

UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS PALINOLÓGICO DE MUESTRAS COPROLÓGICAS EN VERTEBRADOS POLINIZADORES

A NEW METHODOLOGY FOR THE PALYNOLOGICAL ANALYSIS OF FECES SAMPLES IN VERTEBRATE POLLINATORS

MERCADO, G. JORGE ^{1*} MSc, PEREZ, C. ALEXANDER ² Dr.

¹Departamento de Biología, Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre, Sincelejo – Colombia. ² Líder grupo de investigación Bioprospección Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sucre.

*Correspondencia: jdmercado@gmail.com

Recibido: 15-02-12; Aceptado: 25-05-12

Resumen

Describimos un método para analizar muestras de polen en heces de murciélagos nectarívoros, optimizando el análisis palinológico sin el uso de químicos fuertes y en menor tiempo, demostrando las ventajas de nuestro protocolo frente a las técnicas convencionales de análisis de dietas de animales nectarívoros.

Palabras Clave: polen, dieta, relación planta animal.

Abstract

We described a method to analyze pollen samples from nectarivore bats' hez. With this protocol is possible to extract the grain of pollen without strong chemicals and in a less time. We present the advantages this protocol has in front of conventional techniques used to carry out palynological analysis.

Key Word: pollen, diet, plant-animal relationship.

Introducción

El proceso de polinización es una interacción mutualista entre plantas y animales (PELLMYR, 2002), que involucra una serie de intereses a menudo conflictivos, en los que cada organismo busca obtener el máximo beneficio, por un costo mínimo (GUARIGUATA y KATTAN, 2002), un ejemplo clásico de esta relación son los

murciélagos que se alimentan de néctar, encontrando que más de 500 especies de plantas Neotropicales son polinizadas por estos mamíferos (RUMIZ y WOOD, 1995).

Un mecanismo utilizado para entender la relación existente entre plantas y animales es por medio análisis de muestras de polen (NATTERO *et al.* 2010), ya que los granos de polen presentan variaciones morfológicas diagnósticas en la identificación de muchos taxones a diferentes niveles de clasificación (familia, género y en algunos casos especie) (MERCADO-GÓMEZ *et al.*, 2011).; lo cual les ha permitido ser una herramienta fundamental para conocer la dieta de muchas especies animales (TSCHAPKA y DRESSLER, 2002).

En el siguiente estudio se describe un nuevo método para el análisis palinológico de muestras fecales, observando las posibles implicaciones de este tratamiento con referencia a las técnicas convencionales usadas en análisis copropalinológicos (ERDTMAN, 1986; THOMAS, 1988).

Tratamiento químico y físico de muestras coprológicas en heces de murciélagos

Una vez colectadas las muestras fecales se depositan en recipientes que contengan ácido acético (este reactivo puede ser reemplazado por vinagre casero, cuando no se tenga a la mano ácido acético industrial), como conservante ya que este químico elimina contaminantes y degradadores potenciales (hongos y algunas bases orgánicas) de los granos de polen; además por las características químicas de la capa celular (presencia de esporopolenina) los granos de polen son resistentes a ciertos ácidos.

Luego de almacenadas las muestras se procede al tratamiento físico y químico para conservar los granos de polen.

1. El material debe ser filtrado con una malla o tamiz de 200 micrones sobre un vaso de precipitado utilizando agua destilada; con el fin de descartar material vegetal de mayor tamaño al de los granos de polen.
2. El filtrado deberá ser depositado en tubos de ensayo (falcón) de 10 ml para ser centrifugados a 4500 rpm durante 5 minutos; finalizado el proceso el sobrenadante deberá ser descartado.

3. Seguidamente se adicionarán 5 ml de hidróxido de potasio (KOH) al 5% por 10 minutos dentro de los cuales la muestra deberá ser homogenizada (vortex o laminas de vidrio); de igual forma durante este periodo la mezcla de granos de polen mas el KOH deberá ser calentada en baño de maría a una temperatura d 60°C por 5 minutos; evitando constantemente la evaporación del material (dado el caso que la muestra se evapore, el volumen será completado con agua destilada).
4. Nuevamente el material deberá ser centrifugado a 4500 rpm durante 5 min; finalizado el proceso el sobrenadante debe ser desechado.
5. Posteriormente, las muestras deben ser lavadas con agua destilada y para concentrar los granos el material se centrifugará a 4500 rpm durante 5 min; finalizado esta fase se descarta el sobrenadante. Este proceso se llevará a cabo 3 veces, con el fin de eliminar el hidróxido de potación, ya que la esporopolenina puede ser fácilmente degradada por agentes oxidantes, por tanto, un mal lavado llevaría a la destrucción posterior de las muestras de polen.
6. En este punto es importante montar una gota del material lavado al microscopio para observar el estado de los granos de polen. En el caso de de observar granos con presencia de protoplasma, se hace necesario someter las muestras a KOH en baño de maría. En caso de no hallar granos de polen el proceso finalizara. Si al observar los granos estos carecen de protoplasma, es posible continuar con el tratamiento.
7. Posteriormente, se deben adicionar de 3 a 5 ml de alcohol etílico (95%) para asegurar la remoción del KOH en la ; finalizado el proceso el sobrenadante deberá ser descartado.
8. Seguidamente las muestran deben ser embazadas en tubos plásticos de 2ml (tubos eppendorf), que al mimos tiempo deben ser introducidos en un tubo nodriza (tubo falcón de 10 ml que sirve de base para el tubo pequeño), y centrifugar durante 5 minutos a 4500 rpm, desechando el sobrenadante al final del proceso. Para una mejor limpieza, se recomienda repetir este proceso al menos dos veces más.
9. Los tubos de 2 ml deben ser extraídos (pinza), desechando el sobrenadante y adicionando dos gotas de glicerina a cada tubo (la glicerina permite que los granos queden suspendidos y sea mejor su observación al microscopio).
10. Finalmente las muestras deberán ser llevadas al horno durante 12 horas a 30 °C, para evaporar el alcohol suspendido en la glicerina.

Discusión

La implementación de este método, evita que los granos de polen sean sometidos a ácidos fuertes, como el sulfúrico y el anhídrido acético comúnmente utilizados en otras técnicas (ERDTMAN, 1986) que pueden destruir los granos de polen de exina delgada, como algunas especies de Melastomataceae (MERCADO-GÓMEZ *et al.*, 2007), Lauraceae (MERCADO-GÓMEZ, en prep) Heliconiaceae (SANABRIA *et al.*, 2007) entre otras. Por otra parte se debe tener en cuenta que los granos han sido sometidos a los ácidos estomacales, los cuales han degradado y absorbido en parte el protoplasma y la intina, de esta manera, queda solo la exina expuesta y disminuye la necesidad de usar ácidos corrosivos.

Utilizando el método presentado en este estudio se elimina la posibilidad de destruir los granos de polen; no obstante las estructuras quedan intactas y perfectamente identificables (PUNT *et al.*, 2007) al igual que en la acetólisis de ERDTMAN (1986).

Otro de los métodos usados en análisis de dietas de murciélagos nectarívoros, es la observación al natural (RAMIREZ, 2004; RIVERA-MARCHAND y ACKERMAN, 2006; TSCHAPKA, 2003; TSCHAPKA y DRESSLER, 2002), en el cual las diferentes estructuras morfológicas de los granos de polen son poco visibles, por el exceso de protoplasma, eliminando la posibilidad usar claves palinológicas estándares. Este tipo de técnicas, obliga al investigador a realizar colección de referencia de la vegetación circundante aumentando el tiempo de muestreo; por tanto la implementación de este método permitirá al investigador eliminar la colección de referencia y el posible uso de claves locales para la identificación taxonómica de las especies consumidas por la fauna estudiada.

Finalmente, es importante tener en cuenta que este método está diseñado para muestras coprológicas de vertebrados polinizadores, ya que para insectos se recomienda el uso de la acetólisis como una mejor estrategia para la observación y descripción de los granos de polen.

Referencias

ERDTMAN, G. 1986. *Pollen and plant taxonomy Angiosperms*. New York: Hafner Publ. Co. USA.

GUARIGUATA, M.; KATTAN, G. 2002. Interacciones planta-animal. Págs. 433. En: GUARIGUATA, M.; KATTAN, G. (Eds.). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. editorial LUR, Costa Rica.

MERCADO-GÓMEZ, J.; SOLANO, L.; SANCHEZ, L. 2007. Morfología polínica de especies pertenecientes a 5 géneros de Melastomataceae para Pamplona Colombia. *Bistua* 5(1):71-86.

MERCADO-GÓMEZ, J.D.; JIMÉNEZ-BULLA, L.C.; SÁNCHEZ-MONTAÑO, L.R. 2011. Polen de las Magnoliopsida en el Volcán -Pamplona (Colombia) I: familias Apiaceae, Asteraceae, Cunoniaceae, Ericaceae, Fabaceae y Gentianaceae. *Caldasia* 33(2):619-635.

NATTERO, J.; COCUCCI, A.A.; MEDEL, R. 2010. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* 23(9):1957-1968.

PELLMYR, O. 2002. Pollination by animals. Págs. 500. En: HERRERA, C.M.; PELLMYR, O (Eds.). *Plant - animal interactions an evolutionary approach. vol. 1*. Blackwell Science Ltd, Victoria.

PUNT, W.; HOEN, P.P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 143 (1-2):1-81.

RAMIREZ, N. 2004 Pollination specialization and time of pollination on a tropical Venezuelan plain: variations in time and space. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145(1):1-16.

RIVERA-MARCHAND, B.; ACKERMAN, J.D. 2006. Bat Pollination Breakdown in the Caribbean Columnar Cactus *Pilosocereus royenii*. *Biotropica* 38(5):635-642.

RUMIZ, D.; WOOD, R. 1995. Importancia Ecológica de los murciélagos. *Boletín BOLFOR* N° 3. Bolivia.

SANABRIA, M.E.; MACIEL, N.; CUMANA, L.J.; DELGADO, R.E. 2007. Estudio del grano de polen en especies del genero *Heliconia* L. bajo el microscopio óptico. *Rev. Fac. Agron.* 24:22-33.

THOMAS, D.W. 1988. Analysis of diets of plant - visiting bats. Págs. 533. En: KUNZ, T.H. (Ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats. vol. 1*. Smithsonian institution. Washington, USA.

TSCHAPKA, M. 2003. Pollination of the understory palm *Calyptranthes ghiesbreghtiana* by hovering and perching bats. *Biological Journal of the Linnean Society* 80:281-288.

TSCHAPKA, M.; DRESSLER, S. 2002. Chiropterophily: on bat-flowers and flowers bats. *Royal botanic gardenes Kew* 1:114-125.