diptera: Nematocera) collected from cacao flowers in Palmira, Colombia: An account of their pollinating abilities. *Revista Theobroma (Brasil)* v. 9 (2) p. 77-84.
- Soria, S. d. J., Wirth, W., & Besemer, H. (1978). Breeding places and sites of collecting of adults of Forcipomyia spp. Midges (Diptera, Ceratopogonidae) in cacao plantations in Bahía, Brazil; a progress report. *Revista Theobroma (Brasil)* v. 8 (1) p. 21-29.
- Ssymank, A., Kearns, C. A., Pape, T., & Thompson, F. C. (2008). Pollinating flies (Diptera): a major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity*, 9(1-2), 86-89.
- Suárez Capello, C., Moreira Duque, M., & Vera Barahona, J. (1994). Manual del cultivo de cacao.
- Toledo-Hernández, M., Wanger, T. C., & Tschardtke, T. (2017). Neglected pollinators: Can enhanced pollination services improve cocoa yields? A review. *Agriculture, ecosystems & environment*, 247, 137-148.
- Willmer, P. (2011). *Pollination and floral ecology*. Princeton, N.J. ; Woodstock: Princeton University Press.
- Winder, J. (1978). Cocoa flower Diptera; their identity, pollinating activity and breeding sites. *Pans*, 24(1), 5-18.
- Winder, J. A., & Silva, P. (1972). Cacao pollination: Microdiptera of cacao plantations and some of their breeding places. *Bulletin of Entomological Research*, 61(4), 651-655.
- Young, A. M. (1982). Effects of shade cover and availability of midge breeding sites on pollinating midge populations and fruit set in two cocoa farms. *Journal of Applied Ecology*, 47-63.
- Young, A. M. (1986). Habitat differences in cocoa tree flowering, fruit-set, and pollinator availability in Costa Rica. *Journal of tropical ecology*, 2(2), 163-186.

- Young, A. M., & Severson, D. W. (1994). Comparative analysis of steam distilled floral oils of cacao cultivars (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae) and attraction of flying insects: Implications for a *Theobroma* pollination syndrome. *Journal of chemical ecology*, 20(10), 2687-2703.
- Zar, J. H. (2014). *Biostatistical analysis* [electronic resource]. 5th ed., Pearson new international ed.