

# METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN Y ANÁLISIS PALINOLÓGICO DE MUESTRAS DE INSECTOS POLINIZADORES

## METHODOLOGY OF PREPARATION AND PALYNOLOGICAL ANALYSIS OF POLLINATING INSECT'S SAMPLES

Leila Eliana Rocha<sup>1\*</sup>, Ana Carina Sánchez<sup>1</sup> y María Inés Zamar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), Universidad Nacional de Jujuy - CONICET, Laboratorio de Análisis Palinológicos, Facultad de Ciencias Agrarias. Alberdi 47, C.P. 4600, S. S. de Jujuy, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto de Biología de la Altura (INBIAL), Universidad Nacional de Jujuy. Avenida Bolivia 1661, C.P. 4600, S.S. de Jujuy, Argentina.

\*Autor para correspondencia:

lalei344@gmail.com

Período de Publicación:

Junio 2024

Historial:

Recibido: 11/12/2023

Aceptado: 05/02/2024

### RESUMEN

Los insectos son los principales referentes de la polinización biótica de las angiospermas en el mundo. El polen es una de las recompensas ofrecidas a los polinizadores y su abordaje permite determinar qué especies florales proveen este recurso como alimento, y al mismo tiempo, son polinizadas. La palinología es la disciplina dedicada al estudio del polen y puede ser aplicada para analizar el transporte polínico en insectos. En esta nota, presentamos una metodología de preparación de muestras procedentes de insectos polinizadores, previa a los tratamientos de la remoción química y la acetólisis.

**Palabras clave:** acetólisis, Entomopalinología, polinización

### SUMMARY

Insects are the main references of biotic pollination of angiosperms in the world. Pollen is one of the rewards offered to pollinators and its study allows determining which species provide this resource as food and, at the same time, are pollinated. Palynology is the discipline dedicated to the study of pollen and can be applied to analyze pollen transport in insects. In this note, we present a methodology for the preparation of samples from pollinators insects, prior to chemical removal and acetolysis treatments.

**Keywords:** acetolysis, Entomopalynology, pollination

## INTRODUCCIÓN

La polinización es la transferencia de polen viable desde las anteras (órgano masculino de la flor) al estigma (órgano femenino) y puede ocurrir en la misma flor o entre flores diferentes (Peña, 2003). Además del viento o del agua, esta transferencia es realizada por animales, principalmente insectos, quienes polinizan el 67% de las plantas de dispersión zoófila (Bonilla Gómez, 2016).

El polen como alimento proporciona cerca del 20% de los carbohidratos que necesitan y el total de proteínas (Ricou, Schneller, Amiaud, Plantureux & Bockstaller, 2014). Los polinizadores, particularmente las abejas (Hymenoptera, Apoidea), se destacan por el hábito de remover y transportar grandes cantidades de polen (Nates-Parra, 2005). Como elemento de estudio, el polen representa la flora y puede ser útil en muchas disciplinas; no se deteriora fácilmente y es un marcador natural (Jones & Jones, 2001). En este contexto de la polinización, el polen puede ser analizado para determinar qué especies florales son forrajeadas y polinizadas, al mismo tiempo.

Para el análisis polínico, se ha contado desde su aparición con la técnica de acetólisis de Erdtman (1960) que consiste en el tratamiento del polen con la mezcla acetolítica de anhídrido acético: ácido sulfúrico; la acetólisis elimina el contenido celular y queda expuesta la exina, la cubierta del polen que está provista de un conjunto de cualidades morfológicas visibles al microscopio que hacen posible su identificación taxonómica (Méndez, 2014). Recientemente, Caccavari & Cilla (2010) propusieron una técnica de desprendimiento del polen con hidróxido de potasio (KOH), denominada remoción química; que extrae el polen acopiado en las corbículas<sup>1</sup> o escopas<sup>2</sup> de las abejas. Según las autoras, esta técnica puede ser suficiente para el reconocimiento de los caracteres del polen, o complementarse con la acetólisis, dependiendo de si es necesario o no un reconocimiento taxonómico más preciso de los tipos polínicos.

A pesar de las ventajas de ambas técnicas, sus efectividades se comprobaron sólo en abejas y no en otros grupos de insectos polinizadores. Dado que los insectos son diversos en formas y tamaños, no existe una metodología estándar de preparación y obtención de muestras de dichos insectos. En este sentido, presentamos una metodología de preparación de muestras procedentes de insectos polinizadores, propuesta y aplicada por primera vez por Rocha (2019), con la aplicación de las técnicas de remoción química (Caccavari & Cilla, 2010) y acetólisis (Erdtman, 1960).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar esta metodología se contaron con visitantes florales colectados de un cultivo de *Fragaria x ananassa* Duch. "frutilla", en la Finca Fernández, localidad de Las Pampitas, El Carmen, Jujuy. Los visitantes pertenecían a los órdenes Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera y Hemiptera y se obtuvieron mediante técnicas de captura activa (observaciones directas, transectas) y pasiva (trampas de caída o *bee bowls*). Para su conservación, se colocaron en frascos con alcohol al 70% y se depositaron en la colección entomológica "Dra. Lilia Estela Neder" del Instituto de Biología de la Altura (INBIAL) de la Universidad Nacional de Jujuy, para su posterior identificación taxonómica. Los visitantes florales más frecuentes fueron *Apis mellifera* L. "abeja melífera", cuyos ejemplares presentaban restos de cargas corbiculares (Figura 1A y B) y *Allograpta exotica* Wiedemann "mosca de la flor" (Figura 1C). También se destaca la presencia de visitantes florales nativos como *Plebeia catamarcensis* Holmberg, una abeja nativa sin aguijón (Meliponini) (Figura 1D).

<sup>1</sup>Pequeña área cóncava y lisa en las extremidades posteriores de las abejas corbiculadas (por ejemplo, Apini, Meliponini) rodeada por un borde de pelos y destinada a la colecta de polen o resina. Sólo las hembras presentan corbículas.

<sup>2</sup>Zona densamente pilosa en las extremidades posteriores de abejas no corbiculadas (por ejemplo, Eucerini, Xylocopini) o en otras partes del cuerpo, como el abdomen en las abejas de la familia Megachilidae.



**Figura 1.** Visitantes florales frecuentes de *Fragaria x ananassa* colectados en la Finca Fernández, Las Pampitas, El Carmen, Jujuy. A: *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae); B: Corbícula de *Apis mellifera* con carga polínica; C: *Allograpta exotica* (Diptera, Syrphidae); D: *Plebeia catamarcensis* (Hymenoptera, Apidae).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Preparación y categorización de las muestras de insectos polinizadores

Todos los insectos deben identificarse hasta el nivel taxonómico más preciso posible. Para su análisis, la muestra puede estar constituida por uno o más ejemplares de la misma especie o taxón, la elección dependerá del objetivo de estudio. En ambos casos, no deben incluirse ejemplares de otras especies o taxa, ya que se busca preservar el polen en la muestra y no contaminarlo.

Los insectos difieren en dimensiones y formas. Si se desea analizar el tracto digestivo, se debe diseccionar el o los ejemplares de una longitud igual o superior a 1 cm, con ayuda de pinza, aguja histológica y microscopio estereoscópico. La extracción también puede efectuarse desprendiendo la cabeza con mucho cuidado. Por otra parte, si se desea analizar las partes externas, estas pueden diferenciarse en cabeza, tórax, abdomen y extremidades (patas anteriores, medias y posteriores). De esta manera, las muestras se categorizan según el esquema que se presenta en Figura 2:

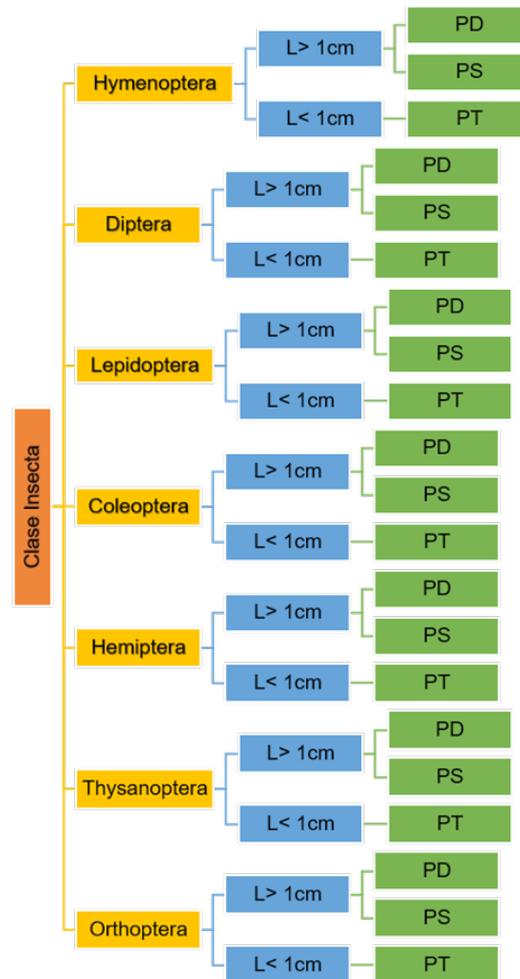
*Polen digestivo (PD)*: referente al polen que se halla en el tracto digestivo del o los ejemplares.

*Polen superficial (PS)*: referente al polen presente en las partes externas del o los ejemplares (cabeza, tórax, abdomen, y extremidades).

Para los ejemplares con una longitud inferior a 1 cm, la disección puede tornarse dificultosa, así que es más simple analizar todo el polen presente. En ese caso, las muestras pueden categorizarse como:

*Polen total (PT)*: referente a la totalidad de polen, tanto digestivo como superficial.

Una vez categorizadas las muestras, éstas se colocan en tubos de centrífuga de 10 cm<sup>3</sup>.



**Figura 2.** Esquema metodológico de la preparación y obtención de muestras de insectos para el procesamiento de polen.

### Remoción del polen y acetólisis

A continuación, se aplica la técnica de remoción química (Caccavari & Cilla, 2010):

1. Agregar KOH a los tubos de centrífuga que contienen las muestras de PD y PS o PT. Posteriormente, llevarlas a calentar a baño María a 50°C aproximadamente, durante 10 min. Para que se desprendan los granos de polen, presionar suavemente las estructuras del o los ejemplares con varillas de vidrio. Finalizado el tiempo, retirar las muestras y dejarlas enfriar.

2. Retirar con una pinza los restos de las muestras PS o PT. Si es necesario, emplear un tamiz para filtrar dichos restos y verter todo el contenido en un vaso precipitado y de este a cada tubo de centrífuga, utilizando mínimamente agua destilada para cortar el efecto del KOH. Repetir el procedimiento para cada muestra. A continuación, llevar los tubos a la centrifugadora a 3.100 rpm por 5 min. De ese modo, los granos de polen se concentrarán en el fondo de cada tubo. Tras la centrifugación, eliminar los sobrenadantes de las muestras (la fase líquida que se halla por encima de los granos de polen).

3. Aplicar la técnica de acetólisis, siempre bajo campana de extracción de gases:

3a) Lavar las muestras con ácido acético glacial, para deshidratar el residuo. Homogeneizar cada mezcla con la misma varilla de vidrio empleada para la remoción química y llevar a centrifugación (3.100 rpm, 5 min). Eliminar el sobrenadante.

3b) Incorporar en cada tubo la mezcla acetolítica: anhídrido acético y ácido sulfúrico (proporciones 2,25 cm<sup>3</sup>: 0,25 cm<sup>3</sup>, respectivamente). Primero se incorpora el anhídrido acético y luego, con mucho cuidado, el ácido sulfúrico. Homogeneizar cada mezcla para evitar la destrucción de los granos de polen y llevarlas luego a baño María por 10 min a 50°C. Finalizado el tiempo, retirarlas y dejarlas enfriar. Posteriormente, centrifugarlas (3.100 rpm, 5 min) y eliminar los sobrenadantes.

4. Lavar las muestras con ácido acético una vez, para cortar la acetólisis. Homogeneizar, centrifugar y eliminar los sobrenadantes.

5. Lavar una o dos veces las muestras con agua destilada, para eliminar los restos de todos los reactivos utilizados. Homogeneizar, centrifugar y eliminar los sobrenadantes.

6. Traspasar con micropipetas los granos de polen obtenidos a tubos Eppendorf. Agregar a cada tubo Eppendorf dos o tres gotas de glicerina que conserva el polen a través del tiempo, permitiendo su montaje y observación al microscopio.

Esta metodología de preparación y análisis palinológico se aplicó por primera vez en ejemplares de los órdenes Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera y Coleoptera (Figura 2). La información obtenida de las observaciones microscópicas se cuantificó como abundancia y frecuencia polínicas, las cuales permitieron estimar a los potenciales polinizadores de la frutilla y, además, dilucidar las diversas interacciones de los polinizadores con otras especies florales del lugar.

En cuanto a las técnicas aplicadas, la remoción química demostró que también es efectiva para otros insectos, facilitando el desprendimiento de los granos de polen (Caccavari & Cilla 2010). Por su parte, la acetólisis resultó eficiente para la observación, identificación y descripción de los granos de polen (Mercado & Pérez 2013). Si bien, otras metodologías de análisis palinológico no emplean la acetólisis por su alto poder corrosivo (Dafni, Kevan & Husband, 2005; Carabalí-Banguero, Montoya-Lerma & Carabalí Muñoz, 2020), el uso de la acetólisis no implica un gran esfuerzo o experiencia del investigador para distinguir con precisión los caracteres taxonómicos (Mercado & Pérez 2013).

## CONCLUSIONES

La metodología propuesta de preparación y análisis de polen constituye una herramienta fundamental para el estudio del polen asociado a los polinizadores como abejas y otros insectos que no son reconocidos como tal. Junto con las técnicas aplicadas, permiten un análisis y procesamiento más ordenados de las muestras que se quiere estudiar. Con esta metodología, la palinología se complementa a los estudios de polinización por dos motivos: al estimar a los polinizadores de un determinado cultivo y al determinar qué otras especies florales son beneficiadas con este servicio ecosistémico.

## AGRADECIMIENTOS

A los proyectos PUE 22920170100027CO (INECOA CONICET JUJUY), A/192 y F/0026 (SeCTER-UNJu). Al Laboratorio de Análisis Palinológicos de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA-UNJu), por facilitar la realización del trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

Bonilla Gómez, M.A. (2016). El servicio ecosistémico de polinización prestado por las abejas. En: *Iniciativa colombiana de polinizadores (ICPA) Capítulo Abejas*. Ed. MG. Nates Parra. Departamento de Biología.

Universidad Nacional de Colombia. pp. 41-58.

Caccavari, M. & Cilla, G. (2010). Remoción química como nueva alternativa a la remoción mecánica para el estudio del polen transportado en las escopas de abejas silvestres. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, n.s., 12(2): 255-262.

Carabalí-Banguero, D., Montoya-Lerma, J. & Carabalí-Muñoz, A. (2020). Cargas polínicas en entomofauna visitante floral de *Persea americana* (Lauraceae) cv. Hass. *Caldasia*, 42(1): 105-114.

Dafni, A., Kevan, P.G. & Husband, B.C. (2005). Plant-pollinator interface. En: *Practical Pollination Biology*. Eds. A. Dafni, P.G. Kevan & B.C. Husband. Cambridge, Ontario, Canada pp. 329-400.

Erdtman, G. (1960). The Acetolysis Method, a revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 54: 561-564.

Jones, G.D. & Jones, S.D. (2001). The uses of pollen and its implication for entomology. *Neotropical Entomology*, 30: 341-350.

Méndez, M.V. (2014). Recursos nectaríferos y poliníferos utilizados por *Apis mellifera* L. en la localidad de Tilquiza, Jujuy, Argentina. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy.

Mercado, J. & Pérez, C.A. (2013). Una nueva metodología para el análisis palinológico de muestras coprológicas en vertebrados polinizadores. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1): 165-170.

Nates-Parra, M.G. (2005). Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 75: 7-20.

Peña, J.E. (2003). Insectos polinizadores de frutales tropicales: no solo las abejas llevan la miel al panal. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 69: 6-20.

Ricou, C., Schnell, C., Amiaud, B., Plantureux, S. & Bockstaller, C. (2014). A vegetation based indicator to assess the pollination value of field margin flora. *Ecological Indicators*, 45: 320-331.

Rocha, L.E. (2019). Insectos polinizadores en el cultivo de *Fragaria x ananassa* Duch. en Las Pampitas, El Carmen, Jujuy. Tesina de Grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy.