

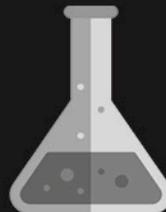
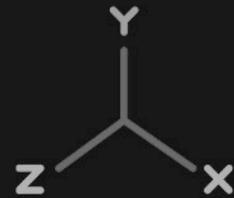


10

CIENCIA EN
CONSTRUCCIÓN



AÑOS



ESTANDARIZACIÓN DE LA ACETÓLISIS DE ERDTMAN (1969) PARA EL ANÁLISIS PALINOLÓGICO DE MUESTRAS FECALES DE MURCIÉLAGOS POLINIZADORES (Phyllostomidae: Glossophaginae – Lonchophyllinae).

STANDARDIZATION OF ERDTMAN ACETOLYSIS (1969) FOR THE PALINOLOGICAL ANALYSIS OF FECAL SAMPLES OF POLLINATING BATS (Phyllostomidae: Glossophaginae - Lonchophyllinae).

Kevin González Gutiérrezl ; Hilda R. Mosquera Mosquerall

I Grupo de Investigación en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué.

II Docente tiempo completo, Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en Genética y Biotecnología Vegetal y Microbiana, Universidad del Tolima – GEBIUT – Ibagué.

*kevingg2010@gmail.com

RESUMEN

Las investigaciones dirigidas al análisis de la interacción murciélago polinizador-planta, requieren de la visualización de los granos de polen para su determinación taxonómica, por medio de técnicas palinológicas que permitan una mejor observación de características morfológicas de los granos de polen, para así precisar sobre la eficiencia de esta interacción. Entre las técnicas comúnmente empleadas para el análisis palinológico están las técnicas corrosivas (Acetólisis de Erdtman) y las no corrosivas (Montaje al Natural y KOH), las cuales se emplean para el procesamiento de los granos de polen extraídos directamente de las flores o sedimentos. Por lo tanto, el presente trabajo propone la estandarización de la técnica de acetólisis como nueva metodología para el análisis palinológico de muestras colectadas en heces fecales de murciélagos.

Para evaluar su efectividad, se comparó esta técnica con otras utilizando muestras de polen de *Ochroma pyramidale* y *Bauhinia variegata*. Se evaluaron aspectos como: nitidez del polen, grosor de la exina, ornamentación, limpieza, adelgazamiento de las paredes y observación de las aperturas. Los resultados revelaron que las técnicas corrosivas (Estandarización y Acetólisis de Erdtman) tuvieron la mejor nitidez y limpieza de los granos de polen frente las técnicas no corrosivas. Esta estandarización se considera la mejor técnica, debido al poco tiempo que se emplea en el procedimiento y a la gran limpieza y adelgazamiento de la exina de los granos de polen, otorgada por los dos baños de ácido acético glacial, mejorando la nitidez y facilitando la determinación taxonómica por la óptima observación de los caracteres.

Palabras clave: Acetólisis, KOH, montaje al natural, murciélagos, polen.

ABSTRACT

Research directed at the analysis of the pollinator-plant bat interaction requires the visualization of the pollen grains for their taxonomic determination, using palynological techniques that allow a better observation of the morphological characteristics of the pollen grains, in order to specify the efficiency of this interaction. Among the techniques commonly used for the palynological analysis are the corrosive (Erdtman Acetolysis) and non-corrosive techniques (Natural mounting and KOH), which are used for the processing of pollen grains extracted directly from flowers or sediments. Therefore, the present work proposes the standardization of the technique of acetolysis as a new methodology for the palynological analysis of samples collected in feces of bats. To evaluate its effectiveness, this standardization was compared to other techniques using pollen samples from *Ochroma pyramidale* and *Bauhinia variegata*.

Aspects such as: pollen sharpness, exine thickness, ornamentation, cleaning, thinning of walls and observation of openings were evaluated. The results revealed that the corrosive techniques (Erdtman's Standardization and Acetolysis) had the best sharpness and cleanliness of pollen grains against non-corrosive techniques. Standardization is considered the best technique, due to the short time used in the procedure and the great cleaning and thinning of the pollen grain exine, given by the two washes of glacial acetic acid, improving the sharpness and facilitating the determination Taxonomic for the optimal observation of the characters.

Keywords: Acetolysis, KOH, bats, pollen.

1. Introducción

Se ha documentado ampliamente que los murciélagos Polinívoros-nectarívoros son uno de los grupos polinizadores con mayor eficacia por encima de otros visitantes florales, favoreciendo una mayor producción de frutos, especialmente de plantas que florecen en horas crepusculares (Fleming & Muchhala, 2008). El proceso mutualista murciélago-planta es denominado "Quiropterofilia" el cual es un fenómeno gasto – beneficio, donde las plantas exhiben sus flores para atraer a los murciélagos por rasgos que han coevolucionado con la polinización nocturna (Bawa, 1990), características por las cuales los murciélagos son atraídos y permite de esta manera ejercer la función de vectores de polen en este proceso, adquiriendo como beneficios del néctar azúcares y del polen aminoácidos, proteínas y lípidos (Amorim, Galetto & Sazima, 2013; Proctor, Peter & Lack, 1997).

Para la evaluación de las interacciones quiropterofílicas se han empleado diferentes técnicas como la extracción de polen directamente del pelaje con cubos de glicero-gelatina (Muchhala & Jarrín, 2002) y la separación de granos de polen con el uso de un pincel y el montaje directo con glicerina (Singaravelan & Marimuthu, 2004), las técnicas anteriores se emplean comúnmente para estudios de coevolución e interpretación del uso de regiones del cráneo de los murciélagos para la polinización, sin embargo, para evaluar la eficiencia del polinizador se sugieren técnicas químicas, a razón de que la cantidad de polen encontrado en el pelo no hace referencia a que el murciélago sea polinizador potencial, debido a que los murciélagos polinizadores tienen actividades de visitante floral ocasional pero no permanente en algunas plantas (Bawa, 1990),

por lo tanto, la colecta de muestras fecales de murciélagos polinizadores se hace necesario para evaluar esta interacción. Otro motivo por el cual se considera buena la aplicación de técnicas químicas, es que con el uso de éstas, los granos de polen se pueden visualizar al microscopio con mayor facilidad y así obtener la determinación taxonómica con mayor precisión. Las técnicas químicas permiten la eliminación del protoplasma y la degradación de las paredes del grano de polen para visualizar la geometría de los mismos para la determinación taxonómica (Fonnegra, 2005), lo cual no es tan sencillo cuando se hace con la técnica de montaje y observación al natural en la que no se aplica ningún tratamiento.

Existen dos tipos de técnicas químicas usadas en el análisis del polen: Las altamente corrosivas (acetólisis) y las levemente corrosivas (KOH). Para el caso del procesamiento de muestras fecales o estomacales con contenidos polínicos, se ha recomendado el (KOH) para evitar la destrucción de los granos de polen por exceso de corrosividad, debido a que los granos al pasar por el tracto digestivo se ven sometidos a ácidos gástricos destruyendo las paredes, por lo tanto, se hace necesario técnicas que no destruyan más los granos de polen (Mercado & Pérez, 2013). Otra técnica empleada es la acetólisis de Erdtman (1969), considerada altamente corrosiva y por lo general es muy empleada en los estudios paleopalinológicos y palinotaxonómicos; esta técnica es muy efectiva debido a que facilita la degradación de la intina y el protoplasma del grano de polen; permaneciendo solamente la pared externa de esporopolenina (exina). Con esta técnica, dicha pared se vuelve transparente, permite el paso de la luz, facilitando la observación de los detalles de estructura y escultura de la misma (Fonnegra, 2005). La mayoría de los granos de polen poseen exina gruesa, por lo que la aplicación de la técnica de procesamiento adecuada, favorece una mejor observación y análisis de la muestra polínica por lo tanto. El presente trabajo pretende comparar y describir los diferentes métodos para el análisis palinológico, para así definir la metodología más apropiada para muestras de polen asociadas a condiciones y características de muestras fecales y estomacales de murciélagos polinizadores.

2. Metodología

2.1. Colecta material Polínico

Para realizar la evaluación y comparaciones de las diferentes técnicas palinológicas procedentes de murciélagos, también se colectó material polínico directamente de plantas que comúnmente son polinizadas por murciélagos como lo fueron, *Ochroma pyramidale* (Kays et al., 2012; Heithaus, Fleming & Opler, 1975; Knudsen & Tollsten, 1995) y *Bauhinia variegata* (Heithaus, Opler & Baker, 1974; Lemke, 1985; Ramírez et al., 1984; Sosa & Soriano, 1996), cuyas flores fueron almacenadas en tubos falcon con alcohol al 70% para así proceder con la fase de laboratorio.

2.2. Procesamiento de las muestras de polen

Con el material de polen recolectado se procedió a realizar las técnicas de montaje al natural (Muchhala & Jarrín, 2002; Singaravelan & Marimuthu, 2004), técnica de KOH (Mercado & Pérez, 2013), acetólisis de Erdtman (1969) y estandarización del método de acetólisis propuesto por los autores. Estas dos últimas técnicas consisten en una hidrólisis ácida del material polínico, con la cual se degrada la intina y el protoplasma del grano del polen; solamente permanece la

pared externa de esporopolenina (Fonnegra, 2005). La estandarización de la acetólisis propuesta aquí, se aplicó a muestras fecales e intestinales provenientes de los murciélagos, *Glossophaga soricina* y *Glossophaga longirostris*, los cuales fueron capturados en el bosque seco tropical del departamento del Tolima – Colombia (González et al., 2015). A continuación se describe la metodología.

1. La materia fecal, muestra intestinal o granos de polen extraídos del pelaje de murciélagos polinizadores se revisan cuidadosamente usando pinzas, para separarlo de semillas o restos vegetales; seguidamente el material polínico es conservado en alcohol al 70% para proceder con la fase de laboratorio.
2. Cada muestra debe ser trasvasada a un tubo falcon (10ml) al cual se le debe agregar tres mililitros de ácido acético glacial por muestra durante 30 min, pasado el tiempo se centrifugara durante tres minutos a 3000 rpm y posteriormente se debe decantar.
3. Al material resultante, se le añade tres mililitros de mezcla acetolítica (1:9 ácido sulfúrico – anhídrido acético) y se lleva a baño de maría durante dos a tres minutos, agitándolo con una varilla de vidrio de manera precavida, seguidamente se centrifuga por 3 minutos a 3000 rpm y finalmente se decanta.
4. La muestra se lava con tres mililitros de ácido acético glacial se agita y se centrifuga a 3000 rpm durante tres minutos y se decanta.
5. El material polínico se lava con tres mililitros de alcohol al 70% a 3000 rpm, repitiendo el procedimiento dos veces más con alcoholes al 95% y 97%.
6. Los tubos falcón con las muestras de polen, se ubican en una gradilla en posición vertical, posteriormente se hace el montaje de cada muestra de forma semipermanente utilizando el método glicerogelatina fucsina, posteriormente las muestras pueden observarse al microscopio.

Para la conservación y montaje semipermanente de los granos de polen procedentes de muestras zoológicas, se sugiere hacer uso de la metodología del montaje Glicerogelatina-Fucsina (Kisser, 1935; citado por (Erdtman & Sorsa, 1971) por lo que se menciona la metodología de preparación:

Con el uso de una plancha de calor con agitador magnético se calientan 42 ml de agua destilada, se le añaden siete gramos de gelatina sin sabor comercial, 50 ml de glicerina y 20 ml de fucsina básica de ziehl, hasta conseguir una solución homogénea, posteriormente se deja solidificar a temperatura ambiente (Fonnegra 2005). Este método se emplea para conservar de forma semipermanente las muestras polínicas, adicionalmente el polen adquiere una coloración que permite la mejor observación de sus características morfológicas (ornamentación, grosor de la exina y aperturas).

Se obtuvieron registros fotográficos para facilitar la comparación de los resultados de cada técnica. Para evaluar la eficacia de cada una, se valoraron algunos aspectos cualitativos en la nitidez de la morfología de los granos de polen, teniendo en cuenta características como:

ornamentación, contorno exina, limpieza, traspaso de la luz a través de las paredes y observación de las aperturas (Fig. 1). Estas características fueron clasificadas como positivas o negativas, debido a que son las que se observan comúnmente para la determinación taxonómica (Fonnegra, 2005).

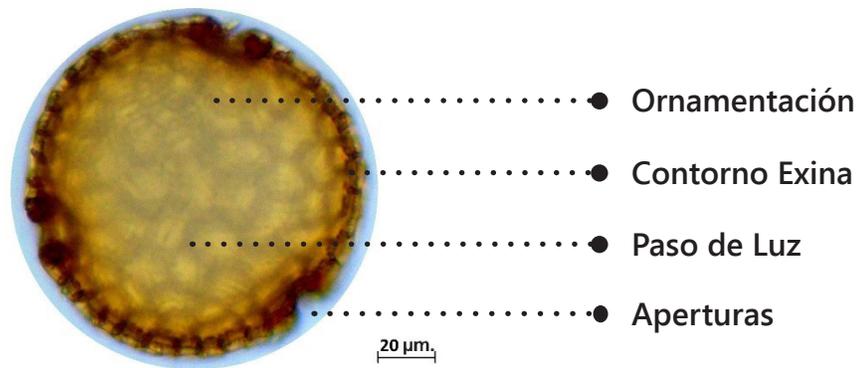


Figura 1. Estructuras a evaluar por calidad de nitidez en los granos de polen

3. RESULTADOS

3.1. Comparación de las técnicas palinológicas

A partir del uso de técnicas químicas corrosivas y no corrosivas se realizó el montaje de placas con muestras de polen de las especies *Ochroma pyramidale* (Tabla 1) y *Bahuinia variegata* (Tabla 2).

Tabla 1. Observación de las muestras de polen de *Ochroma pyramidale* bajo los protocolos de montaje al natural, KOH (Mercado & Pérez, 2013), acetólisis de Erdtman (1969) y estandarización de la acetólisis (Autores).

<i>Ochroma pyramidale</i>		
	Contorno Exina	Interior Exina
Montaje al natural	<p>20 µm</p>	<p>20 µm</p>

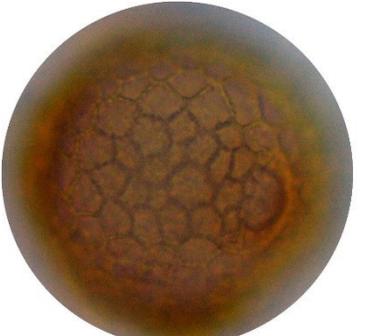
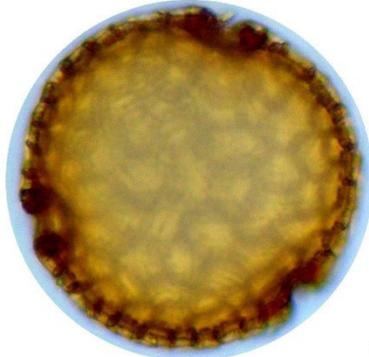
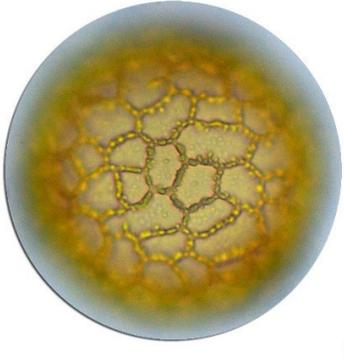
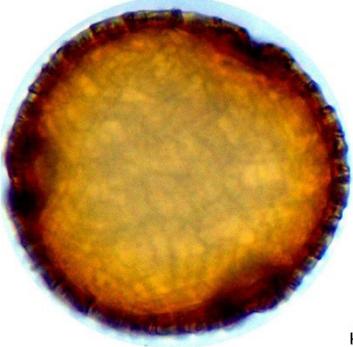
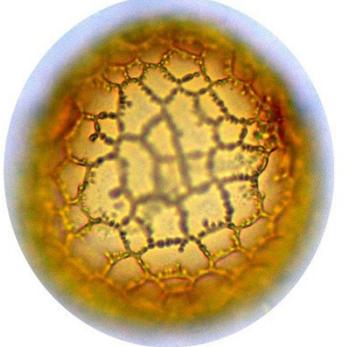
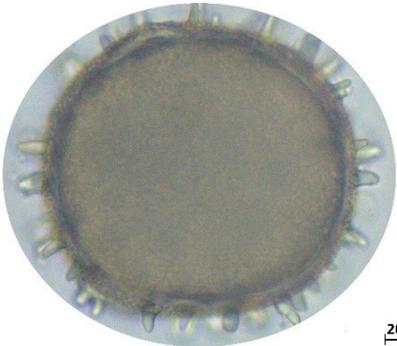
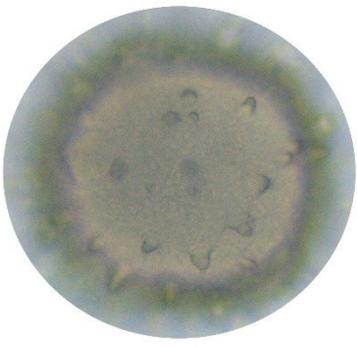
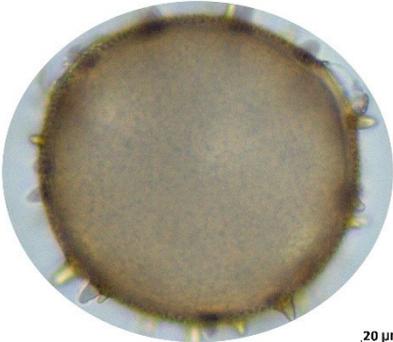
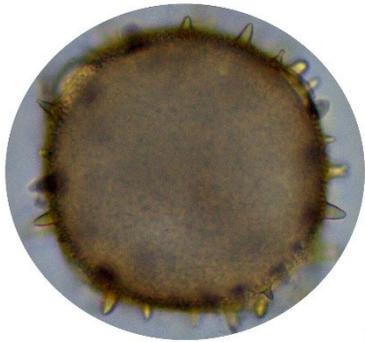
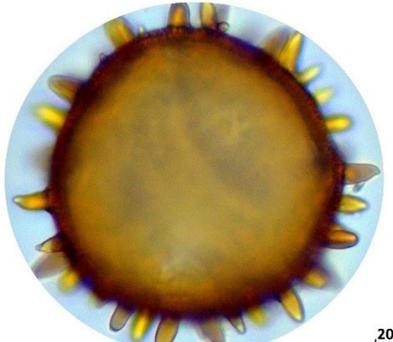
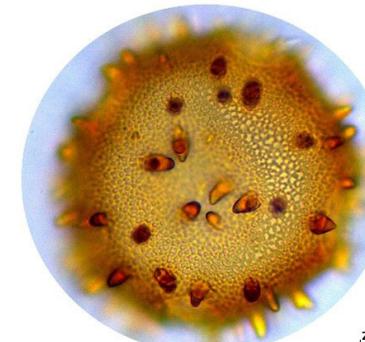
<i>Ochroma pyramidale</i>		
	Contorno Exina	Interior Exina
KOH (Mercado & Pérez, 2013)		
Acetólisis de Erdtman (1969)		
Estandarización Acetólisis (Autores)		

Tabla 2. Observación de las muestras de polen de *Bahuinia variegata* bajo los protocolos de montaje al natural, KOH (Mercado & Pérez, 2013), acetólisis de Erdtman (1969) y estandarización de la acetólisis (Autores).

<i>Bahuinia variegata</i>		
	Contorno Exina	Interior Exina
Montaje al natural		

<i>Bahuinia variegata</i>		
	Contorno Exina	Interior Exina
KOH (Mercado & Pérez, 2013)		
Acetolisis de Erdtman (1969)		

Con el uso de los registros fotográficos se realizó la comparación de las metodologías para el análisis de muestras procedentes de murciélagos polinizadores teniendo en cuenta el grosor de la exina, ornamentación, limpieza de la exina traspaso de la luz y observación de aperturas (Tabla 3), se observó que la *Acetolisis de Erdtman* (1969) y la estandarización de la Acetolisis (Autores), fueron las técnicas con mejor nitidez, debido a que se observa mucha entrada de luz, se ve con mucha claridad las capas de la exina, la ornamentación baculada para *Bahuinia variegata* y reticulada para *Ochroma pyramidale* con fácil percepción, en cuanto a las otras técnicas como KOH (Mercado & Pérez, 2013) se observaron las características deseadas, sin embargo, se evidencia la poca eliminación del contenido protoplasmático permitiendo poca entrada de luz y a su vez no se eliminan los residuos presentes en la exina del polen, al igual que para el montaje al natural aunque con mayor opacidad y mayor cantidad de contenido protoplasmático, que no permite una observación clara ni deseada del material polínico.

Tabla 3. Valoración de la eficacia de las técnicas Montaje al Natural, KOH (Mercado & Pérez, 2013), Acetolisis de Erdtman (1969) y Estandarización de la Acetolisis (Autores) en las muestras de polen de *Bahuinia variegata* y *Ochroma pyramidale*.

Nitidez	Montaje al natural	KOH (Mercado & Pérez, 2013)	Acetolisis Erdtman (1969)	Estandarización Acetolisis (Autores)
Contorno Exina	-	+	+	+
Ornamentación de la Exina	+	+	+	+
Limpieza de la Exina	-	-	+	+
Entrada de la Luz	-	-	+	+
Aperturas	-	-	+	+

4. DISCUSIÓN

4.1. Técnicas no corrosivas

El montaje al natural es una técnica que se considera obsoleta desde la aparición de la técnica de acetolisis, es comúnmente empleada para el montaje de granos de polen frescos extraídos directamente de las flores o en algunos casos en los montajes de muestras aeropalinológicas, sin embargo, no es un método muy adecuado cuando los granos de polen son de exina muy gruesa, debido a que no se produce la poca limpieza de las paredes del polen, lo cual dificulta la observación de los caracteres de los granos de polen, por lo tanto, siempre se recomienda el uso de técnicas químicas para el montaje de muestras de polen (Erdtman, 1969) ya sean para el análisis palinológico de muestras botánicas o para el recolectado de polinizadores.

La técnica de KOH comúnmente empleada para muestras de granos de polen fósiles (Van der Hammen, Noldus, & Salazar, 2003; Ibarra-Morales & Fernández-Galán, 2012), es una herramienta muy apropiada para muestras de polen que han sido sometidas a una alta exposición al medio ambiente, que hace que sus paredes se vuelvan frágiles, como ocurre con las muestras de polen sedimentadas (palinomorfos), por ello, para el análisis de este tipo de muestra se recomienda procedimientos menos fuerte como la técnica de KOH, la cual no elimina completamente la intina ni el contenido celular, lo que hace difícil la observación de los detalles de estructura y escultura de la pared (Fonnegra, 2005), no obstante, se ha considerado que la técnica KOH es la más apropiada para el análisis palinológico en vertebrados debido a que evita que los granos de polen sean sometidos a sustancias químicas fuertes como el ácido sulfúrico y el anhídrido acético, que pueden destruir los granos de polen de exina delgada (Mercado & Pérez, 2013). Pero, pese a que estos autores prescinden de esta técnica por temor a la destrucción del grano de polen por la acción corrosiva, se requeriría de una manipulación desmedida para que esto ocurriese, ya que según Anero et al., (2008) la exina es la capa más externa y más resistente de la pared del grano de polen, su resistencia a la destrucción es una de las mayores del reino vegetal, ya que soporta la acción de los ácidos y bases concentradas, así como el calentamiento hasta 300°C, siendo únicamente alterada por algunos oxidantes y por ciertos microorganismos.

Además, las muestras fecales de murciélagos contienen granos de polen frescos extraídos directamente de la planta por el murciélago y probablemente la acción de los jugos gástricos, más que destruir las paredes (intina y exina), ayudan en la limpieza de las mismas, consecuentemente se hace necesario de una técnica más corrosiva que la que ejerce el KOH, para adelgazar las paredes y visualizar mejor las características morfológicas que permiten determinar taxonómicamente el tipo polínico estudiado.

4.2. Técnicas Corrosivas

La acetólisis de Erdtman es la técnica más empleada para el aislamiento y preparación de los granos de polen extraídos directamente de las plantas (Fernandez-Pacella, 2014; Rocha Estrada et al., 2014) y de muestras fecales de vertebrados (Maguiña, Amanzo & Huamán, 2012; Vallejo, 2014; Amaya-Márquez, Stiles & Rangel-Ch, 2001) para la visualización con mayor efectividad, debido a que se emplean ácidos altamente corrosivos como el ácido acético glacial puro, ácido sulfúrico puro y anhídrido acético puro, que permiten la eliminación de estructuras que impiden ver las estructuras de interés (Forma del grano, ornamentación, aperturas y grosor de la exina) para la determinación taxonómica convencional de los granos de polen (Fonnegra, 2005), de esta manera, se sugiere la presente técnica como herramienta práctica y precisa para el procesamiento de los granos de polen provenientes de la dieta de murciélagos polinívoros (Glossophaginae y Lonchophyllinae), debido que esta estandarización de la técnica del acetólisis de Erdtman (1969) solamente se ha empleado con murciélagos (González et al., 2015) con las condiciones ambientales ofrecidas por el tracto digestivo de estos organismos, haciendo de esta técnica apropiada para evitar la degradación total intina y adelgazamiento de la exina de los granos de polen, lo que facilita la visualización de las características de los granos de polen.

4.3. Ventajas y desventajas del uso de las técnicas.

4.3.1. KOH (Mercado & Pérez, 2013).

Esta técnica considerada apropiada para el análisis palinológico de muestras sedimentadas y muestras fecales de vertebrados, requiere de la ejecución de por lo menos 9 procedimientos y más de un día para su procesamiento, con la ventaja de que utiliza menor cantidad de sustancias químicas por lo que resulta más económica que las demás metodologías usadas para el análisis palinológico, no obstante, esta técnica se hace tediosa debido a que cuenta con pasos que ralentizan el proceso, como lo es la verificación continua del estado de limpieza de los granos, esto hace repetir pasos ya realizados y aumentar el tiempo de la metodología, además, las muestras son reenvasadas y filtradas, lo cual podría generar contaminación o pérdida de material polínico; finalmente, en esta metodología se emplea un horno durante 12 horas que hace aún más largo el tiempo para el procesamiento palinológico. No obstante, existen ventajas con esta técnica al compararla con la metodología de montaje al natural, ya que la pared sufre un leve adelgazamiento y la eliminación de partículas adheridas a la exina, esto permite el paso de la luz y la mejor observación de los caracteres del grano del polen.

4.3.2. Acetólisis de Erdtman (1969)

La acetólisis es la metodología más utilizada para el análisis del polen actual o fósil, sin embargo, también ha sido utilizada apropiadamente para muestras de polen procedentes de heces fecales de vertebrados, logrando óptimos resultados en cuanto a la nitidez y limpieza de la exina, lo que facilita la determinación taxonómica del material polínico. No obstante, esta técnica presenta desventajas por el largo tiempo requerido para la preparación de las muestras durante cada procedimiento, debido a que las muestras deben estar durante aproximadamente 24 horas en ácido acético glacial, para limpiar y evitar arrugamiento de los granos de polen. Adicionalmente, esta metodología implica la ejecución de por lo menos doce procedimientos lo que hace mucho más extenso el tiempo requerido para procesar el material polínico. Sin embargo esta técnica altamente corrosiva, destruye totalmente la intina y el contenido protoplasmático del grano de polen, y en consecuencia, la nitidez obtenida por la alta limpieza y la entrada de luz facilitan en gran medida la determinación taxonómica de los granos de polen.

4.3.3. Estandarización de la acetólisis (Autores).

Esta nueva metodología propuesta para el análisis palinológico de muestras procedentes de heces fecales e intestinales de murciélagos, se constituye en una herramienta muy adecuada para el procesamiento, determinación taxonómica de los granos de polen y el entendimiento de las interacciones murciélago nectarívoro-planta. Esta técnica se realiza en seis procedimientos; la manipulación de cuatro muestras tarda en promedio una hora y se aplican dos baños de ácido acético glacial asegurando muy poca exposición y una limpieza profunda del polen, al usar varios ciclos de centrifugado. Se hace una eliminación total del ácido corrosivo con ayuda de baños de alcoholes, requiere de menor volumen de ácidos y con ella se obtiene mayor nitidez del polen, facilitando la descripción e identificación taxonómica del mismo. Teniendo en cuenta lo anterior, consideramos que es la técnica más apropiada para el análisis palinológico de muestras fecales, intestinales o incluso de muestras encontradas en el pelaje de murciélagos nectarívoros.

5. Conclusiones

El análisis de las técnicas empleadas para el procesamiento del polen de muestras fecales y frescas permite concluir que:

- La técnica de estandarización de la acetólisis propuesta por los autores, es una técnica apropiada para el procesamiento de muestras fecales de murciélagos polinívoros, debido a que es el procedimiento más rápido y eficaz que facilita la visualización de la morfología y estructura de los granos de polen.
- La exina de los granos de polen resiste sustancias altamente corrosivas sin que ocurra la destrucción de dicha pared, por el contrario, la acción de dichas sustancias mejora la apariencia de las características del grano de polen que son útiles para la determinación taxonómica.

Bibliografía

- Amaya-Márquez, M., Stiles, G., & Rangel-Ch, O. (2001). Interacción planta-colibrí en Amacayacu (Amazonas, Colombia): una perspectiva palinológica. *Caldasia*, 23(1), 301–322.
- Amorim, F. W., Galetto, L., & Sazima, M. (2013). Beyond the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology*, 15(2), 317–327. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00643.x>
- Anero Bartolomé, M. T., Carabias Martín, F., Cerdón Marcos, C., Cuesta Herranz, C., De Castro Alfageme, S., De Miguel de Pedro, R., ... Villanueva Estebáñez, J. M. (2008). *Aerobiología y polinosis en Castilla y León*. Valladolid : Junta de Castilla y León: Junta de Castilla y León. Retrieved from https://books.google.com.co/books?id=PvW_XwAACAAJ
- Bawa, K. (1990). Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1), 399–422. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800114>
- Erdtman, G. (1969). An introduction to the study of pollen grains and spores. (Hafner, Ed.). Scandinavian university books.
- Erdtman, G., & Sorsa, P. (1971). Pollen and Spore Morphology, Plant Taxonomy: Pteridophyta. Almqvist & Wiksell. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=qUkYPwAACAAJ>
- Fernandez-Pacella, L. (2014). Morfología polínica de especies del género *Senna* (Fabaceae) del Sureste del Iberá, Corrientes, Argentina. *Rev Biol Trop*, 769–782.
- Fleming, T. H., & Muchhala, N. (2008). Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: Pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01833.x>
- Fonnegra, R. (2005). *Introducción a la palinología: métodos de estudio palinológico*. Medellín: Universidad de Antioquia, facultad de ciencias exactas y naturales, departamento de biología.
- González, K., Herrera, L., Ramírez, A., & Reinoso, G. (2015). Dieta de la quiropterofauna (subfamilia Glossophaginae) en un fragmento de bosque seco tropical en el municipio de Ambalema - Tolima. Universidad del Tolima.
- Heithaus, E. R., Fleming, T. H., & Opler, P. A. (1975). Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. *Ecology*, 56(4), 841–854.
- Heithaus, E. R., Opler, P. A., & Baker, H. G. (1974). Bat Activity and Pollination of *Bauhinia pauleta* : Plant-Pollinator Coevolution. *Ecology*, 55(2), 412–419. <https://doi.org/10.2307/1935229>

- Ibarra-Morales, E., & Fernández-Galán, B. S. (2012). El estudio del polen antiguo: problemas y estrategias en el laboratorio. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 62–66.
- Kays, R., Rodríguez, M. E., Valencia, L. M., Horan, R., Smith, A. R., & Ziegler, C. (2012). Animal visitation and pollination of flowering balsa trees (*Ochroma pyramidale*) in Panama. *Mesoamericana*, 16, 53–68.
- Knudsen, J. T., & Tollsten, L. (1995). Floral scent in bat? pollinated plants: a case of convergent evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 119(1), 45–57. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1995.tb00728.x>
- Lemke, T. O. (1985). Pollen Carrying by the Nectar-Feeding Bat *Glossophaga soricina* in a Suburban Environment. *Biotropica*, 17(2), 107–111. <https://doi.org/10.2307/2388502>
- Maguiña, R., Amanzo, J., & Huamán, L. (2012). Dieta de murciélagos filostómidos del valle de Kosñipata, San Pedro, Cusco -Perú Diet of phyllostomid bats of Kosñipata Valley. Cusco -Perú *Rev. Peru. Biol. Rev. Peru. Biol*, 19(192), 159–166.
- Mercado, J., & Pérez, A. (2013). Una nueva metodología para el análisis palinológico de muestras coprológicas en vertebrados polinizadores. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 5(1), 165–170.
- Muchhala, N., & Jarrín-V, P. (2002). Flower Visitation by Bats in Cloud Forests of Western Ecuador. *Biotropica*, 34(3), 387–395. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2002.tb00552.x>
- Proctor, M., Peter, Y., & Lack, A. (1997). *The Natural History of Pollination*. HarperCollins Publishers. Portland Oregon. <https://doi.org/10.3366/anh.1997.24.2.307>
- Ramirez, N., Sobrevila, C., De Enrech, N. X., & Ruiz-Zapata, T. (1984). Floral biology and breeding system of *Bauhinia benthamiana* Taub. (Leguminosae), a bat-pollinated tree in Venezuelan llanos'. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.2307/2443756>
- Rocha Estrada, A., Alvarado Vázquez, M. A., García Sánchez, J. E., Lucio, G., Antonio, M., Hernández Piñero, J. L., & Foroughbakhch Pournavab, R. (2014). Caracterización palinológica de las especies de orégano de los géneros *Lippia* (Verbenaceae) y *Poliomintha* (Lamiaceae) de Nuevo León. *Ciencia UANL*, 17(68), 49–56.
- Singaravelan, N., & Marimuthu, G. (2004). Nectar Feeding and Pollen Carrying from *Ceiba pentandra* by Pteropodid Bats. *Journal of Mammalogy*, 85(1), 1–7. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2004\)085<0001:NFAPCF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2004)085<0001:NFAPCF>2.0.CO;2)
- Sosa, M., & Soriano, P. J. (1996). Resource availability, diet and reproduction in *Glossophaga longirostris* (Mammalia: Chiroptera) in an arid zone of the Venezuelan Andes. *Journal of Tropical Ecology*, 12(6), 805–818. <https://doi.org/10.1017/S0266467400010063>

Vallejo Vargas, A. F. (2014). Caracterización de llamadas de ecolocación e historia natural de tres especies del género *Anoura* (Chiroptera: Phyllostomidae). PUCE.

Van der Hammen, T., Noldus, G., & Salazar, E. (2003). Un diagrama de polen del Pleistoceno final y Holoceno de Mullumica. *Maguaré*, (17), 6.