

**Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la caracterización de polen fósil de
la Laguna Seca, Parque Nacional Natural Chingaza (Colombia)**

Angy Stephany Plata Córdoba

Tesis de grado de la modalidad trabajo de investigación para optar por el título de Geóloga

Director:

Carlos Alberto Ríos Reyes

PhD Ciencias Aplicadas

Codirector:

Clemencia Gómez González

PhD Paleontología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físico - Químicas

Escuela de Geología

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

*A mi madre quien siempre ha sido mi motor de trabajo constante y persistencia, a quién extrañé
lejos de casa.*

*A mi padre por su apoyo durante estos años, su presencia y sus consejos, sin él este hermoso
camino nunca se hubiese iniciado.*

*A mi esposo por su paciencia, apoyo incondicional, quien me ha enseñado a amar cada paso
dado durante estos años.*

*A Ana y Patrick, sin ustedes el desarrollo de este proyecto no hubiese sido posible, son los
ángeles que me envió el cielo para volver a creer.*

A Liceth y Adriana, mis amigas del alma quienes siempre han estado y estarán.

A mis gatos quienes me enseñaron el verdadero amor.

A mi Mechas que desde el cielo siempre me acompaña.

Agradecimientos

A mi Alma Mater, la Universidad Industrial de Santander, por brindarme la mejor formación profesional y contribuir a mi crecimiento como una mujer crítica, perseverante y apasionada por la academia.

A Comedores Universitarios y todo su personal por la labor tan importante que realizan para los estudiantes que tuvimos la fortuna de contar con su servicio.

A la escuela de Geología y los docentes que hicieron parte de mi proceso de formación en especial los profesores Juan Diego Colegial y Francisco Velandia por su calidad profesional y humana.

Al director Carlos Alberto Ríos y codirectora Clemencia Gómez por el tiempo, dedicación y asesoramiento durante la realización de éste proyecto.

Agradecimiento especial al profesor Dionisio Antonio Laverde y su equipo del Laboratorio GIMBA por el préstamo de sus equipos, el tiempo y asesoría en todos los procesos químicos realizados.

Al Parque Tecnológico Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, por permitirme llevar a cabo el desarrollo de mi proyecto de investigación, en especial al Laboratorio de Microscopía dirigido por Carlos Alberto Ríos y su profesional analista Carlos Alberto Chacón y Carlos Alberto Villarreal por todo su tiempo y asesoría durante éste proceso.

A la decana Ana Cecilia Ojeda Avellaneda por su asesoría, tiempo, consejos y confianza durante la realización de éste proyecto.

A todos aquellos que hicieron parte de este hermoso recorrido... ¡Gracias!

Contenido

	Pág.
Introducción	21
1. Objetivos	24
1.1 Objetivo General	24
1.2 Objetivos específicos	24
2. Justificación	25
3. Marco Geológico Regional Y Antecedentes.....	26
3.1 Localización geográfica	26
3.2 Geología Regional y Local	27
4. Marco Conceptual.....	31
4.1 Métodos de preparación de muestras polínicas para SEM	31
4.2 Bases para la identificación de polen y esporas.....	32
4.2.1 Ornamentación.	33
4.2.2 Sistema apertural.....	33
4.2.3 Tamaño y Forma.	35
4.2.4 Simetría y polaridad.....	35
5. Metodología	38
5.1 Recopilación bibliográfica.	39
5.2 Selección de Muestras.....	39
5.3 Fase de Laboratorio: Materiales y métodos.	39

5.3.1. Muestras.....	40
5.3.2 Reactivos y Equipos.....	41
5.4 Análisis de Resultados	42
5.4.1 Análisis, Interpretación y clasificación de las imágenes obtenidas.	42
5.4.2 Establecimiento de un protocolo metodológico.....	43
6. Resultados	43
6.1 Clasificación de los especímenes encontrados	43
6.1.1 Esporas.....	44
6.1.1.1 Isoetaceae (Familia) Isoetes (Gen.).....	44
6.1.1.2 Lycopodiáceas (Familia).....	45
6.1.2 Polen.	45
6.1.2.1 Asteraceae (Familia).	45
6.1.2.2 Brassicaceae (Familia).....	46
6.1.2.3 Chloranthaceae (Familia).....	47
6.1.2.4 Euphorbiaceae (Familia).....	47
6.1.2.5 Fagaceae (Familia).....	47
6.1.2.6 Geraniaceae (Familia).....	48
6.1.2.7 Myrtaceae (Familia).....	48
6.1.2.8 Plantaginaceae (Familia).....	49
6.1.2.9 Poaceae (Familia).....	49
62 Imágenes SEM de las muestras de polen clasificadas	52
6.3 Protocolo metodológico para el análisis de muestras de polen y esporas fósil por	
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	64

6.3.1 Preparación química delas muestras de polen.	64
6.3.2 Análisis en el Microscopio Electrónico de Barrido.	74
6.3.3 Análisis de las imágenes SEM.	76
6.4 Ventajas y limitaciones del análisis de granos de polen por SEM	77
6.4.1 Análisis de granos de polen mediante SEM versus otros métodos.....	79
7. Discusión.....	80
8. Conclusiones	82
Referencias Bibliográficas	84

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Ubicación Laguna Seca en el Parque Nacional Chingaza, Colombia.	23
<i>Figura 2.</i> Principales afluentes en la Laguna Seca PNN Chingaza; En verde la delimitación del PNN.....	27
<i>Figura 3.</i> Mapa geológico inmediaciones de la Laguna Seca, PNN Chingaza..	30
<i>Figura 4.</i> Vista polar de un grano de polen en sección. Vista externa ecuatorial (derecha).	32
<i>Figura 5.</i> Izquierda: Diagrama de clases de elementos estructurales (6), superficie reticulada (7), superficie estriada (8), superficie rugulada (9), superficie insulada (10). Derecha: Diagramas de la ornamentación del polen tectado e intactado, psilado (A), fosulado (B), foveolado (C), escábrido(D), equinado (E), baculado (F), verrugoso (G), gemado (H), pilato (I).....	33
<i>Figura 6.</i> Sistema NPC de Erdman (1952). Tomado y modificado de Jaramillo & Trigo, 2011.	34
<i>Figura 7.</i> Dirección de las medidas de un polen o espóra trilete.....	35
<i>Figura 8.</i> Posibles combinaciones de polaridad y simetría.	37
<i>Figura 9.</i> Características estructurales de una espóra.....	38
<i>Figura 10.</i> Metodología del proyecto de investigación.	38
<i>Figura 11.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Asteraceae. A. Asteraceae B. cf. Hieracium avilae sp. C. cf. Loricaria colombiana sp. D. cf. Lecocarpus E-F. cf. Baccharis bogotensis sp. G. cf. Laestadia muscicola sp.	53

<i>Figura 12.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Brassicaceae. A. cf. <i>Naturium officinale</i> sp. B. Lumina irregular poligonal, ornamentación reticulada de <i>N. officinale</i> sp. C. cf. <i>N. officinale</i> sp.	54
<i>Figura 13.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Chloranthaceae. A. cf. Chloranthaceae B. cf. <i>Hedyosmum scaberrimum</i> sp. C. cf. <i>Hedyosmum angustifolium</i> sp.	54
<i>Figura 14.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Euphorbiaceae. A. <i>Alcalypha</i> sp.	55
<i>Figura 15.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Fagaceae. A. cf. <i>Quercus</i> sec. Lobatae. A-B. cf. <i>Quercoideae</i> Õrsted. C-D. cf. <i>Castaneoideae</i> Õrsted.	55
<i>Figura 16.</i> Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Geraniaceae. A. <i>Geranium</i> B. Ornamentación de Geraniaceae, pilato reticulado C. <i>Geranium</i> D. cf. Geraniaceae.	56
<i>Figura 17.</i> Fotografías SEM de granos de microesporas de la Familia Isoetaceae. A-B. cf. <i>Isoetes howellii</i> sp. B. Ornamentación Rugulada C-H. cf. <i>Isoetes</i>	57
<i>Figura 18.</i> Fotografías SEM de Lycopodiaceae A-L. Esporas foveoladas de la Familia cf. Lycopodiaceae. A-B-H-K-L. Cara distal de las esporas C-D-E-F-G-I-J. Cara proximal.	59
<i>Figura 19.</i> Fotografías SEM de esporas de la Familia Lycopodiaceae A-F. Ornamentación foveoladas en cara distal de especies de cf. <i>Huperzia</i>	59
<i>Figura 20.</i> Fotografías SEM de polen parasyncolpado con colpi angular de ornamentación psilada de la Familia cf. Myrtaceae tribu Myteae.	60
<i>Figura 21.</i> Fotografías SEM de polen de la Familia Plantaginaceae A-E. Especies del género cf. <i>Plantago</i> B. Ornamentación verrugada – micro equinada E. Grano de polen poliporado de cf. <i>Plantago</i>	61

<i>Figura 22.</i> Fotografía SEM de polen de la Familia Poaceae, monoporado con ánulo, de ornamentación escábrida- micro baculado de la especie cf. <i>Bromus lanatus</i> sp.	61
<i>Figura 23.</i> Granos de polen o esporas pertenecientes a la Categoría II "identificables, no clasificados".	62
<i>Figura 24.</i> Granos de polen o esporas pertenecientes a la Categoría III "no identificables".	63
<i>Figura 25.</i> Fotografía de balanza de peso en laboratorio.	64
<i>Figura 26.</i> Tratamiento con NaOH. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 1.	65
<i>Figura 27.</i> Esquematización del tamizado.	66
<i>Figura 28.</i> Tamizado. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 2. .	66
<i>Figura 29.</i> Tratamiento con HCl. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 3.	67
<i>Figura 30.</i> Fotografía de la campana de ventilación del laboratorio.	68
<i>Figura 31.</i> Elementos de protección en el laboratorio para la manipulación de HF.	69
<i>Figura 32.</i> Tratamiento con HF. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 4.	70
<i>Figura 33.</i> Tratamiento con HCL. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 5.	71
<i>Figura 34.</i> Fotografía de la Mezca Acetólica preparada en laboratorio.	72
<i>Figura 35.</i> Esquematización del paso 6 Acetólisis.	72
<i>Figura 36.</i> Acetólisis. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 6. .	73
<i>Figura 37.</i> Esquematización del paso 7. A la izquierda se esquematizan las alícuotas de etanol a diferentes concentraciones, y a la derecha la filtración y secado del residuo final.	74

Figura 38. Fotografía de la Máquina Evaporadora Quórum Q150R..... 75

Figura 39. Fotografía de los porta-objetos ya recubiertos montados en el Microscopio
Electrónico de barrido para ser analizados. 76

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Tamaño y Forma del polen.</i>	36
Tabla 2. <i>Volumen de Reactivos usados por gramo de muestra para la separación de palinomorfos</i>	41
Tabla 3. <i>Principales características de las especies encontradas. P/E: relación eje P y E en μm; Ornam: Ornamentación; Es/Pi: Longitud en μm de Espínula o Pilum; Ape.: Tipo de apertura; n: cantidad de especie por taxón.</i>	50
Tabla 4. <i>Principales características de los granos de polen de la categoría II identificables, no clasificados. Ornam: Ornamentación; Aper: Tipo de apertura.</i>	51

Glosario

Éste glosario intenta homogenizar gran parte de la terminología específica empleada en este trabajo y que puede ser desconocida para el lector. Las fuentes usadas para éste son Bailey (1999), Diccionario de Botánica (Font Quer, 1953), Diccionario de la Lengua Española (2001), en las que se pueden encontrar definiciones más completas.

Acetólisis. Técnica de preparación de polen y esporas para su estudio en la que se elimina el material celular.

Areolado-da (del latín *areolatus*). Se aplica al grano de polen con áreas circulares o poligonales de la ectexina separadas por hendiduras, cuyo conjunto forma un relieve invertido. Sinónimo de insulado. “*Areolate*”.

Anemófilas. Las Especies Anemófila tiene que ver con la polinización, ya que es conocida como la Polinización Anemófila. En botánica se denomina anemofilia a la adaptación de muchas plantas espermatofitas que aseguran su polinización por medio del viento. El término se aplica también a cualquier dispersión de esporas realizado por el viento.

Aperturas. Sinónimo Abertura. (del latín *aperire*, abrir). Rotura, adelgazamiento o zona diferenciada del resto de la superficie del polen o de la espora, a cuyo través puede salir el tubo polínico. Sinónimo de abertura germinal.

Aperturado-da. Que posee aperturas. Se opone a inaperturado.

Apocolpio. De Apocolpo. Área polar delimitada por las líneas que unen los ápices de los colpos en el polen zonocolpado y que limita hacia el ecuador con los límites polares del mesocolpo.

Axilar. situado junto al punto de inserción de una hoja, bráctea o rama en el tallo.

Baculado-da. Se aplica al grano de polen provisto de báculos.

Báculo (del latín háculos, bastón). Elemento de ectexina en forma de bastoncillo cuya longitud es mayor de 1 μm .

Cíngulo. En las Diatomeas, conjunto formado por las dos pleuras

Colpado-da. Se aplica al grano de polen provisto de colpos.

Colpo (del griego, seno). Apertura orientada en sentido longitudinal, cuya longitud es más del doble de su anchura. Colpus. Colpo ecuatorial, sinónimo de endocíngulo.

Colporado-da. Se aplica al grano de polen provisto de aperturas compuestas de un coipo y una o más endoaperturas en forma de poro

Díada (del griego, el número dos). Par de células formadas después de la meiosis por una irregularidad.

Diploide. Es una célula, un organismo o un tejido que cuenta con dos juegos de cromosomas

Ectexina. Capa más externa de la exina, que se tiñe con fuchinabásica y presenta una alta densidad electrónica en las preparaciones para el T.E.M.

Plano ecuatorial: el plano perpendicular al eje polar en su punto medio; diámetro ecuatorial (E): la línea que pasa por el plano ecuatorial y es perpendicular al eje polar; vista ecuatorial (v. e.): con el plano ecuatorial del grano de polen o de la espora en el centro de la visión del observador; laguna ecuatorial: la situada en el ecuador de los granos de polen lofados.

Endexina. Capa interna de la exina. generalmente lisa y homogénea, que no se tiñe con fuchina básica y tiene una baja densidad electrónica en las preparaciones para el T. E. M. Sinónimo de nexina.

Endocíngulo. Endoapertura en forma de anillo continuo que rodea los granos de polen en el ecuador.

Espina. Elemento escultural puntiagudo. de altura mayor de 3 pm.

Espínula. Diminutivo de espina. Espina cuya longitud es menor de 3pm.

Espora (del griego, semilla). Unidad reproductiva sexual o asexual de las plantas criptógamas.

Esporodermis (del griego, semilla y piel). Cubierta que rodea y protege la espora y el grano de polen.

Esporopolenina (del griego, simiente y polen). Sustancia química constituyente de la exina, resistente a la acetólisis.

Estenopolínicos (-palinos). Taxones en que la morfología polínica es invariable dentro del grupo, esto es, cuando algunas especies, uno o varios géneros, o familias poseen en común un mismo tipo polínico característico y constante. Contrario de euripolínicos.

Eudicota. Son un extenso grupo monofilético de angiospermas que previamente habían sido llamadas "tricolpadas" (Donoghue & Doyle, 1989) o "dicotiledóneas no-Magnoliidae" por otros autores.

Euripolínicos (-palinos). Taxones que poseen una morfología polínica variable (tamaño, abertura, escultura, etc), con varios tipos dentro de un mismo grupo.

Exina (del latín ex, fuera, exterior). La capa más externa de la esporodermis, constituida por esporopolenina. Exina 1: comprende el téctum y el infratéctum; exina 2: sinónimo de endexina.

Exosporio (del latín exosporiom). Membrana gruesa, resistente y cutinizada que envuelve la espora por fuera del endosporio y a menudo presenta grabaduras o relieves de forma diversa.

Forma. La que adopta el elipsoide al que se asimila el grano de polen y cuyo eje polar es el de rotación, basada en la relación entre el eje polar (P) y el diámetro ecuatorial (E).

Foveolado-da. Se aplica al polen provisto de foveolas cuya distancia entre si es mayor que su diámetro.

Infratéctum (de infra- y téctum). Estrato de la esporodermis situado debajo del téctum, que reposa sobre la base, generalmente compuesto por columelas, gránulos o alvéolos. Sinónimo de sexina.

Intina (del latín intos, dentro). Capa más interna de la esporodermis que rodea el citoplasma, usualmente poco resistente a la acetolisis por su naturaleza celulósica.

Lalongado-da (del latín lotos y elangatos). Se aplica a las aperturas colporadas cuyas endoaperturas están alargadas transversalmente.

Lesura (del latín Laesura-ae, detrimento). Marca o rasgadura simple o tripartita de una espora, cuyo centro está en el polo proximal.

Lumen (del latín lomen, amplitud de un orificio). Espacio rodeado por muros en el polen reticulado.

Macróspora (de espora con el prefijo griego grande). Se aplica principalmente a las esporas de gran tamaño de los pteridófitos heterósporos, originadas en macrosporangios, que al germinar producen macroprotalos.

Mesocolpo. Área limitada por dos colpos adyacentes y las líneas transversales que unen los ápices de dichos colpos.

Micróspora. Se aplica principalmente a las esporas de pequeño tamaño de los pteridófitos heterósporos que se originan en microsporangios y forman microprotalos. La micróspora es homóloga al grano de polen uninucleado. Se opone a macróspora.

Mónade -a. (del latín monas-adis, unidad). Unidad orgánica.

Monofilético (del griego, de una rama) En filogenia, si todos los organismos incluidos en el grupo han evolucionado a partir de un ancestro común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo.

Monolete. Mono-. Prefijo tomado del griego, único. –lete. que denota la presencia o ausencia de lesura. Sinónimo de –leso.

Muro (del latín moros, muro). Muro o cresta que separa dos lúmenes en los granos de polen reticulados o dos estrías en los estriados.

Nexina (del inglés non-sculprured y exina). Parte interna de la exina, lisa, no estructurada, que comprende la base (nexina) y la endexina (nexina).

Opérculo (del latín opercolom, tapadera). Porción engrosada de ectexina, más o menos circular, que cubre una apertura y que está aislada del resto por una estrecha zona en la que falta completamente.

Ornamentación. escultura, elementos esculturales.

Parasincolpado-da. Caso particular de sincolpado en el que las extremidades de los colpos son bifurcadas y las ramas se anastomosan en los polos dejando libre la región del apocolpo.

Perisporio(del latín perispariorn). Capa de la esporodermis no siempre resistente a la acetolisis, situada alrededor de la exina de muchas esporas, aplicado especialmente a los píeridófitos

Pilato-ta. Provisto de pilos.

Polen (del latín pollen-inis, polvo muy fino, la flor de la harina). Células de forma y dimensión variables, dotadas de una cubierta muy resistente o esporodermis, que se forman dentro de los sacos polínicos del estambre y tienen como misión, una vez formado el microgametófito pluricelular, fecundar el óvulo.

Plano ecuatorial. Plano perpendicular al eje polar en su punto medio; diámetro ecuatorial (E): la línea que pasa por el plano ecuatorial y es perpendicular al eje polar; vista ecuatorial (y. e.): con el plano ecuatorial del grano de polen o de la espora en el centro de la visión del observador; laguna ecuatorial: la situada en el ecuador de los granos de polen lofados.

Proximal (derivado del latín *proximos*). Se aplica al polo o a la cara del grano de polen y de la espora más próximos al interior de la tétrade. Polo proximal; cara proximal. Se opone a distal.

Pteridophyta. Son plantas vasculares (con xilema y floema) que no producen flores ni semillas. Son, por tanto, criptogamas vasculares. El grupo de pteridofitas es muy extenso y se ha introducido en la taxonomía sistemática como una división en el reino vegetal (*Plantae*).

Reniforme. Con forma de riñón.

Sésil. sentada, carente de peciolo en el caso de las hojas o de pedúnculo o pedicelo en las flores.

Sexina (del inglés *sculptured-exina*). Parte más externa de la exina. estructurada, que comprende: los elementos esculturales (sexina), el téctum (sexina) y las columelas o báculos infratectales (sexina).

Sincolpado-da (de colpado con el prefijo derivado del griego que denota unión, soldadura). Con los colpos anastomosados en los polos

Subsésil, casi sésil, es decir, con el peciolo casi inapreciable.

Sulco (del latín *surco*). Ectoapertura latitudinal situada en el polo proximal (catasulcado) o en el distal (anasulcado) del grano de polen.

Supratectales (del latín *sopro*, que denota situación superior y tectal). Se aplica a la situación de los elementos esculturales en los granos de polen tectados.

Téctum (del latín *rectoin*, techo). Estrato externo de ectexina. que forma un techo sobre las columelas. gránulos u otros elementos. Sinónimo de sexina.

Tétrada (del griego Cuatro.) Conjunto de las cuatro células haploides originadas a partir de la célulamadre por meiosis. 2. Unidad de dispersión de granos de polen o de esporas.

Trilete. Es una designación dada en biología a las esporas o granos de polen con aspecto triangular que presentan en la superficie germinal una estructura en forma de "Y" llamada "cicatriz o marca trilete".

Resumen

Título. Aplicación de la microscopía electrónica de barrido en la caracterización de polen fósil de la Laguna Seca, Parque Nacional Natural Chingaza (Colombia)*

Autor: Angy Stephany Plata Córdoba **

Palabras Clave: Morfotipos, polen, SEM, Chingaza, Holoceno.

Descripción

El registro de polen fósil provee información sobre el cambio climático en escalas de décadas y milenios dado que la abundancia y distribución de las plantas responden a los cambios que ocurren en el clima (Birks & Birks, 1980; Delcourt & Delcourt, 1991), por lo cual es muy favorable utilizar la tecnología de punta para obtener datos más cercanos a lo que pudo ser la distribución polínica de una zona. Por esta razón, el presente trabajo de investigación hace un acercamiento mayor al análisis morfológico del polen fósil, por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM), la cual, provee una mayor resolución en comparación a otras técnicas y permite la identificación de los diferentes tipos de polen presentes en los núcleos de perforación que fueron previamente tomados en la zona de la Laguna Seca del PNN Chingaza. Para el presente trabajo se realizó la identificación de morfotipos polínicos Holocenos en la Laguna Seca, utilizando imágenes de electrones secundarios (SE) obtenidas por SEM mediante comparaciones morfológicas que pretende contribuir al conocimiento palinológico de la zona de estudio. A partir de los resultados obtenidos, se determinaron las limitaciones en la preparación de muestras de polen, así como los parámetros que influyen en el análisis SEM, para finalmente establecer un protocolo de preparación y análisis por SEM de muestras palinológicas. Se encuentra que el SEM es una herramienta sumamente útil en palinología y paleopalinología, pues permite complementar estudios que tratan temas de paleoecología, paleoclima, entre otros, pues proporciona un análisis más certero de las características del polen fósil y permite una más amplia clasificación genitiva de los especímenes.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico Químicas, Escuela de Geología, Director: Carlos Alberto Ríos Reyes PhD, Codirector: Clemencia Gómez González PhD.

Abstract

Title. Application of scanning electron microscopy in the characterization of fossil pollen from the Laguna Seca in the Chingaza National Natural Park (Colombia) *

Author: Angy Stephany Plata Córdoba **

Key Words: Morphotypes, Pollen, SEM, Chingaza, Holocene.

Description

The fossil pollen record provides information on climate change on scales of decades and millennia since the plant's abundance and distribution respond to the climate changes (Birks & Birks, 1980; Delcourt & Delcourt, 1991). Therefore, it's very favorable to use state-of-the-art technology to obtain closer data of what could have been the pollen distribution in an area. For this reason, the present research makes a closer approach on the morphological analysis of fossil pollen through Scanning Electron Microscopy (SEM), which provides a higher resolution compared to other techniques and it allows the identification of the different types of pollen, which are present in the cores that were previously drilled in the area of the Laguna Seca in the Chingaza Natural Park. In the present research project, the identification of Holocene pollen morphotypes in the Laguna Seca was conducted, by using images of secondary electrons (SE) which were obtained by SEM through morphological comparisons, those are intended to contribute to the palynological knowledge of the studied area. From the results obtained, the limitations in the preparation of pollen samples, as well as the parameters that influence the SEM analysis were determined, to finally establish a protocol for the preparation of palynological samples and their analysis through SEM. It's found that, the SEM is an extremely useful tool in palynology and paleopalynology, since it allows complementing studies that deal with issues of paleoecology, paleoclimate, among others, as it provides greater precision in the features of fossil pollen and it allows a broader genitive classification of the specimens.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico Químicas, Escuela de Geología, Director: Carlos Alberto Ríos Reyes PhD, Codirector: Clemencia Gómez González PhD.

Introducción

La palinología es una rama que se enfoca al estudio de diferentes tipos de polen y esporas tanto actuales como fósiles. El polen está constituido por una membrana exterior, llamada exina que está a su vez constituida por una proteína llamada esporopolenina que le permite soportar altas temperaturas, presiones, la degradación biológica y química por lo que son extremadamente útiles para identificar ciertos ambientes y procesos ecológicos de una zona y realizar correlaciones regionales. El análisis del polen se ha convertido en un importante método en la reconstrucción de la vegetación del pasado. Diferentes estudios han analizado el polen bajo el microscopio (LM) (Yamazaki & Takeoka, 1959; Liu & Fang, 1986; Wang & Chang, 1988, 1991; Nixon & Crepet, 1989), sin embargo, la identificación de los taxones del polen fósil de ciertas familias es complicada y no es suficiente para realizar un análisis morfológico solamente con el microscopio óptico de luz compuesta (LM), lo que hace aún más importante la caracterización de éste por medio del microscopio electrónico de barrido.

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es conocida como una técnica instrumental con gran cantidad de aplicaciones en diversos campos de la ciencia y la tecnología, para el estudio de todo tipo de materiales orgánicos e inorgánicos, así como de muestras de origen biológico como el polen fósil. Normalmente esta técnica no es usada para conteos e identificaciones de granos de polen, sin embargo, es bastante eficaz para las comparaciones morfológicas y taxonómicas dado a su aumento en la resolución comparado con la microscopía de luz compuesta (LM), como se ha

demostrado en algunos estudios (Jones& Bryant, 2007; Grimsson, 2016; Xiao, 2018), en los cuales se han hecho comparaciones y complementaciones con ambos métodos.

La microscopía electrónica de barrido de polen también se ha utilizado para crear una nueva terminología para describir la ornamentación de polen (e.g., Rowley et al., 1988; Vezey&Skvarla, 1990; Vezey et al., 1991). En el presente estudio se lleva a cabo la caracterización del polen fósil del Holoceno en la Laguna Seca, Parque Nacional Natural Chingaza (Colombia) (Figura 1) por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM) y así generar una guía rápida de las imágenes del polen fósil en el Holoceno en ésta zona haciendo una breve comparación con el estudio llevado a cabo por Gómez, J. 2018 quien realiza el conteo y determinación de los palinomorfos mediante el microscopio óptico en esta misma zona. El PNN Chingaza es un lugar de interés palinológico debido a su herencia glacial y los dos pisos geomorfológicos que pueden ser diferenciados y que evidencian la gran importancia del impacto climático en la geografía y biota de la zona (Van der Hammen, 1992), éstos procesos geológicos conllevaron a la depositación consecuente de polen de las diferentes plantas en los sedimentos lacustres y lodosos, lo que lo hace una zona de interés para los estudios paleoclimáticos.

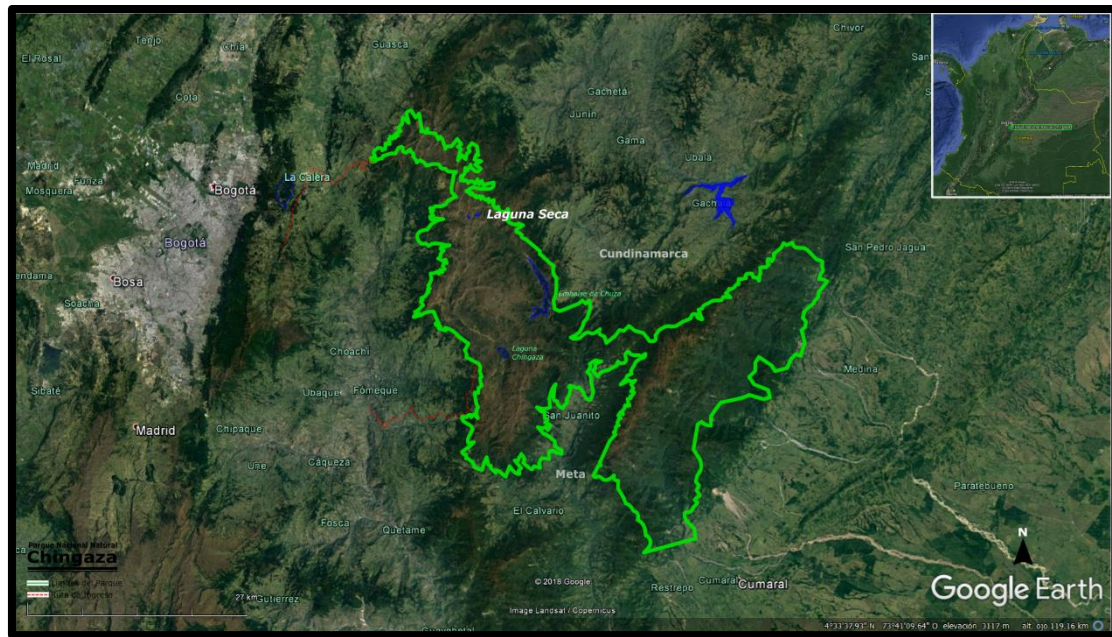


Figura 1. Ubicación Laguna Seca en el Parque Nacional Chingaza, Colombia. Adaptado de Google Earth.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Identificación de morfotipos polínicos Holocenos en la Laguna Seca del PNN Chingaza, utilizando imágenes de electrones secundarios (SE) obtenidas por SEM.

1.2 Objetivos específicos

Caracterizar los diferentes tipos de polen fósiles mediante comparaciones morfológicas a partir del uso de la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Contribuir al conocimiento palinológico de la Laguna Seca del PNN Chingaza.

Determinar las limitaciones en la preparación de muestras de polen, así como los parámetros los parámetros que influyen en el análisis SEM que garantizarán la obtención de buenas imágenes.

Establecer un protocolo de preparación y análisis por SEM de muestras palinológicas.

2. Justificación

El registro de polen fósil provee información sobre el cambio climático en escalas de décadas, centurias, y milenios dado que la abundancia y distribución de las plantas responden a los cambios que ocurren en el clima (e. g., Birks & Birks, 1980; Delcourt & Delcourt, 1991); por lo cual es muy favorable utilizar la tecnología de punta para obtener datos más cercanos a lo que pudo ser la distribución polínica de una zona. Por esta razón, el presente trabajo de investigación hará un acercamiento mayor al análisis morfológico del polen fósil, por medio de la microscopía electrónica de barrido, la cual, proveerá una mayor resolución en comparación a otras técnicas y permitirá la identificación de los diferentes tipos de polen presentes en los núcleos de perforación que fueron previamente tomados en la zona de la Laguna Seca del PNN Chingaza (para más detalle ver Gómez, 2018).

El presente trabajo se justifica en que la microscopía electrónica de barrido ha demostrado ser una técnica mucho más eficiente en la identificación de mayores cantidades de taxones del polen, y, en el caso del presente estudio, será muy útil, pues podrá brindar una visión más acertada de los especímenes presentes en esta zona, identificando a su vez las ventajas y desventajas encontradas en la utilización de ésta técnica desde la preparación de las muestras hasta la obtención de imágenes de buena calidad para su diferenciación en cuanto a estructura y morfología.

3. Marco Geológico Regional Y Antecedentes

3.1 Localización geográfica

La Laguna Seca está ubicada dentro del Parque Nacional Natural Chingaza, el cual, se encuentra en las inmediaciones de la Cordillera Oriental de los Andes, dentro de los departamentos de Cundinamarca y Meta, al noreste de Bogotá; el cual es un tesoro natural y cultural de Colombia dónde pueblos indígenas como los Muiscas y los Guayupes resguardaron este territorio de 76.600 hectáreas. El páramo de Chingaza se enmarca dentro de la región del flanco oriental de la Cordillera Oriental de Colombia, una franja montañosa, que ocupa el centro y oriente de la plancha 228, con orientación noreste-suroeste y fuertes pendientes (Corredor y Terraza, 2015).

Los principales ríos que drenan el área, pertenecen a dos cuencas hidrográficas: la primera con dirección al oeste, que corresponde al río Magdalena cuyos drenajes principales son los ríos Teusacá y Bogotá, y la segunda con dirección al este, hacia el río Meta con los ríos Blanco, Guavio, Farallones, Chuza y Muchindote (IGAC, 1992). La Laguna Seca ubicada en el PNN Chingaza, se encuentra dentro del municipio de Fómeque en Cundinamarca, en la cuenca del Río Orinoco. Sus aguas dan vida al gran río Guatiquía que va a la Orinoquía Colombiana (Figura 2). El área de la laguna es de 3.65 ha, la vegetación principalmente frailejones, característicos del ecosistema de páramo. Este cuerpo lenticó localizado al norte del embalse de Chuza corresponde al sector alto de la cuenca con el río del mismo nombre (Vargas y Pedraza, 2003).

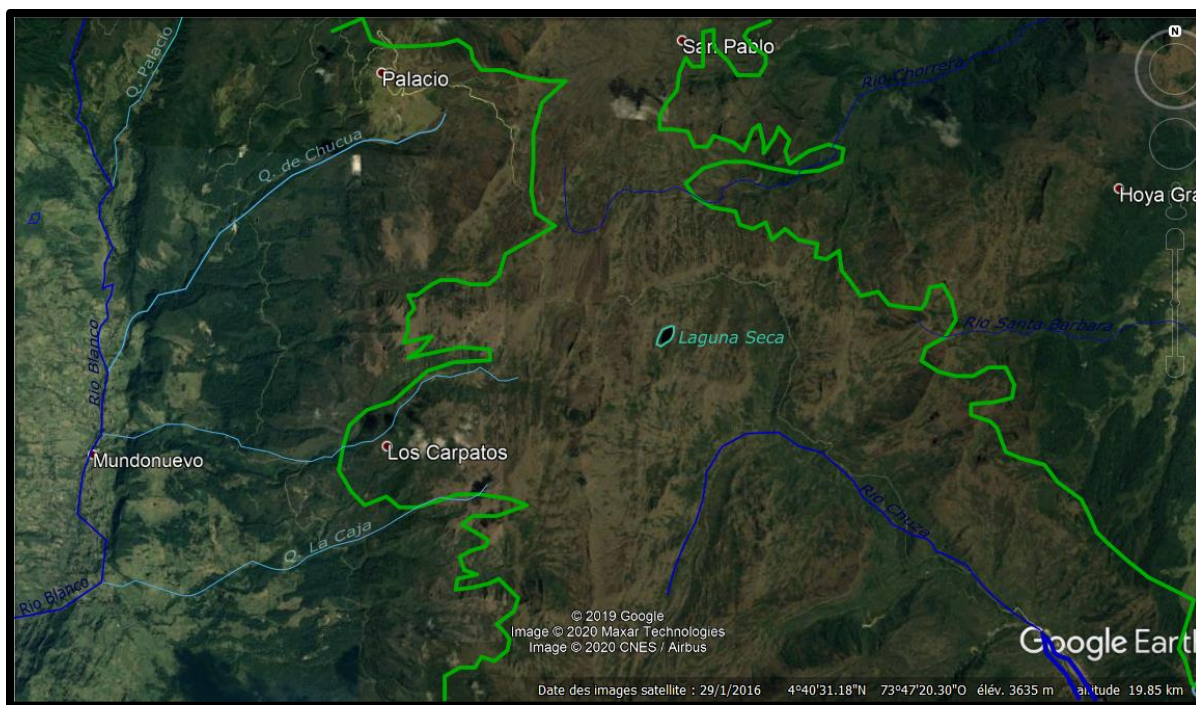


Figura 2. Principales afluentes en la Laguna Seca PNN Chingaza; En verde la delimitación del PNN. Tomado y modificado de Google Earth.

3.2 Geología Regional y Local

El PNN Chingaza tiene un rango altitudinal amplio, de 800 m a 4.020 m de altitud, y así mismo la existencia de dos grandes conjuntos estructurales: en la parte central un sector profundo de una intensa acción tecto-orogénica con las mayores alturas (4.020 m), y las áreas periféricas diferenciadas por lomas y cuestas de poca elevación. Renzoni (1968) propuso cuatro grandes subdivisiones: los esquistos de Quetame, las areniscas de Gutiérrez-Quetame, las capas rojas del valle del Guatiquía y del valle del Clarín y las brechas de Buenavista; y en cuanto a los tipos rocosos Cretáceo-Terciarios, también presentes en la región del sur de Chingaza y Quetame, Renzoni (1968) registró la presencia de los grupos Cáqueza, Guadalupe y Villeta. (Vargas y Pedraza, 2003). Las rocas que afloran dentro del marco geológico más cercano a Laguna Seca son

de edad cretácica y pertenecen a lodolitas y arenitas del Grupo Villeta, puntualmente la Formación Une y la Formación Chipaque (Gómez, 2018). Las Juntas y Une se acumularon en ambientes deltaicos durante el Valanginiano, para luego registrarse una caída relativa del nivel del mar en la parte superior de la Formación Une durante el Albiano tardío y hasta el Cenomaniano, y se propicia una tendencia de somerización. (Terraza et al., 2008; Fabre, 1985; Sarmiento et al., 2006). La formación Une, de edad Albiano – Cenomaniano, es infrayacida por la Formación Fómeque, con un contacto concordante neto, y suprayacida por la Formación Chipaque de edad Cenomaniano – Santoniano, con un contacto gradual concordante. Ésta última está subdivida en tres segmentos litológicos, uno predominantemente arenoso a la base, el intermedio lodoso y finalmente uno arenoso al tope de la unidad. Ésta unidad geológica es suprayacida por la Formación Arenisca Dura de edad Campaniano inferior, con un contacto cubierto; ésta es de litología predominante de arcillolitas y lodolitas en capas gruesas a muy gruesas, intercaladas con limolitas y arenitas de grano muy fino a fino en capas medias y delgadas (Corredor y Terraza, 2015).

Durante el Plioceno se produjo la elevación de la parte norte de la cordillera de los Andes gracias a la intensa actividad volcánica causada por la convergencia de placas tectónicas. Así, a partir de una planicie tropical baja, las montañas llegaron a alcanzar alturas de hasta 6.000 m.s.n.m. durante la transición del Plioceno al Pleistoceno. El cuaternario comenzó bajo condiciones húmedas y en altitudes similares a las actuales donde los Andes colombianos ya se encontraban en la zona ecuatorial. Durante los periodos glaciales del Pleistoceno los límites de los páramos descendían y en los interglaciares subían (Rangel, 2000). Dichos episodios que configuraron el páramo andino, se prologaron durante el Holoceno y produjeron un nuevo tipo de ecología llamado Alta Montaña tropical, caracterizado por su régimen isotérmico.

A partir de estudios del polen proveniente de los sedimentos del que fue el gran lago del altiplano de Bogotá, Hooghiemstra (1984) comprobó que en el trópico se presentó una sucesión de 27 ciclos glacial-interglacial por encima de los 3000 metros de altitud durante el Pleistoceno – Holoceno. El PNN Chingaza cuenta con la presencia de dos pisos geomorfológicos: el periglacial y el de modelado glaciar heredado, con tres grandes sectores de herencia glaciar: Siecha, Palacio y Chingaza, los cuales sufrieron un impacto de tres grandes eventos glaciares: una primera glaciación cuya datación no se ha establecido aún, una segunda entre los 10.000 a 12.000 años AP con morrenas terminales a los 3.100 m de altitud en inmediaciones de la Laguna de Chingaza y, una tercera glaciación cuyo retroceso se inició hacia los 3.000 años AP, la cual produjo la desaparición de las nieves perpetuas y los casquetes de hielo de la región. Normalmente el piso Periglacial se localiza alrededor de los glaciares, sin embargo, está más relacionado a sus condiciones climáticas y procesos morfogénicos (Helmens, 1988; Vargas y Pedraza, 2003). A medida que se levantaba la cordillera de los Andes hubo cambios en las migraciones tanto locales como regionales, y durante el Pleistoceno las fluctuaciones climáticas influyeron en los límites de distribución de las franjas de alta montaña. (Van der Hammen et al., 1973; Wijninga, 1996) La influencia de los cambios climáticos es esencial para entender los patrones de especiación y de riqueza en la zona paramuna (Rangel, 2000).

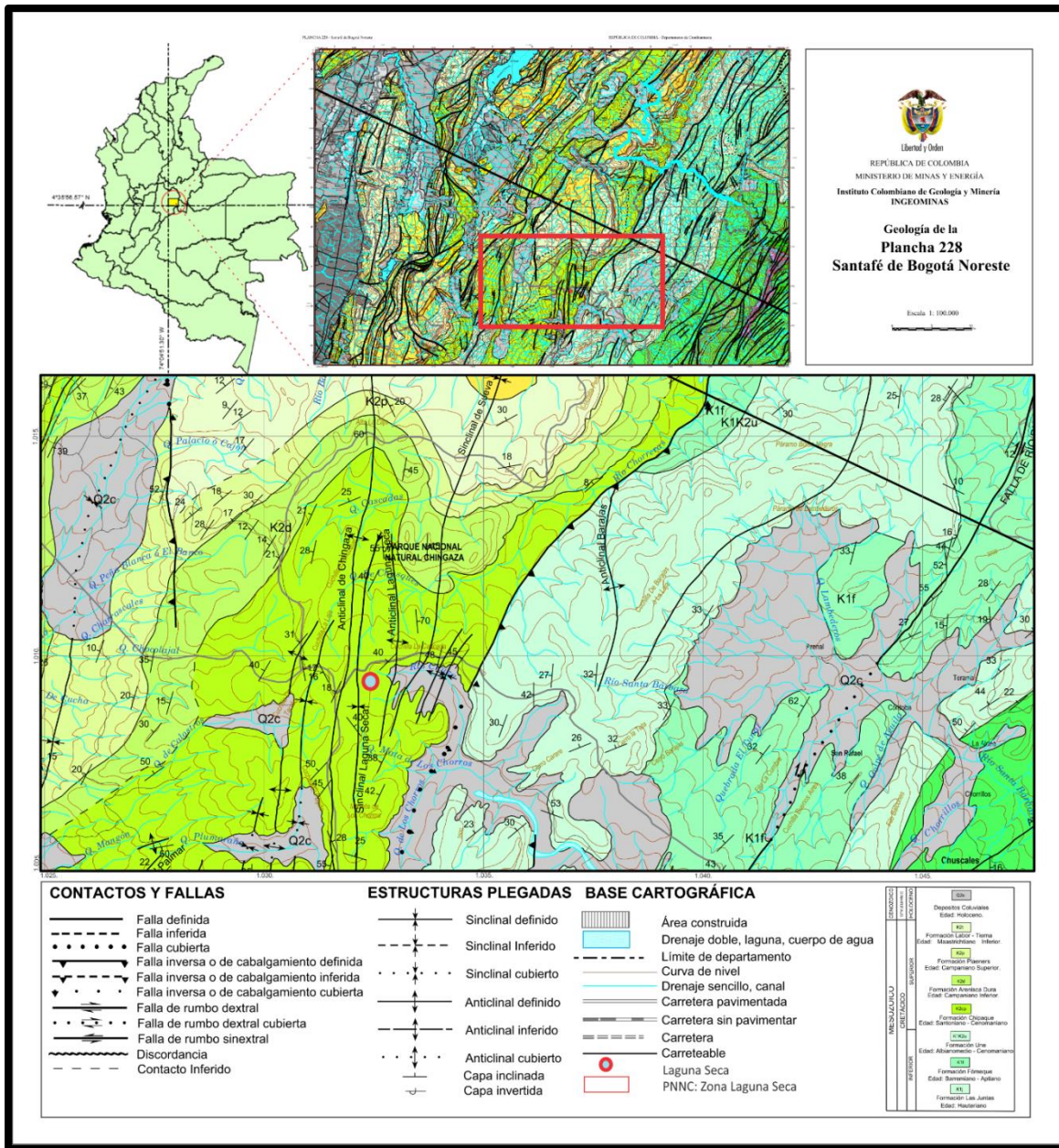


Figura 3. Mapa geológico inmediaciones de la Laguna Seca, PNN Chingaza. Adaptado de Ingeominas (2008), Geología de la Plancha 228, Santafé de Bogotá Noreste.

4. Marco Conceptual

Debido a que las presiones selectivas (Temperatura, precipitación, etc.) sobre los caracteres de polen están casi ausentes o son muy bajas, en comparación con las de la planta diploide, las características del polen pueden permanecer constantes durante millones de años, lo que significa que las características del polen pueden ser conservadas y serán de valor taxonómico (Wodehouse, 1928, 1935; Hao et al., 2001; Grimsson et al., 2014, 2016, 2017a, b).

4.1 Métodos de preparación de muestras polínicas para SEM

Los métodos de preparación de muestras para SEM deben preservar la condición de vida del grano de polen en la medida de lo posible. Además, los recubrimientos de polen deben eliminarse de la superficie de éste de tal manera que no se pierdan detalles del grano de polen. Para el SEM, ciertos autores consideran que la acetólisis es un método óptimo para limpiar la superficie del polen, ya que a menudo destruirá los detalles de apertura. El polen con exinas frágiles también puede ser destruido. Para los granos de polen fósil se debe utilizar una investigación combinada de LM / SEM. Después de la investigación de LM, el mismo grano de polen acetolizado se transfiere al SEM (Hesse et al., 2009).

4.2 Bases para la identificación de polen y esporas.

Los granos de polen y esporas presentan normalmente una morfología bien definida que por lo general permite la identificación de la especie de la cual procede. Sus características son de gran importancia para los estudios del grano de polen y esporas, entre los que generalmente se definen las aperturas (figura 4), la simetría y polaridad, la forma y tamaño y su ornamentación, dependiendo de los objetivos del estudio. Varios estudios han utilizado la longitud del eje polar (P) y ecuatorial (E) para determinar rasgos representativos de cada uno de las especies dentro de una familia, género, subgénero o sección para determinar el grupo al que pertenecen. De acuerdo a estudios recientes como el de Xiao et al. en el 2018 se hicieron varias distinciones en base a la longitud de P y E y la relación P/E, además de la ornamentación del polen. A continuación, se hará una breve descripción de cada una de las características utilizadas para la descripción del polen y las esporas en este estudio.

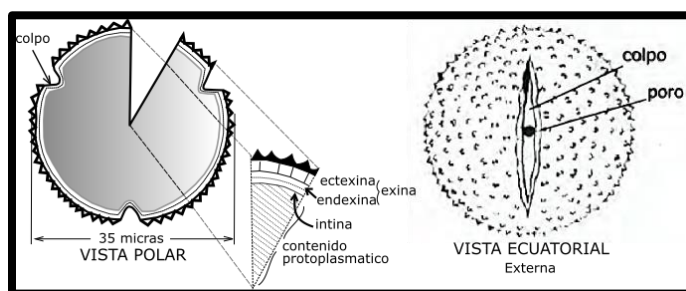


Figura 4. Vista polar de un grano de polen en sección. Vista externa ecuatorial (derecha). Tomado de Canudo, J. (2002).

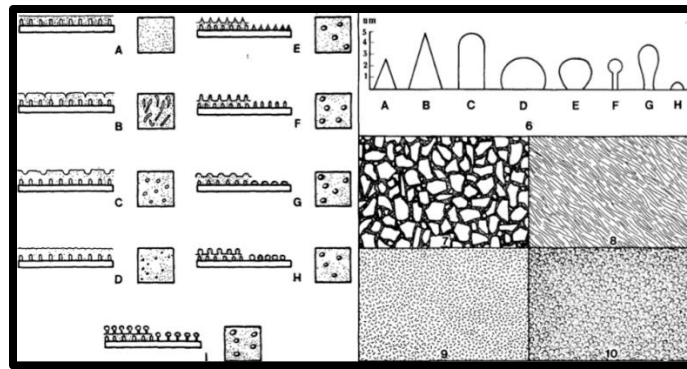


Figura 5. Izquierda: Diagrama de clases de elementos estructurales (6), superficie reticulada (7), superficie estriada (8), superficie rugulada (9), superficie insulada (10). Derecha: Diagramas de la ornamentación del polen tectado e intactado, psilado (A), fosulado (B), foveolado (C), escábrido(D), equinado (E), baculado (F), verrugoso (G), gemado (H), pilato (I). Tomado y modificado de Saenz, C. (1976).

4.2.1 Ornamentación. La ornamentación o relieve de los granos de polen, suele estar formada por los elementos esculturales que se disponen sobre la superficie del mismo (figura 5). En general, son una respuesta adaptativa a los procesos de dispersión y polinización, en la exina del polen la ornamentación puede ser variable o distribuirse de manera homogénea en la superficie del grano de polen. En muchas esporas, la región ecuatorial está engrosada formando un cíngulo. Existen diferentes nomenclaturas dadas a éstas formas, para este trabajo se utilizaron las generales de Sáenz (1976) (figura 5) y se tomaron definiciones más específicas de familias y géneros de diferentes estudios (Ver referencias bibliográficas).

4.2.2 Sistema apertural. Una abertura es una zona adelgazada o interrumpida de la exina, su función es doble: constituyen el lugar de salida del tubo polínico y favorecen los cambios de volumen del grano de polen. Dependiendo de la forma de la abertura, ésta puede ser de dos tipos: *colpos*, cuando la relación longitud/anchura es mayor que 2 ($l/a > 2$), la longitud siempre medida en

el sentido del eje polar; *poros*, cuando la relación longitud/anchura es menor que 2 ($l/a < 2$), igualmente medida en el sentido del eje polar. Cuando aparece una abertura alargada y dispuesta perpendicularmente al eje polar, se denomina *sulco*. La nomenclatura propuesta por Erdtman (1952) permite caracterizar los tipos polínicos en base al número, posición y carácter de las aberturas (figura 6).

Número (N)	Posición (N)	Carácter (C)
Mono- (1 abertura)	-cata- (polo proximal)	-leptomado (leptoma)
Di- (2 aberturas)	-ana- (polo distal)	-colpado (colpo)
Tri- (3 aberturas)	-anacata- (polo proximal y polo distal)	-porado (poro)
Tetra- (4 aberturas)	-zono- (en una franja ecuatorial)	-colporado (colpo + endoabertura)
Penta- (5 aberturas)	-dizono- (en dos franjas ecuatoriales)	-pororado (poro + endoabertura)
Hexa- (6 aberturas)	-panto- (por toda la superficie)	-sulcado (sulco)
Poli- (muchas aberturas)		

Figura 6. Sistema NPC de Erdman (1952). Tomado y modificado de Jaramillo & Trigo, 2011.

En el caso de las esporas, éstas pueden ser: *monolete*, que se caracterizan por tener una laesura en forma de ranura y en posición proximal, a su vez su simetría es bilateral y heteropolar; *trilete* (Figura 7), que tienen una abertura con tres ramas situada en el polo proximal, suelen ser esferoidales u ovaladas con tres aberturas alargadas situadas alrededor del polo proximal, su simetría es radial y heteropolar; y *alete*, estas últimas no son incluidas en ningún grupo ya que no tienen desarrollado una laesura monolete o trilete (Molina, 2002).

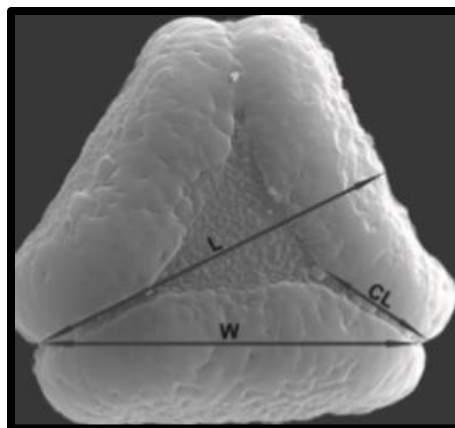


Figura 7. Dirección de las medidas de un polen o espora trilete. Adaptado de Thornil et al. (2012).

4.2.3 Tamaño y Forma. El tamaño del grano de polen y esporas se define en función del eje (P ó E) de mayor longitud. Esta forma puede, a su vez, describirse en función de la relación existente entre la longitud de sus ejes polar (P) y ecuatorial (E). Esto último es a lo que llamamos relación P/E. Erdtman (1952) estableció una serie de categorías para describir el tamaño de los granos de polen, y su forma en cuanto a la relación P/E (Tabla 1). Los micro-espora son monoletes, elípticas en vista polar, de 30-40 μm de longitud y 20-25 μm de ancho. Pfeiffer (1922: 89) señaló que el tamaño de la microespora es la característica de diagnóstico principal y que el marcado y el color "en segundo lugar, se pueden utilizar con ventaja" (Musselman, 2002). Para efectos de las medidas de un trilete (espora o polen) Thornhill et al. (2012) utilizaron cuatro medidas llamadas longitud ecuatorial (L), ancho ecuatorial (w), longitud del colpo (CL) y el radio de la longitud del colpo del grano de polen (colpo/radio de longitud) (Figura 7).

4.2.4 Simetría y polaridad. Eje polar (P) y eje ecuatorial (E) nos permiten orientar en todo momento el grano de polen y sus estructuras, Faegri (1978) dice que el eje polar estaría definido por el eje de mayor simetría. La simetría del grano de polen se define siempre en vista polar. La polaridad define dos hemisferios (plano polar o ecuatorial) (figura 8). Autores como Denk&

Grimm (2009^a) y Xiao et al. (2018) en estudios recientes han realizado distinciones en base a imágenes SEM y han caracterizado su tamaño, forma, relación P/E y ornamentación.

Tabla 1.

Tamaño y Forma del polen.

Relación P/E	Forma	Tamaño	
<0.50	Peroblado	Nomenclatura	µm
0.50-0.75	Oblado		
0.75-0.88	Suboblado		
0.88-1	Oblado-esferoidal	Muy pequeño	<10
1	Esferoidal	Pequeño	10-25
1-1.14	Prolado-esferoidal	Mediano	25-50
1.14-1.33	Subprolado	Grandes	50-100
1.33-2	Prolado	Muy grandes	100-200
>2	Perprolado	Gigantes	>200

Nota. Tomado y modificado de Erdmant (1952).

Nota: Eje polar (P) y eje ecuatorial (E); micrómetros (µm). Tomado y modificado de Erdmant (1952).

Los criterios usados para definir una especie de microespora en el presente estudio enfatizan el tamaño y la morfología de la microespora. Las microesporas también se producen en tétradas y tienen más o menos forma de riñón, la línea de unión se encuentra a lo largo del lado cóncavo o corto de la espora, ésta región a menudo tiene poca o ninguna ornamentación, las zonas de contacto producen cicatrices que serán las aberturas del Monolete o Trilete (Figura 7). Las microesporas en superficie se observa una base con diversas características, una expansión sobre la lesura está presente, el perisporio está ornamentado y tiene una base perforada, el exosporio es liso y en sección tiene estructura compacta (Figura 10) (Canudo, 2002; Macflu et al, 2006; Sosa, 2019).

		SIMETRICOS						ASIMETRICOS	
		BISIMETRICOS							
RADIOSIMETRICOS		ISOBISIMETRICOS			HETEROBISIMETRICOS				
ISOPOLARES	V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR	
HETEROPOLARES	V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR	
		DISTAL	PROXIMAL		DISTAL	PROXIMAL		DISTAL	PROXIMAL
SUBISOPOLARES	V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR		V. ECUATORIAL	V. POLAR	
		DISTAL	PROXIMAL		DISTAL	PROXIMAL		DISTAL	PROXIMAL
APOLARES									

Figura 8. Posibles combinaciones de polaridad y simetría. Tomado y modificado de Fernández y Díez (1995).

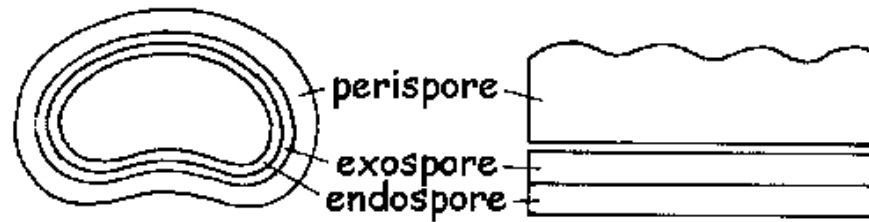


Figura 9. Características estructurales de una espora. Tomado de Sosa (2019).

5. Metodología

A continuación, se describe en la figura la metodología implementada durante la realización de este trabajo de investigación (Figura 10).

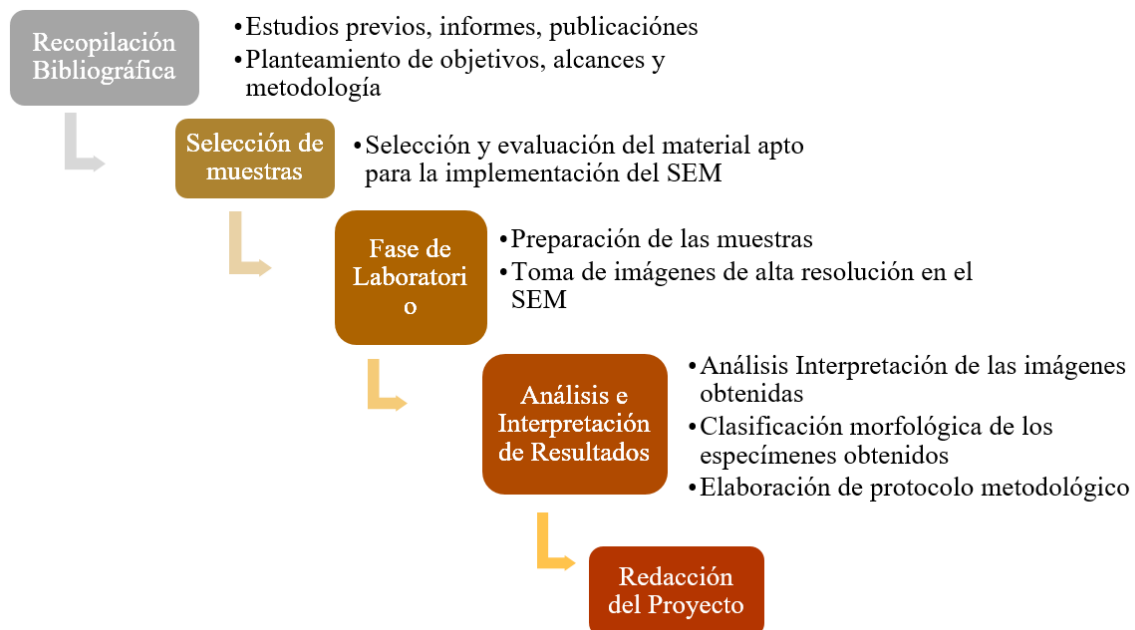


Figura 10. Metodología del proyecto de investigación.

5.1 Recopilación bibliográfica.

Se basó en la consulta de artículos científicos, tesis de grado, libros e informes técnicos, relacionados directa e indirectamente, tanto con el área de estudio, los géneros de polen fósil, como la implementación de técnicas de análisis a diferentes tipos de polen fósiles, utilizando como fuente de acceso a la información la base de datos de la Biblioteca de la Universidad Industrial de Santander a través de las plataformas de revistas como Science Direct, ELSEVIER, Science, entre otras. Igualmente se usaron plataformas de búsqueda directa como Google Academic.

5.2 Selección de Muestras

El muestreo de polen y sedimento utilizados en el presente estudio fue realizado para un previo trabajo de investigación (Gómez, 2018), en dónde se realizó la perforación por medio de una sonda rusa para la extracción de 6 núcleos, en total de 4,15 metros. Las muestras restantes y el polen previamente separado y conservado en glicerina fueron facilitadas gracias a la Geóloga PhD. Clemencia Gómez, profesora de Universidad Nacional y codirectora del presente estudio, para el desarrollo de éste trabajo de investigación. Para mayor información ver Gómez (2018) en Universidad Nacional de Colombia.

5.3 Fase de Laboratorio: Materiales y métodos.

Siguiendo el Manual de procedimientos del Laboratorio de Paleocología del Instituto de Ciencias de la Tierra Jaime Almera (ICTJA) protocolo 7.6 para el tratamiento polínico, se obtuvo

finalmente el polen concentrado. El polen fósil aun cuando ha perdido su capacidad de germinación, conserva las características de la exina o exosporio prácticamente incólumes. Para examinar el material polínico se necesita que la preparación esté lo más purificada posible. Las materias que acompañan al polen fósil, son generalmente restos vegetales cuyo componente principal es la celulosa que se destruye por el líquido acetolítico, por lo cual la acetólisis es uno de los mejores métodos de laboratorio para purificar las muestras. Existe una discusión en cuanto a éste proceso acetólico ya que ciertos autores prefieren no utilizarlo pues en ciertos casos podría llegar a destruir el polen o modificar en cierta medida la exina de éste, sin embargo, otros autores lo consideran necesario ya que en algunos casos el material celuloso de éste puede afectar la visibilidad de la ornamentación del polen fósil.

5.3.1. Muestras. Los procesos de separación se llevaron a cabo para un total de 21 de muestras, de las cuales 5 de éstas se separaron desde el sedimento siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 7.3.1, las muestras están enumeradas a continuación respecto a la profundidad de perforación en centímetros (83-84; 102-103; 364-365; 384-385; 402-403). Las demás muestras (9-10; 27-28; 101-102; 109-110; 123-124; 163-164; 189-190; 201-202; 217-218; 273-274; 299-300; 325-326; 353-354; 367-368; 384-386; 403-404) fueron separadas previamente por Gómez (2018) usando el mismo protocolo químico sin realizar la acetólisis y conservadas en glicerina, y para efectos del presente estudio fue necesario realizar la separación del residuo polínico de la glicerina, proceso que se puntualiza en el siguiente apartado.

5.3.2 Reactivos y Equipos. Para las 5 muestras de sedimento fue necesaria la aplicación de un tratamiento físico-químico mediante la aplicación de reactivos tales como NaOH al 10%, HCl al 10%, HF al 40% y una mezcla de CH₃COOH al 97% y H₂SO₄ al 98% (Tabla 2).

Tabla 2.

Volumen de Reactivos usados por gramo de muestra para la separación de palinomorfos

Reactivo	[]	Vol/gr **
NaOH	10%	12,5
HCl	10%	5
HF	40%	6,25
CH ₃ COOH	97%	7
CH ₃ COOH+	9:1*	1,25
H ₂ SO ₄		
Etanol	50%	10
Etanol	75%	5
Etanol	95%	2,5

Nota: Concentración= []. (*) La mezcla acética está en proporción 9:1 en concentraciones de 97 y 98% respectivamente. (**) Volumen de reactivo en ml por gramo de muestra.

Para las otras 16 muestras, fue separado el residuo polínico de la glicerina por medio de alícuotas crecientes en concentración de etanol de 50%, 75% y 95% (Tabla 2), y se llevó a cabo un secado crítico de éstas muestras. Posteriormente el polen separado y seco, fue puesto en láminas de carbono y cubierto con Au, y se tomaron las imágenes de alta resolución del polen con el Microscopio Electrónico de Barrido, el cual, a su vez, a partir de la técnica de bajo vacío genera un rayo de electrones secundarios para producir las imágenes de la superficie de la muestra. De ésta fase se obtuvieron los resultados directos de la investigación, se obtuvieron un total de 82

fotografías de especies de polen fósil variando en la cantidad de imágenes tomadas por cada espécimen.

5.4 Análisis de Resultados

5.4.1 Análisis, Interpretación y clasificación de las imágenes obtenidas. Una vez obtenidos los resultados de las imágenes SEM de los residuos polínicos, éstos son comparados y diferenciados en base a las características mencionadas anteriormente en el apartado **5.2 Bases para la identificación del polen**, con el fin de determinar la morfología de cada uno de los especímenes (Tabla 2. *Volumen de Reactivos usados por gramo de muestra para la separación de palinomorfos*), **se consultaron** atlas y bibliografía específica de cada familia, subfamilia y género para agrupar a cada espécimen. Se encontraron ciertas dificultades al caracterizar algunos de éstos debido a que después del proceso de separación del material, éste puede quedar con residuos que no permiten observar la ornamentación, y ésta misma puede ser borrada parcial o totalmente de la superficie del polen, también algunos especímenes se encontraban muy deformados por lo que fueron caracterizados o nombrados como no identificables (ni) (Figura 23), y en 4 casos particulares de las muestras número 384-386, 367-368, 353-354 y 325-326 no se encontró ningún rastro de polen posiblemente debido a que el material de la muestra se encontraba bastante cristalizado debido a los efectos químicos de la separación del polen del sedimento, cabe resaltar que éstas muestras no fueron acetolizadas. Para efectos de nomenclatura de los especímenes encontrados se usaron las reglas básicas de taxonomía botánica partiendo de mayor a menor (jerárquicamente) de la siguiente forma: Familia, Subfamilia, *Género*, *Sección*, *especie*. Ciertas especies tienen la abreviatura “cf.” (confróntese con) al principio, esto debido a que no se puede

afirmar con seguridad, pero según sus rasgos morfológicos (en éste caso) parece que pertenece a esa especie o género.

5.4.2 Establecimiento de un protocolo metodológico. El protocolo se realiza en base a las necesidades al momento de realizar un estudio de muestras polínicas fósiles en SEM. Dentro de los criterios utilizados para realizar éste protocolo se encuentran el tipo de muestra que se tiene, el tiempo requerido para la realización del proceso en base a los resultados que se quieren obtener.

6. Resultados

6.1 Clasificación de los especímenes encontrados

Dentro de las 82 imágenes alcanzadas, se ubicaron los especímenes dentro de tres (I, II y III) categorías, la categoría I están los granos identificados y clasificados (Figuras 11-22), en la cual, taxonómicamente hablando se lograron describir y clasificar los especímenes de 55 fotografías en un total de 11 Familias, de las cuales, en su mayoría, cada una corresponde con genitivos del nombre de cada espécimen (Género tipo), y en algunos casos se hace mención a la especie y sección del espécimen; la categoría II en la que están un total de 13 imágenes (Figura 23) identificables pero difíciles de clasificar, y se ubicaron aquellas especies que fueron posibles de describir morfológicamente (Tabla 4), sin embargo, se encontró una alta dificultad en ubicarlos dentro de un taxón, en los que en la mayoría de los casos, solo un experto familiarizado con los

taxones de polen en la muestra y con el aspecto de los granos de polen con SEM podría identificar estos granos con certeza; y finalmente la categoría III (Figura 24) en la cual se ubicaron los 14 especímenes restantes de las imágenes que fueron clasificadas como no identificables pues fueron imposibles de categorizar debido a la carencia de ornamentación, algunos están muy fracturados y deformados. A continuación, se hace una breve descripción de las Familias, subfamilia, géneros y especies encontradas de la Categoría 1, detallando los rasgos morfológicos más relevantes de cada una (Tabla 3).

6.1.1 Esporas.

6.1.1.1 Isoetaceae (Familia) Isoetes (Gen.). Las microsporas de *Isoetes*, como la mayoría de las esporas de *pteridophyte* (Tryon y Lugardon, 1991), son monoletas (Figura 17). *Isoetes* se distribuye en todo el mundo y comprende cerca de 250 especies, América del Sur es su centro de diversidad taxonómica con un estimado de 64 especies (Troia et al., 2016 en Pereira et al, 2017). Dichas esporas son bilateralmente simétricas con una sola abertura, las microsporas de *isoetes* suelen tener entre 10 y 30 μm de longitud, otra característica es la cresta proximal en algunas especies en forma de una hinchazón semihemisférica perpendicular al eje largo de la cresta, la forma distintiva de la microspora, con su cresta proximal en ángulo agudo, es el resultado del patrón de desarrollo de las células madre de la microespora (Musselman, 2002) (Figura 17-A;C;G). Usando el sistema de Lellinger y Taylor, se encuentran los siguientes patrones en las microsporas de *Isoetes*: aglomerado, con ampollas (radialmente simétricas, protuberancias bajas) (Figura 17-B), no más alto que ancho, con una base ancha y ápice agudo; cristalino, con paredes estrechas, afiladas y sin anastomosis; y equinado, con estelas (radialmente simétricas, protuberancias altas)

más altas que anchas, cónicas, más cercanas a la base. Las esporas sin ornamentación incluyen: escábrida o lisa y con microornamentación y sin macroornamentación; y psilada, o lisa y sin micro o macroornamentación. (Musselman, 2002).

6.1.1.2 Lycopodiáceas (Familia). Con unas 450 especies que crecen desde el nivel del mar hasta más de 4 000m de altitud. Arana & Øllgaard (2012) reportaron 190 especies para Sudamérica, mientras que, para Colombia, Murillo, Murillo, León y Triana (2008) reconocen 78 especies (Rincón et al., 2014). Los esporangios de ésta familia son axilares, reniformes, sésiles o subsésiles (Figura 18;19). Las esporas son triletes, rugosas (*Lycopodiella*), foveolado-fosuladas (*Huperzia*) (Figura 19-A;F) o reticuladas (*Lycopodium*) (Murillo y Murillo, 1999). En *Huperzia* la macro-ornamentación es caviforme o, menos comúnmente, muriforme, y las esporas son foveoladas (Figura 19); raramente las foveolas se unen o se conectan formando fósulas marginales (Rincón et al., 2014).

6.1.2 Polen.

6.1.2.1 Asteraceae (Familia). Presenta más de 1100 géneros y cerca de 20,000 especies con distribución cosmopolita (Cronquist, 1981; Kubitzki, 2007). Habitan áreas boscosas, zonas intervenidas, hasta paramos. Los granos de polen son mónadas, tricolporados, de escultura espinada y fenestrada (Mercado et al., 2011). Se pueden diferenciar de polen similar en otras familias por el tamaño relativamente pequeño tanto del polen como de las espinas y la disposición irregular de las espinas (Adekanmbi, 2009) (Figura 11). Las subfamilias Cichorioideae y Asteroideae son normalmente estenopalinos (Figura 11-A-G) (características morfológicas

similares dentro de una misma familia o género) (Halbritter et al., 2018). Especies como *Hieracium avilae* Zahn. (Figura 11-B), es definida como polen de forma oblato-esferoidal, con endoabertura lalongada, elíptica, de exina fenestrada-espinosa, crestas con báculos bien definidos y espinas de base ancha, es de medidas aproximadas en su eje P (26.33-28.47) μm y E (28.45-31.95) μm , longitud de las espinas de $1.95 \pm 0.15 \mu\text{m}$, *Loricaria colombiana* Cuatr. (Figura 11-C), es definida como polen de forma circular oblato-esferoidal, tricolporada, de exina espinulada, es de medidas aproximadas en su eje P (28.45-31.95) μm y E (29.33-33.07) μm , longitud de las espinas de $1.1 \pm 0.31 \mu\text{m}$, *Baccharis bogotensis* H.B.K. (Figura 11-E;F) es definida como polen de forma circular, oblato-esferoidal, con endoabertura lalongada, de exina espinosa, esporádicamente se presentan cavas pequeñas, es de medidas aproximadas en su eje P (16.42-17.98) μm y E (16.53-18.67) μm , longitud de las espinas de $3 \pm 0.40 \mu\text{m}$, *Laestadia muscicola* Wedd. (Figura 11-G) es definida como polen de forma circular, oblato-esferoidal, con endoabertura lalongada elíptica constricta en su parte central, de exina espinosa, espinas cortas de base ancha, es de medidas aproximadas en su eje P (17.85-20.15) μm y E (18.53-20.47) μm , longitud de las espinas de $2.6 \pm 0.51 \mu\text{m}$ (Velásquez y Rangel, 1995).

6.1.2.2 Brassicaceae (Familia). Es una familia estenopalinológica, los granos de polen son usualmente reticulados y tricolpados (Erdtman, 1972; Reille, 1992; Ghazali, 1993) (Figura 12). Granos de polen generalmente tricolpados algunas veces sincolpados, su forma varía de prolado esferoidal a subprolado y prolado (Velásquez y Rangel, 1995; Abdel, 2002). *Nasturtium officinale* R. Br. (Figura 12 A-C), está descrita por Velásquez y Rangel (1995) como polen de ámbito circular a prolato esferoidal, de exina homo-reticulada, de tamaño del eje P (11.89 - 35.43) μm y del eje E (22.13 – 24.43) μm .

6.1.2.3 Chloranthaceae (Familia). La mayoría de las Chloranthaceae tienen granos de polen con escultura reticulada y rugulo-reticulada, exhiben una diversidad considerable en la configuración de la apertura, ya que pueden ser monosulcados, tricotomosulcado, sintricolpado, espiraperturado, varios surcos ramificados (Figura 13 C), policolpado, polforado. El género *Hedyosmum* (Figura 13-B;C) tiene un surco con cuatro a seis ramas y todas las especies estudiadas de *Hedyosmum* tienen espinillas supratectales distintas o microverrugas en el muri del retículo (Eklund et al., 2004).

6.1.2.4 Euphorbiaceae (Familia) Alcalypha (Gen.). (Figura 14) Polen generalmente pequeño (9-22 μm), subisopolar a isopolar o apolar, oblado a esferoidal. Sistema de aperturas de 2 a 8, colporado. La ornamentación de la exina es rugulada a microrugulada o areolata con márgenes escábridos localizados (PalDat, 2000; Sagun et al, 2006).

6.1.2.5 Fagaceae (Familia). La familia está ampliamente distribuida en Colombia (Figura 15). Los robles son los árboles que pertenecen a la familia Fagaceae y a uno de los géneros más importantes del mundo: *Quercus*. Según la clasificación del género *Quercus* de la filogenia Fagaceae de Manos et al. (2001), el grupo infragenérico *Lobatae* (Figura 15-A) tiene una ornamentación (Micro) Verrugosa. Solomon (1983a) documentó 21 especies de roble rojo del este de América del Norte mediante micrografías SEM. La ornamentación del tectum en la sección *Lobatae* es estructuralmente idéntica a la que se encuentra en *Quercus*, el tectum puede llamarse verrugado (Este tipo está etiquetado como (Micro) verrugado) (Denk & Grimm, 2009a). El polen de tipo *Castanea* (Subfamilia Castaneoideae Õrsted.) es generalmente más pequeño y más angosto

que el polen de los otros géneros en apariencia, bajo el SEM, la escultura rugulada es aplanada y de apariencia más suave (fusionada) (Praglowksi, 1984) (Figura 15-C;D).

6.1.2.6 Geraniaceae (Familia) *Geranium (Gen.)*. (Figura 16) Los granos de polen pueden ser tricolporados y prolados esferoidales. La estructura de la exina es semitectada y reticulado con procesos supratectales (pilum/baculo) que varían en tamaño y morfología. Todas las especies tienen básicamente la misma ornamentación del polen siendo clavate-reticulada o baculada-reticulada (Figura 16-B). Generalmente son de tamaño grande (51-100 μm) (Keshavarzi et al., 2016), algunas especies como *G. robertianum* pueden ser de tamaño mediano (26-50 μm) (PalDat, 2000).

6.1.2.7 Myrtaceae (Familia). Myrtaceae, una familia eudicota de tamaño mediano dentro del orden Myrtales contiene ~ 142 géneros y más de 5500 especies (Wilson, 2011). De Candolle (1828) dividió la familia en dos tribus, Myrteae y Leptospermeae (Figura 20). Tribus como Myrteae tienen una distribución mundial con principalmente centros de diversidad en Australia y Sur América (Thornhill et al, 2012). Las características que son comunes en la mayoría del polen de Myrtaceae son los granos desprendidos como mónadas, con ocurrencias tetraédricas raras, granos angulaperturados y tricolporados, una forma triangular cuando se ve en los polos, una forma oblata en vista ecuatorial, la presencia de una isla apocolpial y un ancho relativamente medio a pequeño del grano de polen (<20 μm) en comparación con otras familias de angiospermas. El polen de Myrtaceae es típicamente tricolporado; sin embargo, también se producen di, tetra, mono, penta y hexacolporado, siendo estos últimos tres estados extremadamente raros (Thornhill et al, 2012). Thornhill et al. (2012), clasifica el polen de *Calycolpus*, con distribución en Colombia,

como tricolporado con una exina psilada, de lados convexos, longitud del polen de 22,6 a 24,2 μm , la relación colpo/longitud varía de 20.6 a 38%.

6.1.2.8 Plantaginaceae (Familia) *Plantago* (Gen.). Las Plantaginaceae son anemófilas, con granos de polen con 4 a 15 aberturas (Rahn, 1996). Los estudios de polen indican claramente que el género *Plantago* es un taxón homogéneo de acuerdo con la morfología del género (Faegri & Iversen, 1992) (Figura 21). Los granos de polen de las especies estudiadas son en su mayoría pequeños a medianos, eutectados, subprolados a prolados-esferoidales y operculadas o no operculadas y pantaporados con aperturas más o menos circulares (Figura 21-E). Basados en la ornamentación del polen, éste puede ser verrugado para el tipo *Plantago albicans*, micro-equinado o “areolato” para *P. coronopus* y granulado para *P. lanceolata* (Gazer & Shalabi, 2016) (Figura 21-B). La base de datos palinológica PalDat – Palynological Database (2000), tiene una amplia caracterización de *Plantago* en la que las especies se encuentran en común con una ornamentación verrugada, micro-equinada y perforada (Figura 21-B).

6.1.2.9 Poaceae (Familia). Mónadas, con una sola abertura de tipo poro: monoporado, generalmente con anillo y opérculo; de forma esférico en vista polar, prolado-esferoidal y oblado-esferoidal (Morgado et al., 2015). La mayoría de las especies presentaban un tamaño de polen pequeño a mediano (PalDat, 2000). La especie *Bromus lanatus* H.B.K. (Figura 22) se encuentra descrita por Velásquez y Rangel (1995) como polen de forma prolato-esferoidal, monoporado con ánulo, de exina escabrada con báculos ligeros, de tamaño mediano y un diámetro mayor del poro de 4.12 ± 0.79 y menor de 3.68 ± 0.63 .

Tabla 3.

Principales características de las especies encontradas. P/E: relación eje P y E en μm ; Ornam.: Ornamentación; Es/Pi: Longitud en μm de Espínula o Pilum; Ape.: Tipo de apertura; n: cantidad de especie por taxón.

Taxón	P/E	Forma	Ornam.	Es/Pi	Ape.	N
Asteraceae (Flia.)						
Asteroideae (Sflia.)	1.01	Ef.	Equi	2.02	Ia	1
cf. <i>Baccharis bogotensis</i>	1.14	Pr-Ef.	Eq	2.77±0.5	El	2
cf. <i>Hieracium avilae</i>	1.07	Pr-Ef.	Equi	1.85	El	1
cf. <i>Laestadia muscicola</i>	1.02	Pr-Ef.	Eq	3.25	El	1
cf. <i>Lecocarpus</i>	1.07	Pr-Ef.	Equi	2.4	Mp	1
cf. <i>Loricaria colombiana</i>	0.99	Ef.	Equi	1.35±0.45	Tc	1
Brassicaceae (Flia)						
cf. <i>Nasturtium officinale</i>	1.5±0.1	Pro.	Ret	Na	Sc	2
Chloranthaceae (Flia)						
cf. <i>Hedyosmum angustifolium</i>	0.98	Ob-Ef.	R. M-eq	Na	Scr	1
cf. <i>Hedyosmum scaberrimum</i>	0.93	Ob-Ef.	R. M-eq	Na	Scr	1
cf. Euphorbiaceae (Flia)	0.78	SubOb.	M-R.	Na	Ia	1
cf. <i>Acalypha</i>	0.81	SubOb.	M-R.	Na	Ia	1
cf. Fagaceae (Flia.)						
cf. Castaneoideae Orsted.	1.71±0.07	Pr.	E. R.	Na	Ms	2
cf. Quercoideae Orsted.	0.99	Ef.	R.	Na	Ia	1
cf. <i>Quercus</i>						
cf. <i>Lobatae</i> sec.	1.21	SubPr.	M-V	Na	Ms	1
cf. Geraniaceae (Flia.)	1.15	SubPr.	Pi	0.80	Ia	1
cf. <i>Geranium</i>	1.71±0.44	SubPr.	Pi-R.	2.26±0.75	Ia	2
cf. Isoetaceae (Flia.)	1.22-1.77	Pr. (Sub)	E. M-V	Na	Ia-Tc	6

Taxón	P/E	Forma	Ornam.	Es/Pi	Ape.	N
cf. <i>Isoetes howellii</i>	1.12	Pr-Ef.	Ps. M-R	Na	Ia	1
cf. Lycopodiaceae (Flia.)	31.41±4*	Trilete	Fo-Ps	Na	Ls	12
cf. <i>Huperzia</i>	34.93±4*	Trilete	Fo-Ps	Na	Ls	6
cf. Myrtaceae (Flia.)						
cf. Myrteae	33.9±2.9*	Trilete	Ps	Na	Psc	4
cf. Plantaginaceae (Flia.)						
cf. <i>Plantago</i>	1.08±0.04	Pr-Ef.	V. M-Eq	Na	Ia-Pp	4
cf. Poaceae (Flia.)						
cf. <i>Bromus lanatus</i>	1.42	Pr	E. M-Eq	Na	Mp	1

Nota: (*) Para las familias de esporas Lycopodiaceae y de polen Myrtacea dada su morfología triangular se toma como referencia de medida el ancho ecuatorial en μm . Abreviaciones: Ef=Esferoidal, Pr=Prolado, Ob=Oblado; Ia= inaperturado, El= endoapertura lalongada, Mp=Monoporado, Tc=Tricolporado, Sc=Sulcado, Scr= S. ramificado Ms=Monosulcado, Psc=Parasyncolpado, Pp=Poliporado, Ls=lesura; Equi=Equinulado, Eq=Equinado, Pi=Pilato, M=Micro, -Eq= -equinado, -V=Verrugado, -R=rugulado, R.= Reticulado, E.= Escábrido, P=Psilado, Fo=Foveolado; Na: No aplica.

Tabla 4.

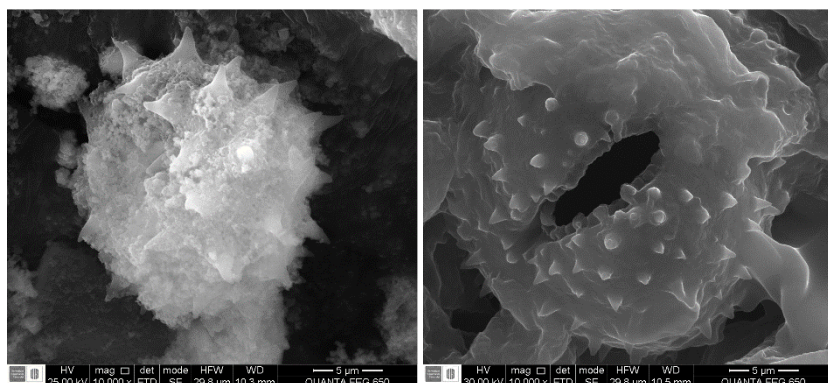
Principales características de los granos de polen de la categoría II identificables, no clasificados. Ornament: Ornamentación; Aper: Tipo de apertura.

Espécimen	Tamaño	Forma	Ornament.	Aper.
83-84_003	Muy Peq.	Pr-Ef.	Verrugado	Ia
102-103_003	Pequeño	Navicular	Rugulado	Sc
109-110_008	Pequeño	Trilete	Psilado	Ia
123-124_004	Mediano	Suboblado	Rugulado	Ia
123-124_008	Pequeño	Pr-Ef.	Rugulado	Ia
123-124_010	Mediano	Esferoidal	Fo – R.	Ia
163-164_004	Mediano	Pr-Ef.	M– R.	Sc
217-218_009	Grande-Med	Trilete	Psilado	Ls

Espécimen	Tamaño	Forma	Ornament.	Aper.
299-300_029	Peq.-Med	Prolado	Psilado	Ia
364-365_035	Pequeño	Esferoidal	Psilado	Ia
384-385_006	Mediano	Pr-Ef.	Psilado	Ms
384-385_008	Mediano	Subprolado	Psilado	Ia
384-385_010	Pequeño	Suboblado	Rugulado	Sc

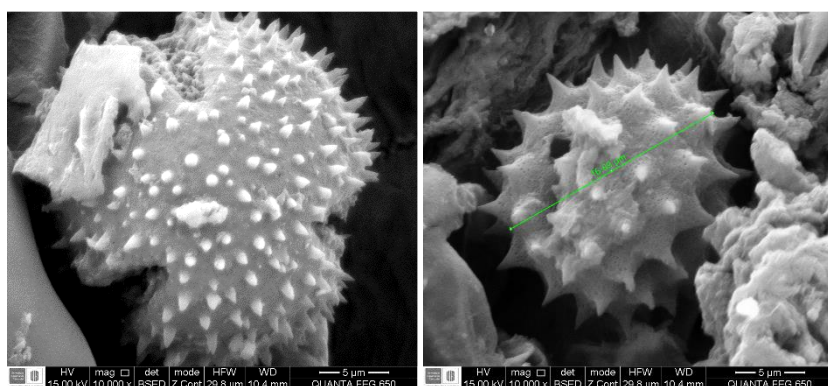
Nota: Las abreviaturas son las mismas que la tabla 3. Los números de cada espécimen son los rótulos que se les dio a cada muestra después de la perforación por profundidad (eg. 384-385) y seguida la enumeración correspondiente al espécimen por cada muestra (eg. _010), se toma esta nomenclatura para diferenciar cada espécimen debido a que fueron especies no clasificadas.

62 Imágenes SEM de las muestras de polen clasificadas



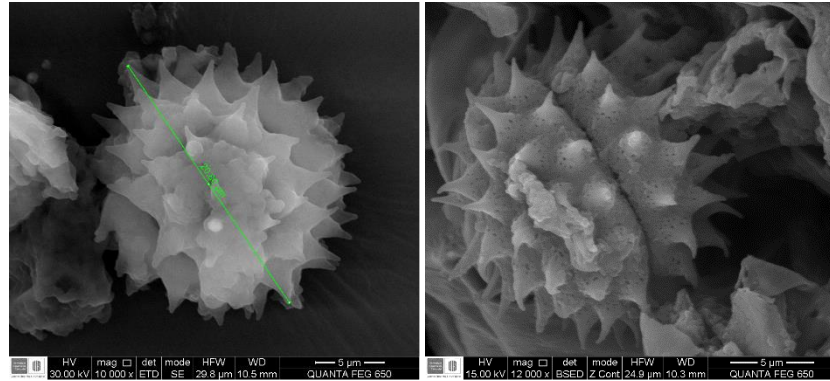
A.

B.



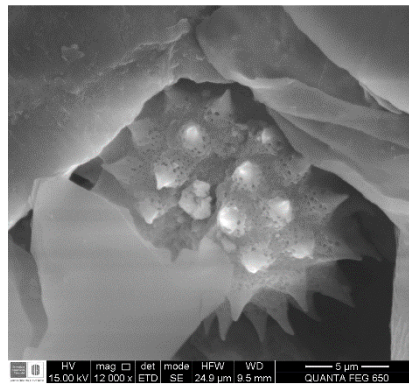
C.

D.



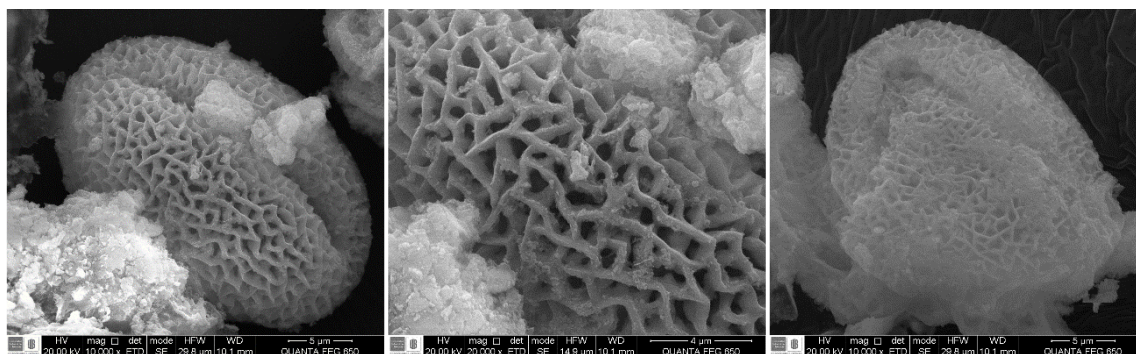
E.

F.



G.

Figura 11. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Asteraceae. A. Asteraceae B. cf. Hieracium avilae sp. C. cf. Loricaria colombiana sp. D. cf. Lecocarpus E-F. cf. Baccharis bogotensis sp. G. cf. Laestadia muscicola sp.

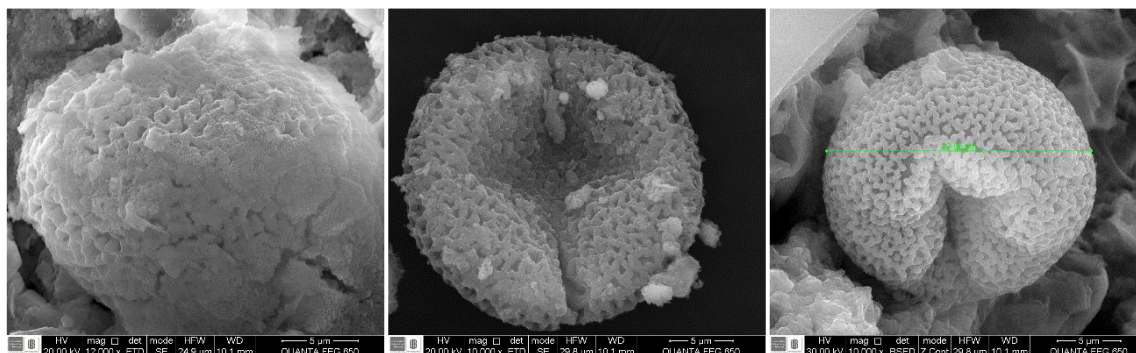


A.

B.

C.

Figura 12. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Brassicaceae. A. cf. *Naturium officinale* sp. B. Lumina irregular poligonal, ornamentación reticulada de *N. officinale* sp. C. cf. *N. officinale* sp.

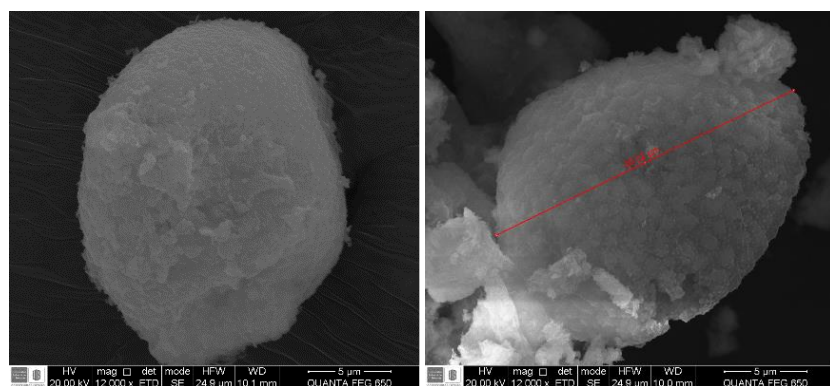


A.

B.

C.

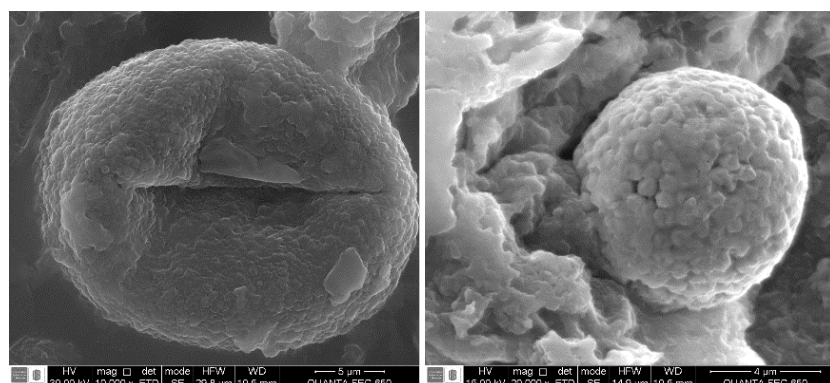
Figura 13. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Chloranthaceae. A. cf. *Chloranthaceae* B. cf. *Hedyosmum scaberrimum* sp. C. cf. *Hedyosmum angustifolium* sp.



A.

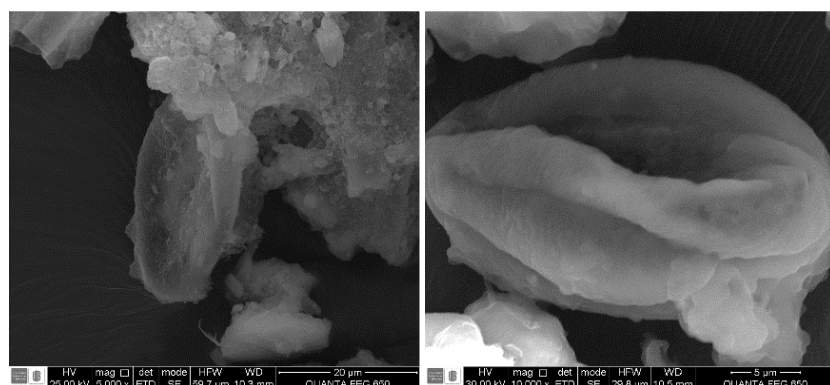
B.

Figura 14. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Euphorbiaceae. A. *Alcalypha* sp.



A.

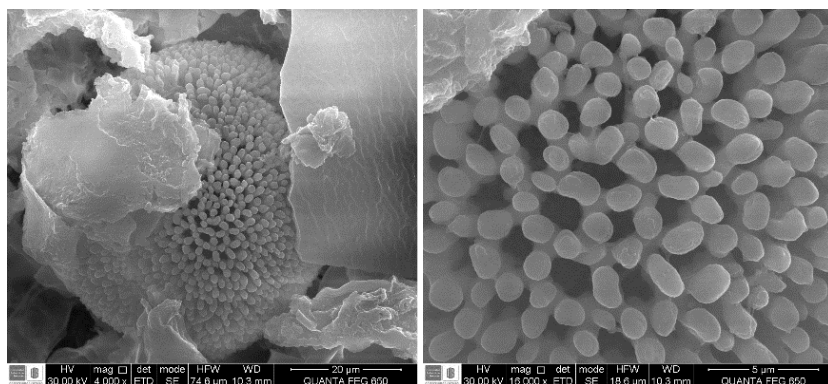
B.



C.

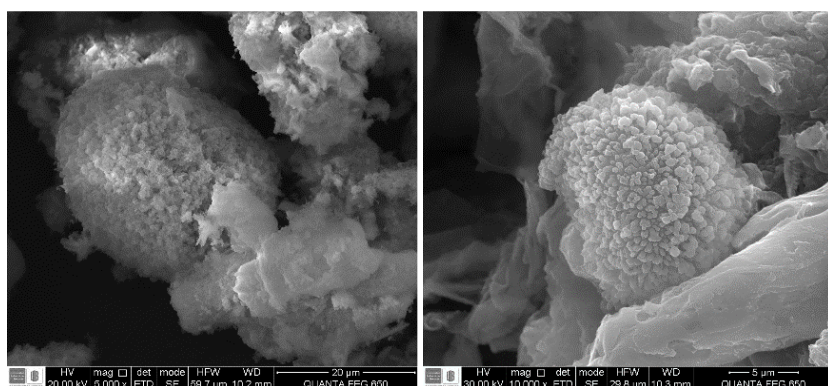
D.

Figura 15. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Fagaceae. A. cf. *Quercus* sec. Lobatae. A-B. cf. *Quercoideae* Õrsted. C-D. cf. *Castaneoideae* Õrsted.



A.

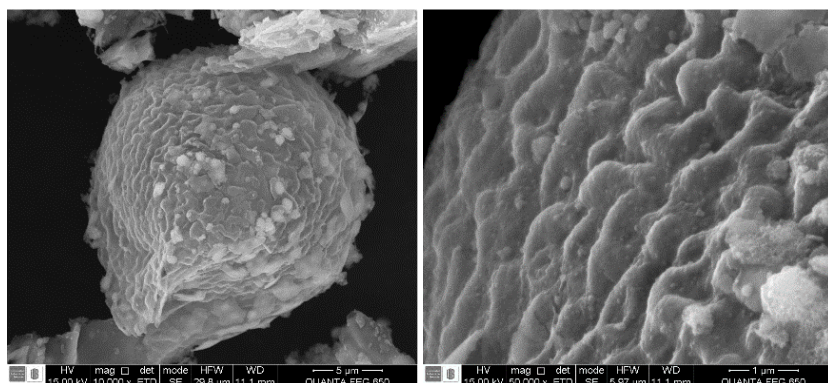
B.



C.

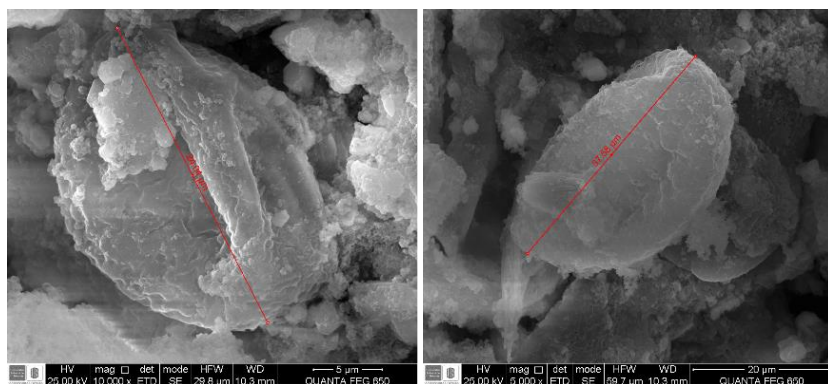
D.

Figura 16. Fotografías SEM de granos de polen de la Familia Geraniaceae. A. Geranium B. Ornametación de Geraniaceae, pilato reticulado C. Geranium D. cf. Geraniaceae.



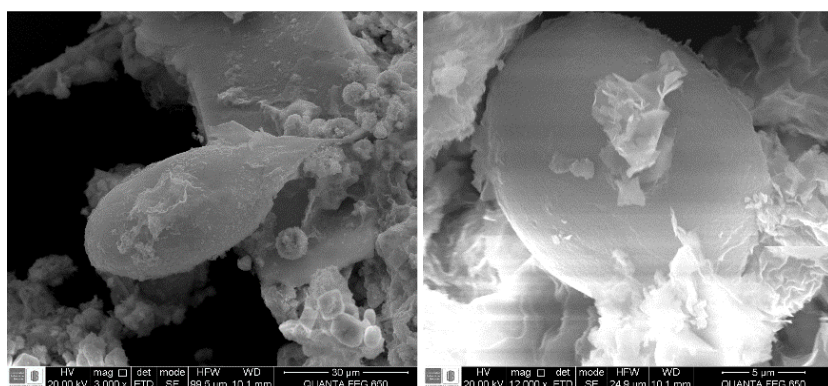
A.

B.



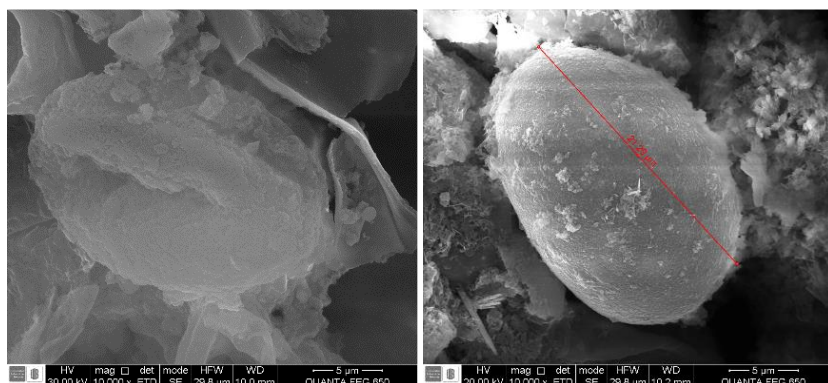
C.

D.



E.

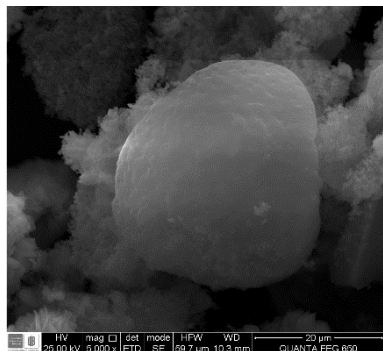
F.



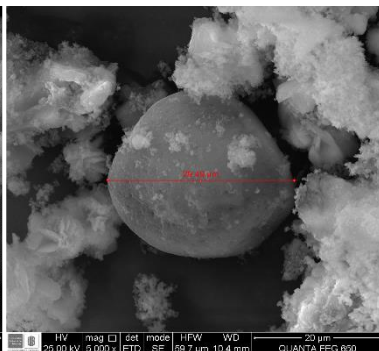
G.

H.

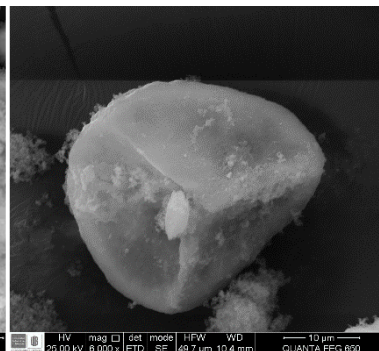
Figura 17. Fotografías SEM de granos de microesporas de la Familia Isoetaceae. A-B. cf. *Isoetes howellii* sp. B. Ornamentación Rugulada C-H. cf. *Isoetes*



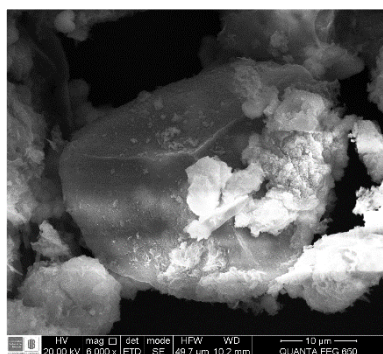
A.



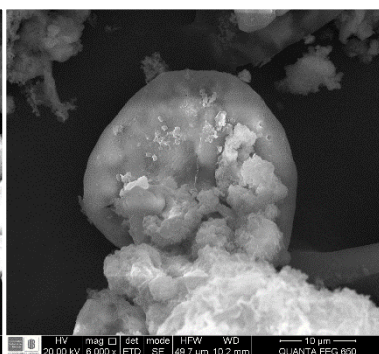
B.



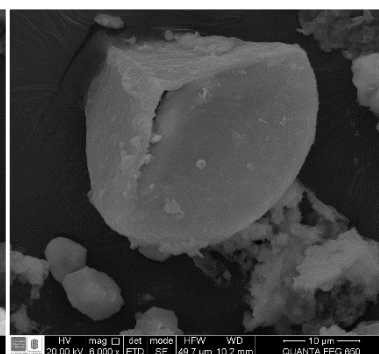
C.



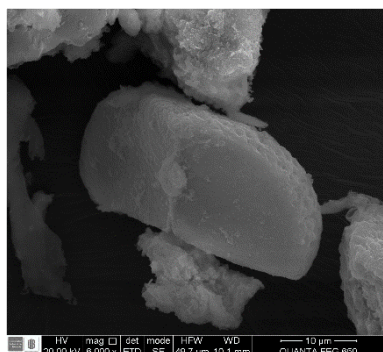
D.



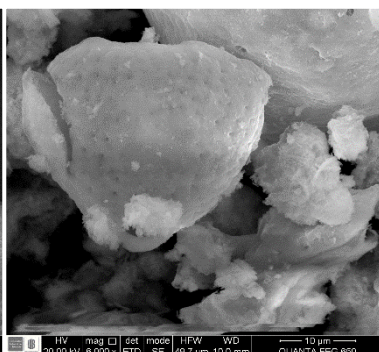
E.



F.



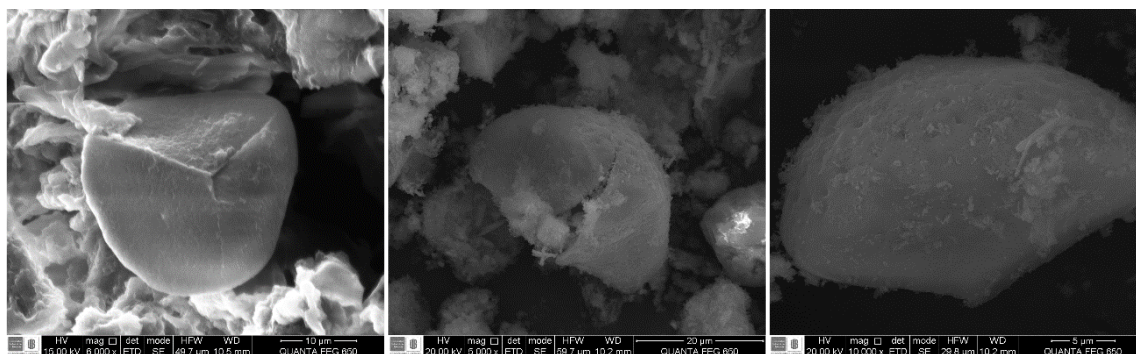
G.



H.



I.

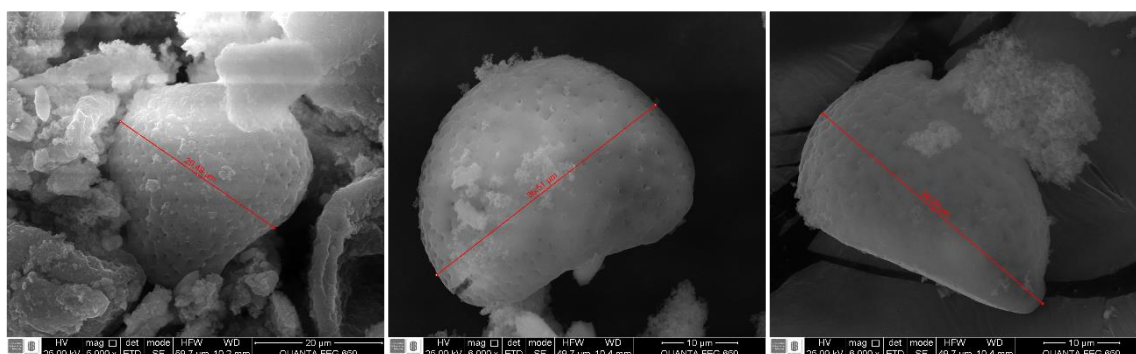


J.

K.

L.

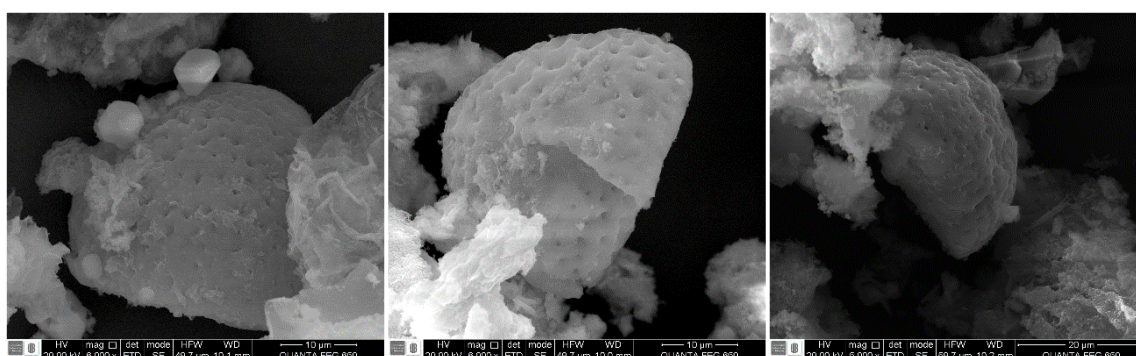
Figura 18. Fotografías SEM de Lycopodiaceae A-L. Esporas foveoladas de la Familia cf. Lycopodiaceae. A-B-H-K-L. Cara distal de las esporas C-D-E-F-G-I-J. Cara proximal.



A.

B.

C.

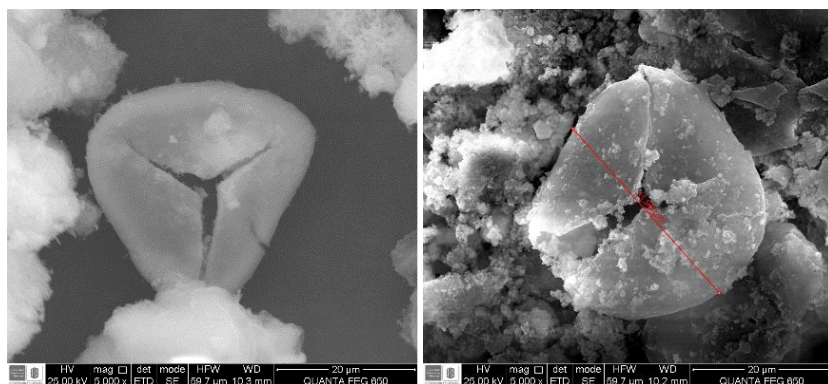


D.

E.

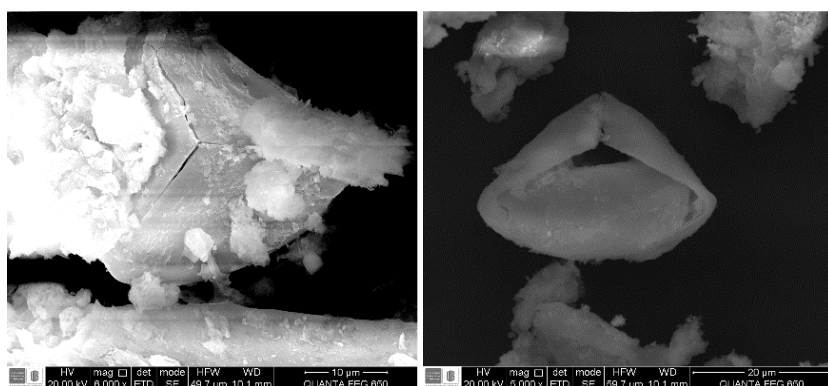
F.

Figura 19. Fotografías SEM de esporas de la Familia Lycopodiaceae A-F. Ornamentación foveoladas en cara distal de especies de cf. Huperzia.



A.

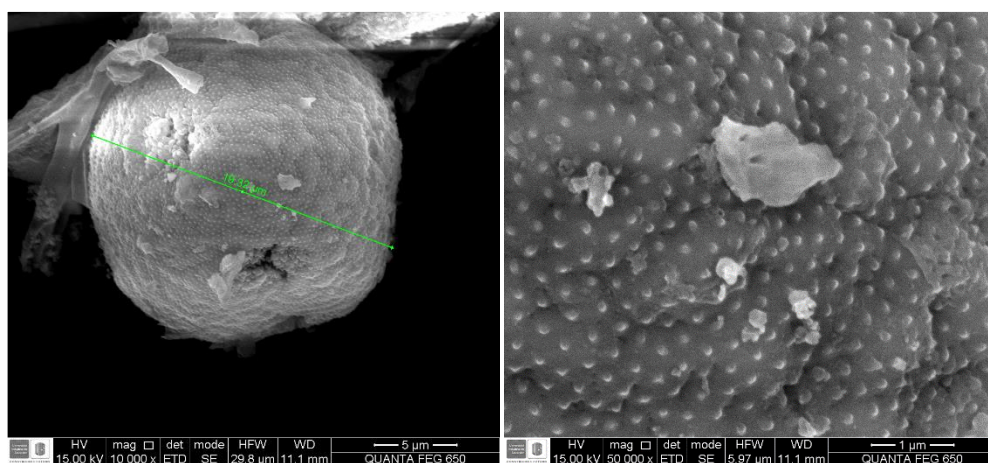
B.



C.

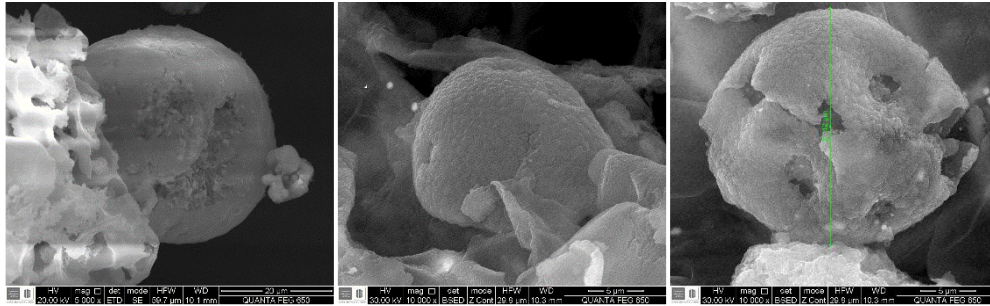
D.

Figura 20. Fotografías SEM de polen parasyncolpado con colpi angular de ornamentación psilada de la Familia cf. Myrtaceae tribu Myteae.



A.

B.



C.

D.

E.

Figura 21. Fotografías SEM de polen de la Familia Plantaginaceae A-E. Especies del género cf. *Plantago* B. Ornamentación verrugada – micro equinada E. Grano de polen poliporado de cf. *Plantago*.

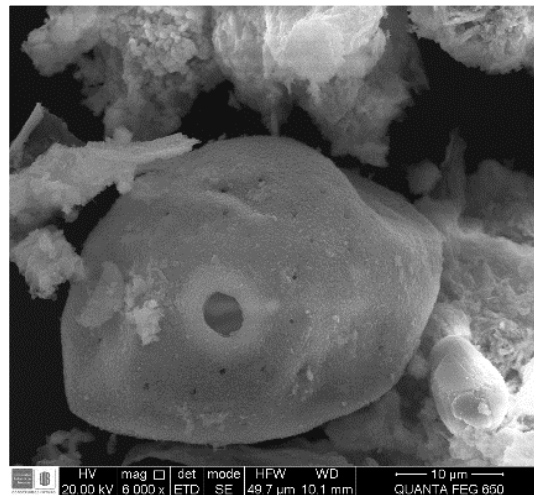


Figura 22. Fotografía SEM de polen de la Familia Poaceae, monoporado con ánulo, de ornamentación escábrida- micro baculado de la especie cf. *Bromus lanatus* sp.

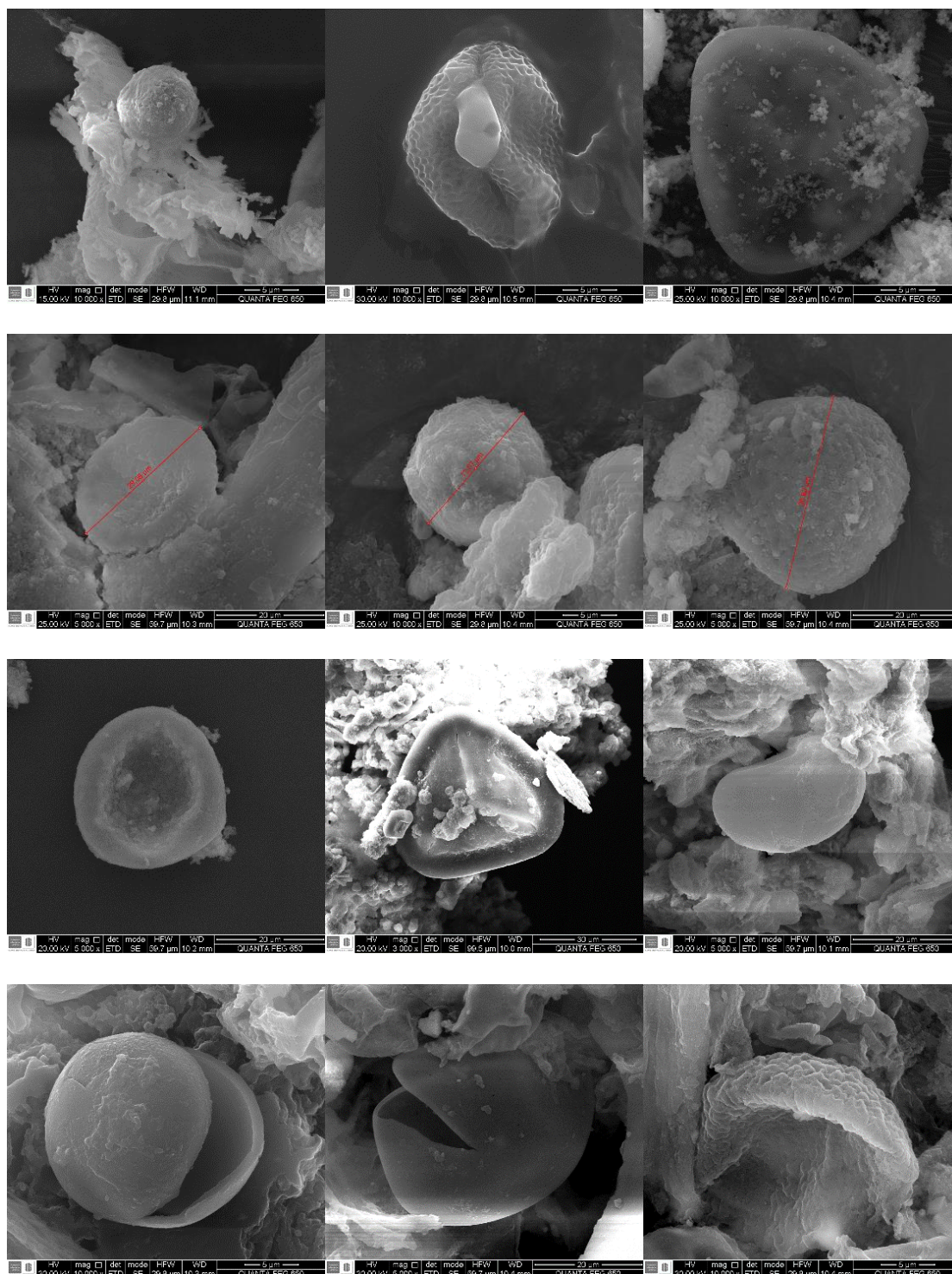


Figura 23. Granos de polen o esporas pertenecientes a la Categoría II "identificables, no clasificados".

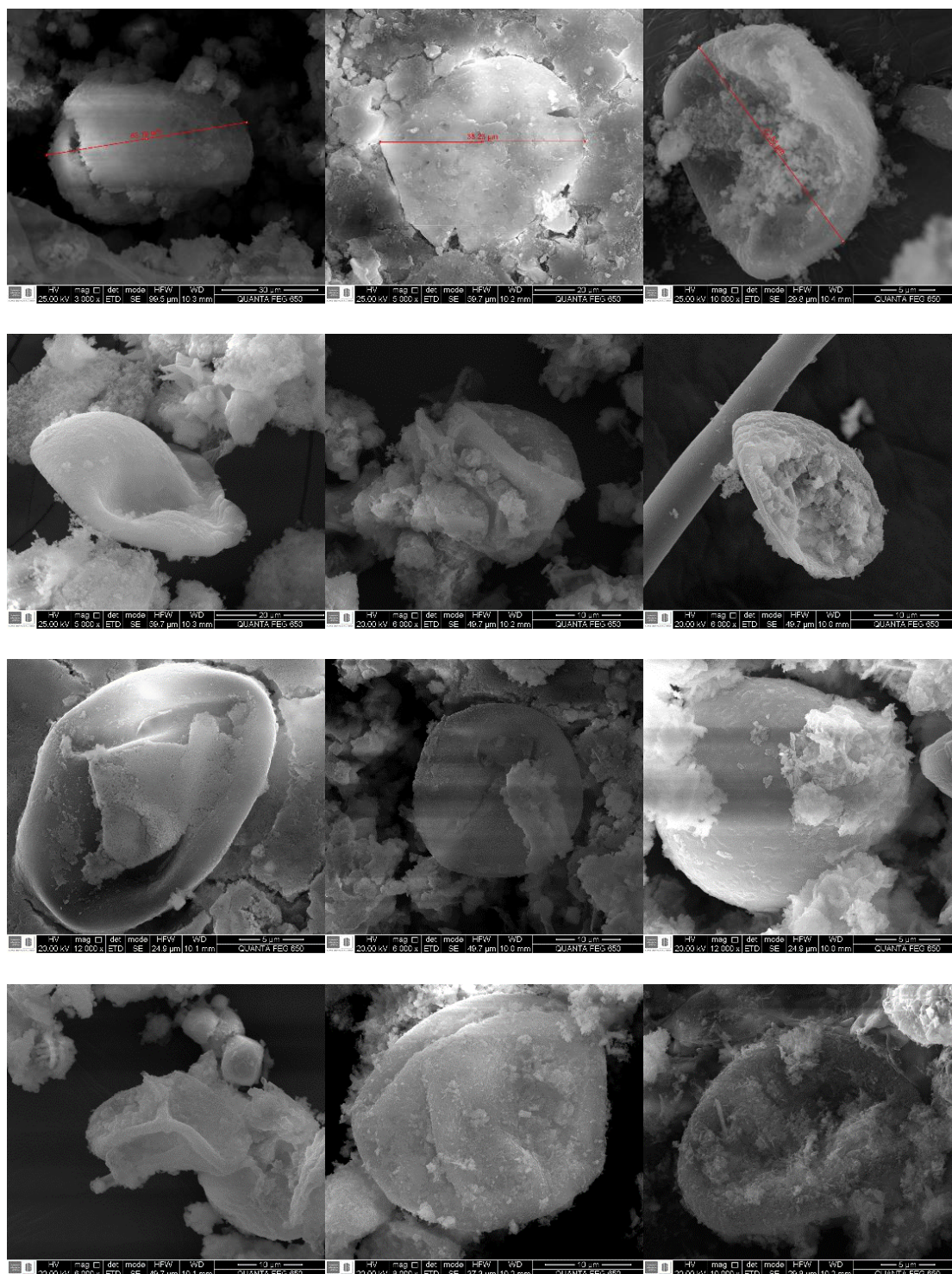


Figura 24. Granos de polen o esporas pertenecientes a la Categoría III "no identificables".

6.3 Protocolo metodológico para el análisis de muestras de polen y esporas fósil por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

6.3.1 Preparación química de las muestras de polen. Para la preparación de las muestras inicialmente se debe pesar la cantidad de sedimento a utilizar (de 1 a 3 gramos por muestra) y traspasar éste a un tubo falcón de al menos 15 ml, para éste estudio se utilizó un tubo de 50 ml debido a la centrifuga. Las muestras deben estar a temperatura ambiente y seguidamente se llevará a cabo el protocolo químico que se describe a continuación.

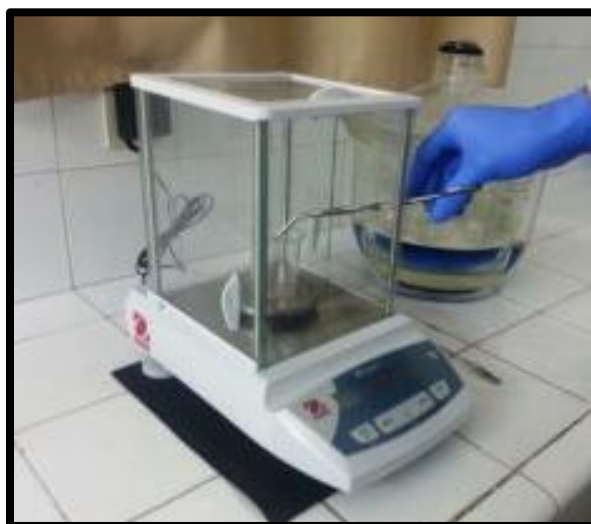


Figura 25. Fotografía de balanza de peso en laboratorio.

Paso 1. Tratamiento con Hidróxido de Sodio.

A la muestra de sedimento se le añaden 5 ml de NaOH al 10% y se dejan reaccionar durante 5 minutos removiendo continuamente para que la muestra se disgregue. Posteriormente se calientan a baño maría durante 20 minutos y se remueve cada 5 minutos con varillas de vidrio. Finalmente se enfrían las muestras con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 14 ml.

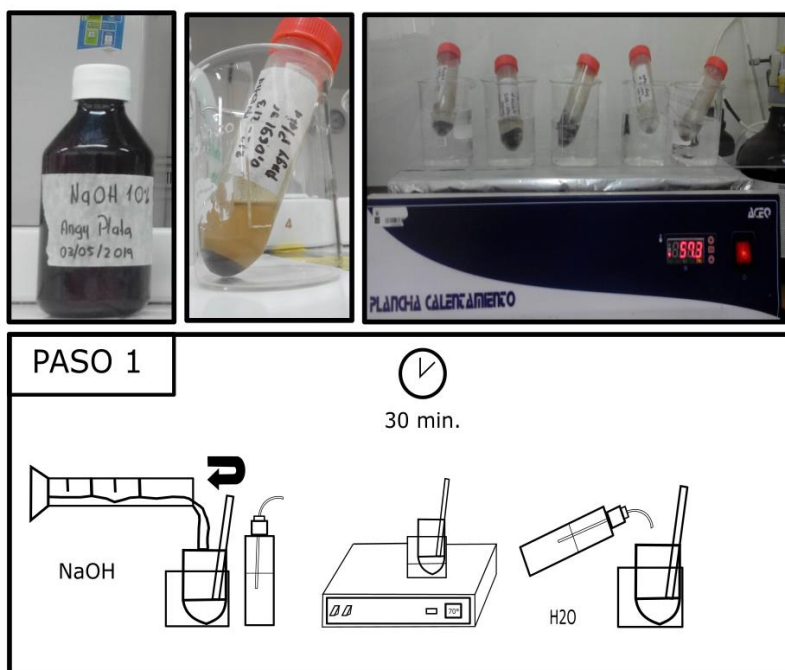


Figura 26. Tratamiento con NaOH. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 1.

El objetivo de éste proceso es la eliminación de ácidos húmicos y la disgregación del material sedimentario.

Paso 2. Tamizado.

El producto final del paso 1 se filtra. Existen varios métodos para lograrlo, uno es el método de decantación, que implica dejar que el ácido y la mezcla de muestra se asienten y luego decantar cuidadosamente el ácido, rellenar con agua destilada y repetir hasta que el líquido sea neutro, pero este es un método que lleva mucho tiempo. Otro método es y el que se usó para éste estudio es con una malla de nylon de 10 o 20 μm de apertura, se filtra para eliminar el material vegetal de tamaño de grano mayor y obtener el polen concentrado en solución. Existen muchos tipos de mallas, de diferente material y apertura, por ejemplo, las de poliéster también se pueden usar pues son

similares al nylon y ofrecen resistencia a la abrasión, pero son menos afectadas en la presencia de los ácidos que el nylon.

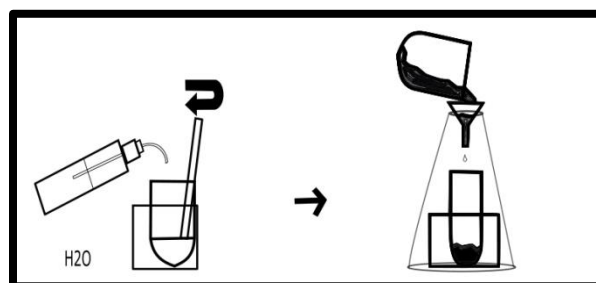


Figura 27. Esquematización del tamizado

Se centrifuga durante 3 minutos a 3000 rpm, se decanta y se elimina el sobrenadante. Se repite este último paso con agua destilada (hasta 7 ml) de 2 a 3 veces hasta obtener el agua incolora. La centrifuga utilizada es la Centrifuga Universal Digital PLC-025 Gemmy.

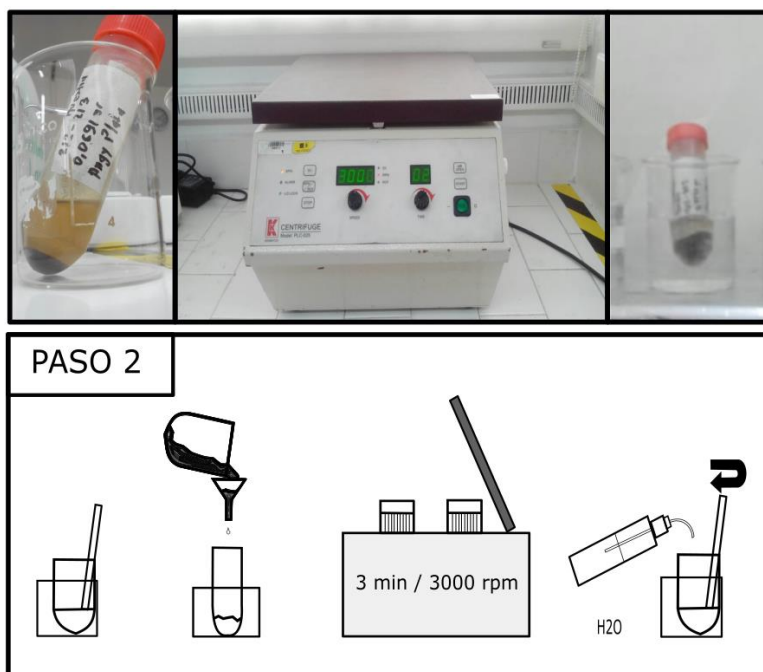


Figura 28. Tamizado. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 2.

El objetivo de éste paso es obtener el polen concentrado. Nota: Todos los sobrenadantes deben ser debidamente trasvasados y desechados al contenedor de residuos.

Paso 3. Tratamiento con Ácido Clorhídrico.

Al producto obtenido en el paso 2 se le añadieron entre 5 y 10 ml de HCl al 10%, éste se debe verter con cuidado ya que la muestra puede efervescer al contacto con carbonatos, se remueve poco a poco para disgregar el sedimento y que el reactivo pueda actuar en toda la muestra. Se calienta al baño maría durante 20 minutos removiendo constantemente. Se enfría con agua destilada hasta 14 ml y se centrifuga durante 3 minutos a 3000 rpm, se decanta y se elimina el sobrenadante. Se repite este último paso de 2 a 3 veces hasta obtener el agua incolora.

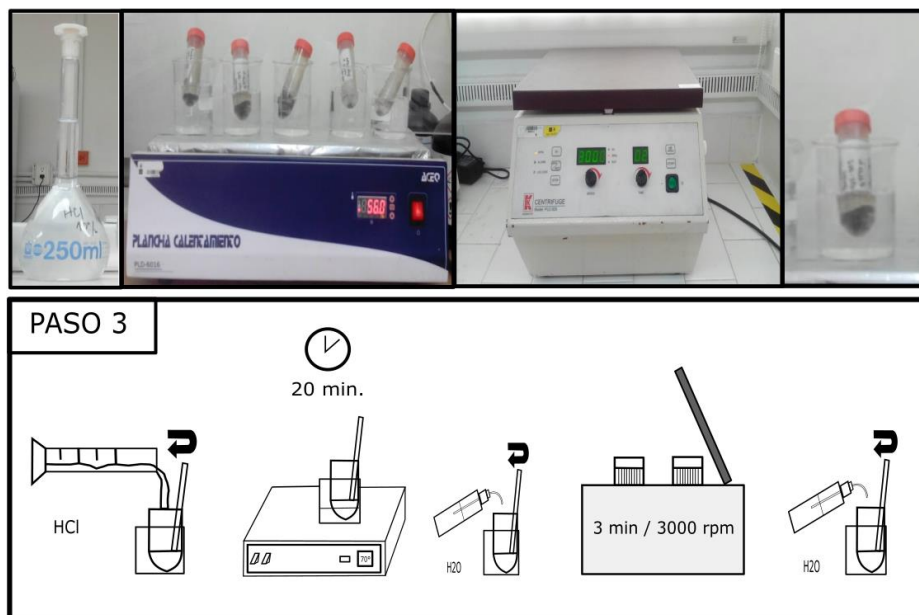


Figura 29. Tratamiento con HCl. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 3.

El objetivo del tratamiento con HCl es la disolución de los carbonatos.

Paso 4. Tratamiento con Ácido Fluorhídrico.

Pasos de seguridad para la Manipulación de Ácido Fluorhídrico:

1. Especificar el uso de ácido fluorhídrico en la hoja de servicio del laboratorio y/o informar al responsable o técnico del laboratorio que se procederá a manipular HF.
2. Las soluciones de HF deben de ser siempre manipuladas dentro de campanas de ventilación (con la extracción conectada) destinadas a trabajar con sustancias ácidas y corrosivas.



Figura 30. Fotografía de la campana de ventilación del laboratorio.

Asegurarse de que se conoce la localización de todo el equipo de seguridad en caso de derrame: gel y pastillas de gluconato cálcico, solución de carbonato cálcico, Cal apagada (Ca(OH)_2), manguera de agua.

3. Se debe extraer de la campana cualquier instrumento de vidrio (vasos de precipitado, varillas, etc.) ya que el HF ataca el vidrio y lo disuelve.
4. Además de la ropa de laboratorio obligatoria (bata, gafas y guantes, pantalón largo y zapato cerrado resistente), hay que llevar un delantal de goma o desechable por encima de la bata, otro par de guantes adicional resistentes al HF (guantes de neopreno), y la máscara de respiración.

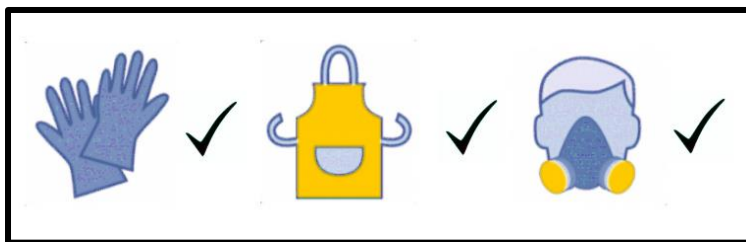


Figura 31. Elementos de protección en el laboratorio para la manipulación de HF.

5. Preparar los instrumentos a utilizar, éstos deben ser de teflón o plástico únicamente (vasos de precipitado, varillas, etc.).
6. Finalmente, al momento de usar el ácido asegurarse de utilizar la mínima cantidad posible de HF para minimizar los efectos de un posible derrame.

Después de repasar los pasos de seguridad, al producto del paso anterior se le añadieron 25 ml de HF al 40% con una pipeta de volumen digital, y se dejó reaccionar durante 3 horas al baño maría, removiendo cada 30 minutos. Se enfrió la muestra añadiendo etanol hasta un volumen de 14 ml, se centrifugó y decantó, este proceso se repite 2 veces. Seguidamente se lavó con agua destilada y se volvió a centrifugar, se decanta y se elimina el sobrenadante, se repite este paso de 2 a 3 veces.

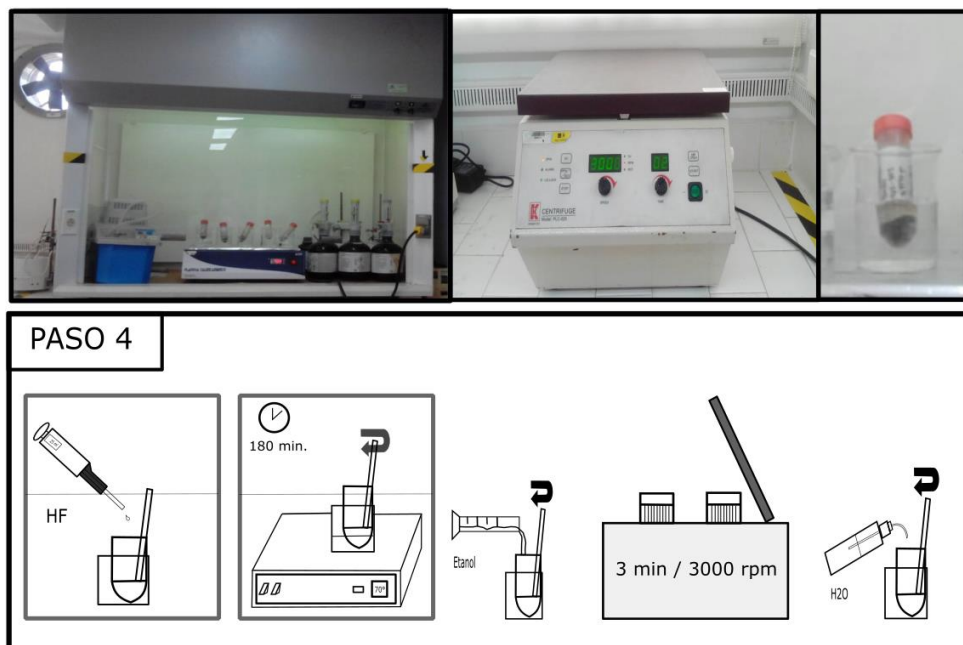


Figura 32. Tratamiento con HF. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquemización del paso 4.

El objetivo del tratamiento con HF es la eliminación de filosilicatos.

Paso 5. Tratamiento con Ácido Clorhídrico.

Al producto obtenido se le añadieron entre 5 y 10 ml de HCl al 10%. Se dejó reaccionar 5 minutos. Se repite el proceso de calentamiento y enfriamiento del paso 3. Se centrifuga se decanta y se elimina el sobrenadante. Se lava con agua destilada y se centrifuga. Se repite este paso de 2 a 3 veces.

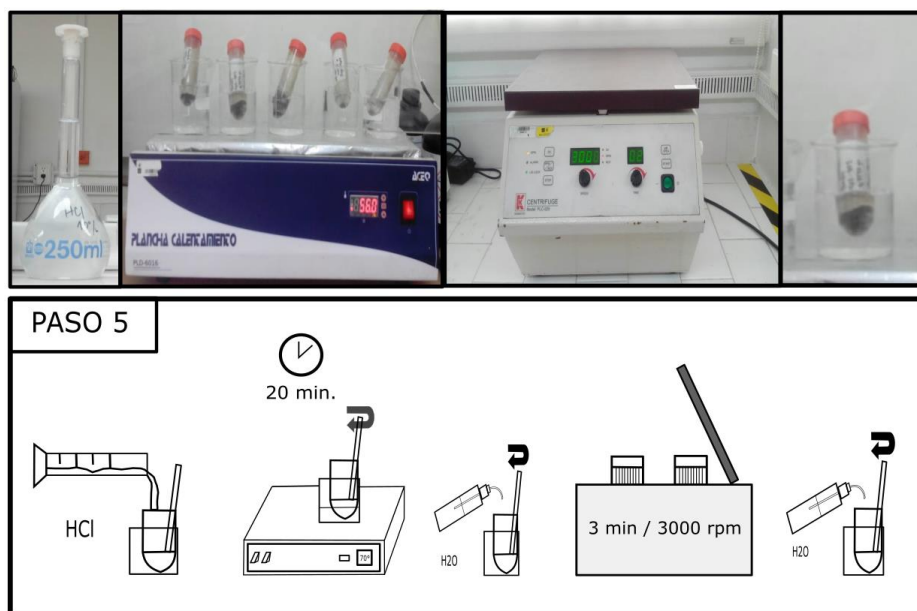


Figura 33. Tratamiento con HCL. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 5.

El objetivo del tratamiento con HCl es la disolución de los posibles fluorosilicatos o cristales de fluorita formados debido al paso 4.

Paso 6. Acetólisis

El ácido acético glacial es un compuesto de ácido acético anhídrido (sin agua), con éste compuesto al 97% en concentración más ácido sulfúrico al 96%, en una proporción 9:1 respectivamente se prepara la mezcla acetólica a utilizar, siempre se deben mezclar en el orden mencionados. Al ponerse en contacto los dos reactivos, la probeta se calienta un poco.

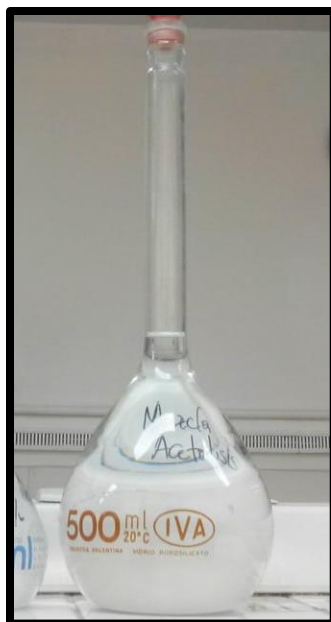


Figura 34. Fotografía de la Mezcla Acetólica preparada en laboratorio.

Al producto del paso 5 se le añade primero 7 ml de ácido acético glacial, se remueve y se centrifuga por 3 minutos, se decanta y se elimina el sobrenadante. Este proceso se hace para asegurar que el contenido del tubo falcón quede libre de agua pues al contacto con la mezcla puede producir una reacción exotérmica (Rull et al., 2015).

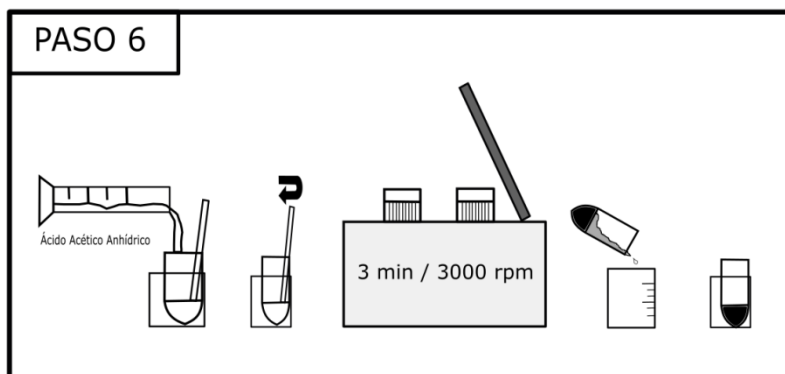


Figura 35. Esquemmatización del paso 6 Acetólisis.

Seguidamente, se agrega 5 ml de la mezcla acetólica al producto y se calienta a baño maría por 4 minutos. Se deja reposar y se lava con agua destilada, se centrifuga, se decanta y se elimina el sobrenadante. Se repite este proceso de 2 a 3 veces hasta que el sobrenadante salga limpio.

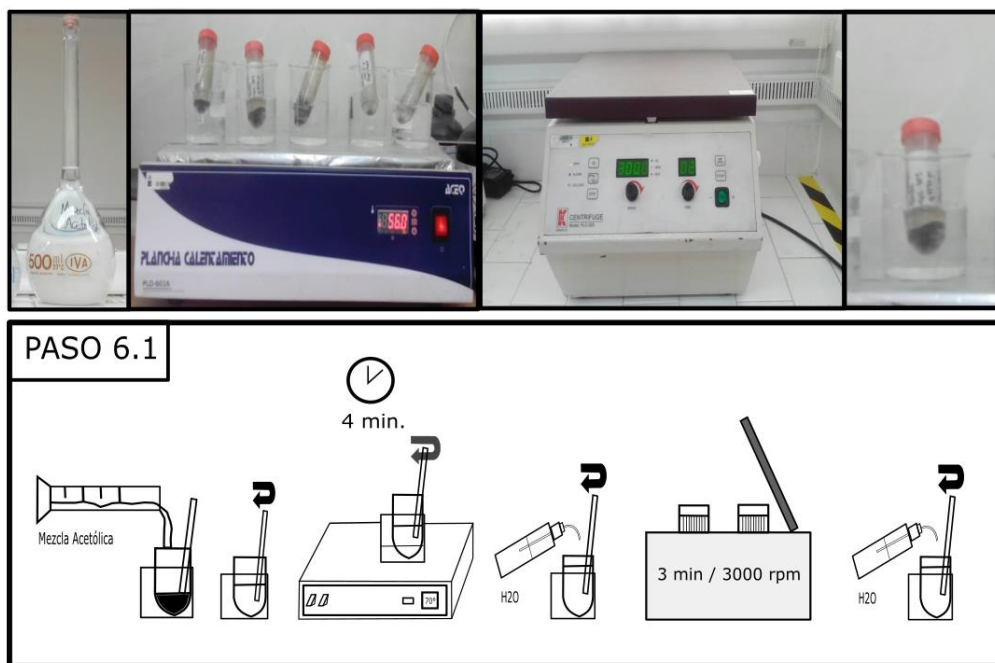


Figura 36. Acetólisis. Arriba. Fotografías en laboratorio. Abajo. Esquematización del paso 6.

El objetivo del tratamiento con ácido acético glacial es la eliminación del contenido celular de los granos de polen y de la celulosa.

Paso 7. Alícuota - Residuo Final

Al residuo de polen se le añaden 5 a 3 ml de etanol al 50% y se centrifuga por 4 minutos, se retira el sobrante y se repite éste proceso con concentraciones de etanol de 75% y 95% respectivamente. El residuo final se añade a un vidrio reloj y se seca en la estufa a una temperatura creciente de 50° a 80°C.

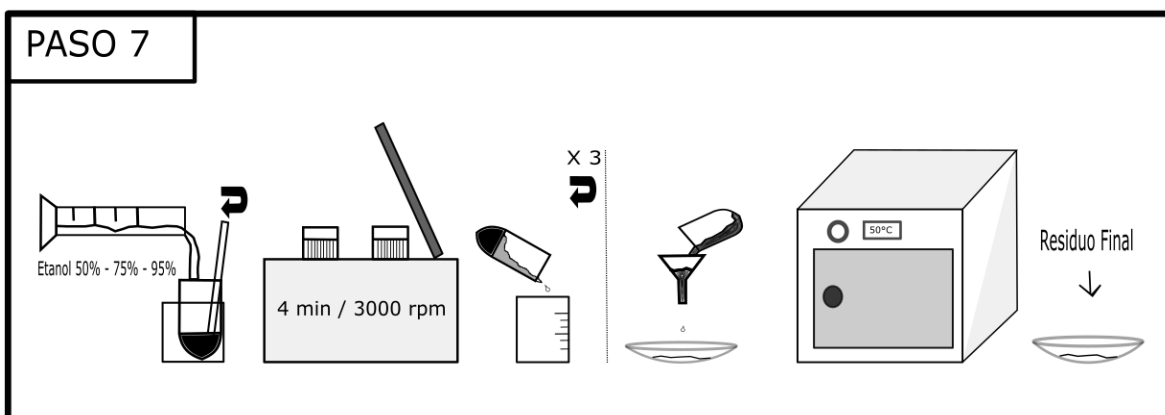


Figura 37. Esquematización del paso 7. A la izquierda se esquematizan las alícuotas de etanol a diferentes concentraciones, y a la derecha la filtración y secado del residuo final.

El objetivo del tratamiento con etanol es rehidratar y obtener el concentrado polínico.

6.3.2 Análisis en el Microscopio Electrónico de Barrido. Una vez obtenido el residuo final, el cual ha sido previamente secado para eliminar cualquier rastro de humedad (Paso 7) con la finalidad de realizar el vacío para el análisis en el Microscopio Electrónico de Barrido, es necesario llevar a cabo una preparación adicional de la muestra.

Paso 8. Recubrimiento con oro

El residuo final obtenido en el paso 7 se pasa muy cuidadosamente con una espátula fina del vidrio reloj a las láminas/cintas de carbono doble cara que ya están puestas sobre el porta-objetos, se deben marcar los porta-muestras para evitar confusiones. Las muestras se recubren con oro, en la máquina evaporadora Quórum Q150R (Figura 38). Fotografía de la Máquina Evaporadora Quórum Q150R.) la cual elimina la humedad restante en la muestra y permite la adherencia del metal.

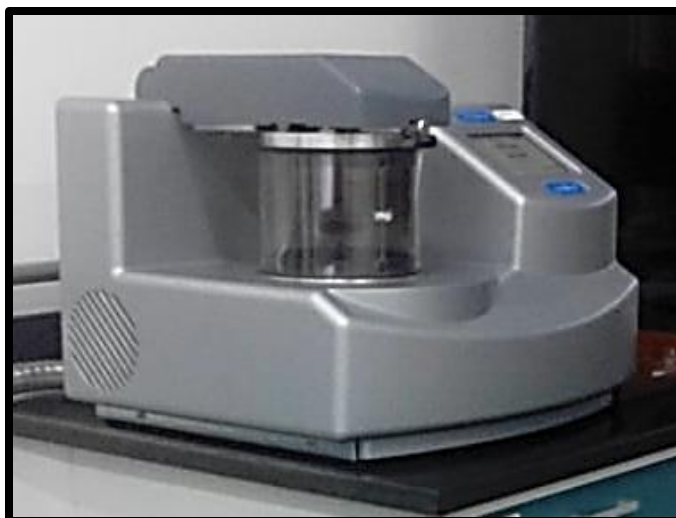


Figura 38. Fotografía de la Máquina Evaporadora Quórum Q150R.

Paso 9. Análisis SEM

Una vez la muestra está libre de humedad y tiene el recubrimiento de oro, se procede a la examinación de ésta en el microscopio electrónico de barrido. Este proceso, para los objetivos de este estudio, se enfoca principalmente en el análisis morfológico de las especies en pequeña escala con una alta resolución, debido a los tamaños del polen que varían de 5 a 50 micrómetros, por lo que las magnificaciones para obtener una imagen nítida pueden variar es sí mismas de 3000X a 12000X.

Una vez realizado el montaje de los porta-objetos en el SEM (Figura 39. Fotografía de los porta-objetos ya recubiertos montados en el Microscopio Electrónico de barrido para ser analizados.) se procede a buscar en cada uno, las muestras de polen visibles con un aumento de imagen que permita primero una visibilidad general de las muestras (Figura 17-E) y luego, uno mayor que permita la visibilidad de la morfología del polen (Figura 13-B). Con fines de mayor facilidad de análisis, se debe tomar al menos dos fotografías por muestra, una que permita la visualización del tamaño del grano de polen, su forma y estructura y otra a mayor ampliación que permita observar

de cerca la ornamentación del polen (Figura 16-A, B). La facilidad en la toma de éstas imágenes dependerá de la calidad del microscopio, de la habilidad del técnico del laboratorio y del tamaño y calidad de las muestras, cabe resaltar que es posible que se presenten ciertos inconvenientes a la hora de acercar el microscopio al ejemplar debido a que los electrones incidentes al interactuar de cerca pueden quemar la superficie del metal y debido a esto el grano de polen puede moverse, y dificultar o no permitir la toma de la imagen.

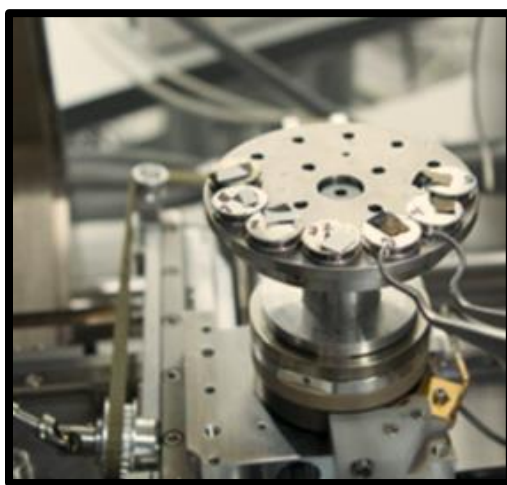


Figura 39. Fotografía de los porta-objetos ya recubiertos montados en el Microscopio Electrónico de barrido para ser analizados.

6.3.3 Análisis de las imágenes SEM. Paso 10. Descripción y clasificación de las imágenes de granos de polen

Justo a continuación de obtener las imágenes, se describe cada una de ellas para su clasificación (ver resultados en apartado 7), ésta descripción se lleva a cabo realizando primero una caracterización morfológica de los especímenes, se puntualiza el tipo de grano, la polaridad, las aberturas, la forma, la estructura y/u ornamentación de todas las imágenes, y con estos datos y haciendo un trabajo extensivo de comparación bibliográfica de los especímenes en los artículos y

atlas específicos de cada taxón (Ver referencias bibliográficas), se puede empezar a definir a qué familia pertenecen éstos granos de polen. En algunos casos particulares se hacen mediciones específicas como la altura del báculo o espina (en los equinados) (Figuras 11;16), del ancho de la lúmina (en los reticulados) (Figuras 12;13), ancho y largo del colpo, poro o sulco, entre otros (ver Tabla 3), todo esto para determinar más fácilmente las diferencias que existen dentro de una misma familia y si es el caso los diferentes géneros y especies que se puedan llegar a identificar dentro de cada una ellas. Se pueden llegar a encontrar ciertas dificultades al tratar estas imágenes SEM, debido a que una cantidad considerable de los granos de polen se pueden llegar a ver afectados por el proceso químico de separación del sedimento o pueden quedar ocultos debido al montaje en la lámina de carbono en el porta-objetos, debido a eso se encuentran granos de polen que no son identificables y no se pueden clasificar (Figura 23).

6.4 Ventajas y limitaciones del análisis de granos de polen por SEM

Uno de los problemas más recurrentes en palinología mencionado por varios investigadores, es la limitación en cuanto a la descripción de especies de polen debido a la baja resolución taxonómica (Birks & Birks, 2000; Jackson & Booth, 2007; Mander, 2011; Punyasena et al., 2011, 2012b; May & Lacourse, 2012; Mander et al., 2013, 2014), lo cual, representa una ventaja para los estudios realizados con SEM, pues éste método como se puede observar anteriormente, puede dar una amplia magnificación de la imagen del espécimen manteniendo la alta calidad de ésta y es posible identificar taxones basados en la ornamentación de la superficie del polen.

En el presente estudio se identificaron tres categorías de granos de polen, la primera en la que se describieron y clasificaron satisfactoriamente los especímenes (Figuras 11 - 22), la segunda en

la cual se ubicaron aquellos que fueron posibles de describir pero no se ubicaron dentro de ningún taxón (Figura 23), y la tercera que por sus carencias de características se clasificaron como no identificables (Figura 24), la identificación de éstas tres categorías puede dar una visión cuantitativa de la dificultad en la clasificación del polen durante los análisis SEM. En general la mayoría de los granos de polen encontrados se reúnen dentro de la primera categoría (67%) la segunda y tercera categoría contienen casi la misma cantidad de imágenes (16% y 17% respectivamente), lo cual demuestra que es viable examinar muestras de polen usando SEM pues la mayoría de los ejemplares tendrán sus características visibles para su fácil identificación.

Como un factor adicional, otra ventaja en cuanto al uso del SEM para un proyecto de investigación, es que puede llegar a generar datos más precisos en cuanto a la caracterización genitiva de las especies (subfamilias, géneros, especies), sin embargo, una limitación derivada, y que se distinguió claramente en el presente trabajo, es que en cuanto a investigaciones estadísticas de conteo de polen el SEM no es muy eficiente, pues los análisis en SEM son mucho más demorados que cualquier conteo en LM debido a que la preparación de las muestras es más larga y al momento de tomar las fotografías se es difícil encontrar el polen por su tamaño en el portaobjetos y la cantidad encontrada dependerá directamente de factores como la cantidad de muestra examinada.

Dentro de las limitaciones claramente no se puede descartar el costo de los análisis, pues en gran medida la mayoría de los investigadores optan por hacer solo conteos de polen bajo el LM pues es mucho más asequible, sin embargo, como se mencionó anteriormente el alcance de los resultados puede ir aún más lejos si se hace un análisis SEM además del LM, pues se da una descripción más precisa de cualquier valor taxonómico. Así mismo, como desventaja taxonómica se puede incluir el hecho que mediante un estudio de polen solo en SEM no se podrá obtener

información de la endoapertura del polen, y en un estudio solo en LM no se proporcionará información detallada sobre la escultura del grano de polen pues bajo su aumento no es visible y puede generar confusiones y errores de nivel estructural.

Una dificultad bastante notoria que se puede incluir como un obstáculo y que se mencionó anteriormente, es que al momento de tomar las imágenes muchos de los granos de polen se pueden mover al incidir los electrones sobre ella para magnificar la imagen, y esto representa un problema debido a que varios granos de polen se pueden perder u ocultar pues se mueven demasiado en el portaobjetos, esto limita la posibilidad de tomar la fotografía.

6.4.1 Análisis de granos de polen mediante SEM versus otros métodos. El análisis en SEM tiene como limitación frente a otros métodos como la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), que mediante éste no es muy factible observar la ultraestructura y estratificación del polen Skvarla et al, (1988) demuestra que es posible hacerlo sin embargo el proceso es mucho más largo, por lo que características más especializadas para diferenciar ciertos grupos de polen de otros solo pueden obtenerse por medio de un análisis combinado de LM, SEM y TEM (Halbritter,2018).

En cuanto a los análisis con TEM requieren habilidades especializadas para la interpretación y en el ámbito de la preparación de muestras el proceso para SEM es considerablemente más fácil y rápido que para TEM, pues los procedimientos como la fijación, la tinción, la deshidratación secuencial y la tinción de secciones no son obligatorios, como lo son para TEM. Los gastos operativos totales para SEM son mucho menores que para TEM, pues en este último se utiliza una serie de materiales más costosos en la preparación de la muestra.

Se han desarrollado otros estudios de métodos para la clasificación de granos de polen tal como lo hace Torres (2016), mediante la Microscopía Holográfica Digital (MHD) y la Tomografía

Óptica (TO) en dónde además de la morfología, se aporta otros parámetros de caracterización como el índice de refracción y el espesor de las muestras en estudio, además de ser una técnica no invasiva a diferencia del SEM y TEM en los que las muestras no se pueden reutilizar para estudios posteriores. Sin embargo, la MHD en cuanto a la observación del tectum y su ornamentación se observa que su resultado de imagen puede ser el mismo en resolución que con un LM, lo cual sigue dando ventajas al uso de SEM en estudios de polen en cuanto calidad en la magnificación de las imágenes y en la posible descripción de sus rasgos estructurales.

7. Discusión

En teoría la acetólisis debe eliminar el contenido celular de las muestras de polen además de limpiar la superficie de éstos, sin embargo, existe una discusión entre los palinólogos en cuanto a si usar o no éste proceso para la separación de muestras que contienen polen fósil del sedimento, pues los granos de polen fósil podrían ser destruidos debido a que su exina es más frágil que en el polen fresco (Halbritter, 2018; Hesse, 2009). No obstante, en el presente estudio se trabajaron con muestras acetolizadas (5 muestras) y no acetolizadas (16 muestras) y al realizar el análisis SEM se pudo observar que, haciendo una proporción de las muestras de polen acetolizadas contra las no acetolizadas para la Categoría I (diferenciadas y clasificadas), se encuentra que la diferencia es de 6,5 especies de polen para el total de las muestras no acetolizadas, lo cual en porcentaje representa menos del 11% de diferencia. Por lo que se estima que no existe una diferencia significativa en cuanto a la calidad del polen obtenido, y realizar la acetólisis en éste caso no representa un daño

significativo en las muestras de polen y al contrario provee ventajas en cuanto a la limpieza de celulosa y ciertas impurezas generadas por la cristalización del material que lo rodea.

Como se manifestó anteriormente, una de las desventajas encontradas en el uso del SEM en el conteo estadístico de granos de polen fósil es que el proceso puede hacerse más largo y la cantidad de especímenes puede no ser suficiente para fines estadísticos, por lo que en este caso se observa la necesidad de realizar estudios combinados con diferentes métodos, y en el caso de utilizar solo SEM se recomienda revisar el método de grano único mencionado en Halbritter (2018).

Halbritter (2018) expone la necesidad de evitar tamizar la muestra, eso para evitar mayores pérdidas de material polínico, argumenta. No obstante, para estudios polínicos únicamente en SEM evadir el tamizado no se considera imprescindible, debido a que en muestras con alto contenido de turba evitar tamizarla podría ocasionar un problema en la visibilidad del polen pues el material restante podría ocultarlo.

8. Conclusiones

Para los análisis de granos de polen mediante Microscopía Electrónica de Barrido, es necesario garantizar que la muestra se encuentre completamente libre de humedad para que sea satisfactorio el registro de las imágenes a altas resoluciones.

Para los análisis de ornamentación de polen se debe tener presente que la magnificación de la imagen debe ser lo suficientemente amplia para alcanzar a dimensionar características más detalladas en la superficie del tectum.

La Microscopía Electrónica de Barrido es una herramienta sumamente útil en palinología y paleopalinología, pues permite complementar estudios que tratan temas de paleoecología, paleovegetación, paleoclima, entre otros, pues proporciona un análisis más certero de las características del polen fósil y permite una más amplia clasificación genitiva de los especímenes.

Se encuentra que, dentro de los procesos químicos realizados a las muestras, no es necesario evitar el proceso acetólico, pues en los resultados no hay una diferencia significativa en la proporción de granos de polen obtenidos en buen estado, además de que gracias a la acetólisis se puede evitar que cristales formados durante el proceso químico no oculten el polen contenido en la muestra.

Se observa que, para los análisis de polen en el Microscopio Electrónico de Barrido al momento de traspasar la muestras a los porta-objetos, se corre el riesgo de ocultar el polen por residuos de cristales, por lo que en el caso de estudios específicos que precisen un conteo de polen, se recomienda usar el método de grano único para evitar la pérdida de visibilidad de material polínico.

Finalmente, frente a la evidencia recaudada se encuentra la necesidad de realizar mayores estudios de especímenes polínicos en el país por medio de la Microscopia Electrónica de Barrido con el fin de realizar atlas y guías ilustrados de la flora de Colombia como una base científica de comparación taxonómica, esto para contribuir al conocimiento y aplicación de la clasificación genitiva de las especies endémicas, nativas e introducidas.

Referencias Bibliográficas

- Abdel, K., Van den Berg, R. & Van del Maesen, L. (2002) Pollen morphology of some tribes of Brassicaceae from Egypt and its systematic implications. Feddes Repertorium Vol. 113 (3-4), p. 211-223. Berlin.
- Abdel, K.N. (2002) Biosystematic studies on Brassicaceae (*cruciferae*) in Egypt. Ph.D. Thesis Wageningen University.
- Adebisi, M. (1995) Pollen of Nigerian Plants, Grana, Vol. 34(2), p. 120-141.
- Adekanmbi, O.H. (2009) Pollen Grains of Asteraceae and Analogous Echinata Grains. International Journal of Botany, Vol. 5, p. 295-300.
- Al-Arid, K. (2008). Microspore Wall Morphogenesis and Orbicule Ultrastructure of Isoetes. Doctor of Philosophy (PhD), dissertation, Biological Sciences, Old Dominion University.
- Al-Arid, K., Bray, R., & Musselman, L. (2011). Microspore Wall Morphogenesis of Isoetes piedmontana (Pfeiffer) Reed. International Journal of Plant Sciences, Vol. 172(7), p. 856-861.
- Al-Quran, S. A. (2004) Pollen Morphology of Plantaginaceae in Jordan. Pakistan Journal of Biological Sciences Vol. 7(9), p. 1594-1602.
- Avella, A. (2016) Los bosques de robles (fagáceas) en Colombia: composición florística, estructura, diversidad y conservación. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Bagheri, E., Attar, F., Riahi, H. & Sheidai, M. (2013) Pollen morphology of *Centaurea* L. (Asteraceae) in Iran. Acta Botánica Brasilica Vol. 27(4), p. 669-679.

- Bailey, J. (1999). The Penguin dictionary of plant sciences. Penguin Books. London.
- Baser, B., Baygeldi, Z. & Sahin, B. (2018). Pollen morphology of some *Alyssum* L. (Brassicaceae) from Turkey. Journal of Science and Technology, Vol. 8(2), p. 60-68
- Behling, H., Bush, M., Marchant, R., Berrio, J. et al. (2002). Distribution and ecology of parent taxa of pollen lodged within the Latin American Pollen Database. Review of Paleobotany and Palynology, Vol. 121, p. 1-75.
- Birks, H. & Birks, H. (1980). Quaternary palaeoecology: University Park Press, Baltimore, p. 289.
- Bogotá, G. y Parra, C. (2002) Estudio palinológico de *Cardamine* L., *Nasturtium* R. BR. y *Rorippa* Scop. (Arabideae, Brassicaceae) en Colombia. Caldisia 24(2): 239-257.
- Bouchal J., Güner T. & Denk, T. (2018). Miocene climate of southwestern Anatolia from multiple botanical proxies. Climate of the Past, Vol. 14, p. 1427-1440.
- Bouchal J., Zetter, R., Grimsson, F. & Denk, T. (2014). Evolutionary trends and ecological differentiation in early Cenozoic Fagaceae of western North America. American Journal of Botany, Vol. 101(8), p. 1332 – 1349.
- Carvajal, F. (2007). Estructura y composición florística de un bosque de roble *Quercus humboldtii* Bonpl. en la reserva natural “El Páramo, La Floresta”, Parque Nacional Natural Serranía de los Yariguíes, Santander, Colombia. Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander.
- Corredor, V. E., y Terraza, R. (2015). Geología de la plancha 228 Bogotá Noreste. Bogotá: Servicio Geológico Colombiano.
- Dai, L., Qinghe, H. & Mao, L. (2018) Morphological diversity of *Quercus* fossil pollen in thenorthern South China Sea during the last glacial maximum and its paleoclimatic implication. PLoS ONE 13(10): e0205246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205246>
- Delcourt, H. & Delcourt, P. (1991). Quaternary Ecology: A paleoecological perspective: Chapman & Hall, Cornwall, UK.

- Denk T. & Grimm G. (2009a). Significance of pollen characteristics for infrageneric classification and phylogeny in *Quercus* (Fagaceae). *Int J Plant Sci.* Vol. 170, p. 926–940.
- Denk, T. & Tekleva, M. (2014). Pollen morphology and ultrastructure of *Quercus* with focus on Group *Ilex* (= *Quercus* subgenus *Heterobalanus* (Oerst.) Menitsky): implications for oak systematics and evolution. *Grana*, Vol. 53(4), p. 255-282.
- Denk, T., Grímsson, F. & Zetter, R. (2012). Fagaceae from the Early Oligocene of Central Europe: persisting New World and emerging Old World biogeographic links. *Review of Palaeobotany and Palynology* Vol. 169, p. 7–20.
- DeVore, M., Zhao, Z., Jansen, R. & Skvarla, J. (2007). Pollen Morphology And Ultrastructure of Calyceraceae. *Lundellia*, Vol. 10, p. 32-48.
- Dueñas, H. (1979). Estudio palinológico de los 35 m superiores de la sección tarragona, Sabana de Bogotá. *Caldasia*, Vol. 12(60). Bogotá, Colombia.
- Ediger, V. (1986). Sieving Techniques in Palynological Sample Processing with Special Reference to the MRA System. *Micropaleontology*, Vol. 32(3), p. 256-270.
- Eklund, H., Doyle, J. & Herendeen, P. (2004) Morphological Phylogenetic Analysis of Living and Fossil Chloranthaceae. *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 165(1), p. 107-151.
- Fægri, K. (1956). Recent Trends in Palynology. *Botanical Review*, Vol. 22(9), p. 639-664. Recuperado de www.jstor.org/stable/4353552
- Feng, W., Xing, L., Taylor, W. & Rong, H. (2002) *Isoetes yunguiensis* (Isoetaceae), a new basic diploid quillwort from China. *Novon*, Vol. 12, p. 587-591.
- Fernandez, I. y Díez, M. (1990). Algunas consideraciones sobre terminología palinológica I, polaridad y simetría. *Lagascalia*, Vol. 16(1), p. 51-60. Sevilla.
- Filho, J., Fritsch, P., Almeda, F. & Martins, A. (2009). Cryptic dioecy is widespread in South American species of *Symplocos* section *Barberina* (Symplocaceae). *Plant Systematics and Evolution*, Vol. 277, p. 99-104.

- Fombella, A., Valencia, R., Fernandez, G. y Penas, A. (1996). Estudio polínico de *Quercus Robur* L. en el Noroeste de la Península Ibérica. Bot. Macaronésica, Vol. 23, p. 25-33. Departamento de Biología Vegetal, Universidad de León, León.
- Font Quer, P. (1953). Diccionario de Botánica. Editorial Labor, Barcelona.
- Gazer, M & Shalabi, L. (2016). The role of pollen morphology in the identification and classification of *Plantago* (Plantaginaceae). Egyptian Journal Exp. Biol. (Bot.), Vol. 10(2), p. 125-132.
- Gómez, J. (2018). Reconstrucción ambiental mediante estudio palinológico: Laguna seca, PNN Chingaza. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia.
- González, C.E, Jarvis A. & Palacio, J.D. (2006). Biogeography of the Colombian oak, *Quercus humboldtii* Bonpl geographical distribution and their climatic adaptation. Simposio Internacional sobre Robles y Ecosistemas Asociados, Bogotá, Colombia.
- Grimsson, F., Grimm, G. Meller, B., Bouchal, J. et al. (2016). Combined LM and SEM study of the middle Miocene (Sarmatian) palynoflora from the Lavanttal Basin, Austria: Part IV. Magnoliophyta 2 – Fagales to Rosales. Grana, Vol. 55(2), p. 101-163. Viena, Austria.
- Grimsson, F., Grimm, G., Zetter, R., Pedersen, G. et al. (2014). Fagaceae pollen from the early Cenozoic of West Greenland: revisiting Engler's and Chaney's Arcto-Tertiary hypotheses. Plant Syst. Evol., Vol. 301, p. 809-832. Austria.
- Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M. et al. (2018). Illustrated Pollen Terminology- Second Edition. Springer Open. Vienna, Austria.
- Helmens, K.F. (1988). Late Pleistocene Glacial Sequence in the area of the high plain of Bogotá (Eastern Cordillera, Colombia). Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, Vol. 67, p. 263-283.
- Hesse, M. Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., et al. (2009). Pollen Terminology An illustrated handbook. Universidad de Viena, Austria.

- House, A. & Balkwill, K. (2013). FIB-SEM an additional technique for investigating internal structure of pollen walls. Cambridge University Press, Vol. 19(6), p. 1535-41.
- Jaramillo, P. y Trigo, M. (2011). Guía rápida de polen de las islas Galápagos. Fundación Charles Darwin y Universidad de Málaga. Puerto Ayora, Santa Cruz, Galápagos.
- Jones, G. & Bryant, V. (2007). A comparison of pollen counts: Light versus scanning electron microscopy. Grana, Vol. 46, p. 20-33. University of Nebraska – Lincoln, United States.
- Kaya, A. Ünal, M., Özgökçe, F., Dogan, B., et al. (2017). Pollen Morphology of six species previously placed in *Malcolmia* (Brassicaceae) in Turkey. Bangladesh J. Bot., Vol. 46(2), p. 623-629.
- Keshavarzi M., Behzadifar, M. & Nazem, B.Z. (2016). Pollen morphology of some *Geranium* subgenus *Robertium* species of Iran. Modern Phytomorphology, Vol. 10, p. 39-45.
- Keshavarzi, M., Abassian, S. & Sheidai, M. (2012). Pollen Morphology of *Clypeola* (Brassicaceae) in Iran. Phytologia Balcanica, Vol. 18(1), p. 17-24.
- Kott, L., & Britton, D.M. (1983). Spore morphology and taxonomy of Isoetes in northeastern North America. Can. J. Bot. Vol. 61, p. 3140-3163.
- Liu Y., Zetter R., Ferguson D. & Mohr B. (2007). Discriminating fossil evergreen and deciduous *Quercus* pollen: A case study from the Miocene of eastern China. Rev. Palaeobot. Palynol., Vol. 145, p. 289–303.
- Lozano, S., Correa, A. y Luna, L. (2014). Análisis de la lluvia de polen moderna de la cuenca de México: una herramienta para la interpretación del registro fósil. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, Vol. 66(1), p. 1-10. México.
- Macluf, C., Morbelli, M. & Giudice, G. (2010). Morphology and ultrastructure of megaspores and microspores of *Isoetes sehnemii* Fuchs (Lycophyta). Anais da Academia Brasileira de Ciências, Vol. 82(2), p. 341-352.
- Macluf, C., Morbelli, M., & Giudice, G. (2006). Microspore Morphology of *Isoetes* Species (Lycophyta) from Southern South America. Botanical Review, Vol. 72(2), p. 121-134.

- Martínez, C., Madriñán, S., Zavada, M. & Jaramillo, C. (2013). Tracing the fossil pollen record of *Hedyosmum* (Chloranthaceae), an old lineage with recent Neotropical diversification, Grana, Vol. 52(3), p. 161-180.
- Mercado, J., Jiménez, L. y Sánchez, L. (2011). Polen de las Magnoliopsida en El Volcán (Pamplona, Colombia) i: familias Apiaceae, Asteraceae, Cunoniaceae, Ericaceae, Fabaceae y Gentianaceae. Caldasia, vol. 33(2). Bogotá.
- Molina, E. y Canudo, J. I. (2002) MICROPALEONTOLOGÍA. Capítulo 18: Polen y esporas. p. 347-363.
- Morgado, L., Gonçalves, V., Resendes, R. & Ventura, M. (2015). Pollen morphology of Poaceae (Poales) in the Azores, Portugal. Grana, Vol. 54, p. 282-293.
- Murillo, M. T. & Murillo, J. (1999) Pteridófitos de Colombia I. composición y distribución de las Lycopodiaceae. Rev. Acad. Colomb. Cienc., Vol. 23(86), p. 19-38.
- Musselman, L. (2002). Ornamentation of *Isoetes* (Isoetaceae, Lycophyta) Microspores. Botanical Review, Vol. 68(4), p. 474-487.
- Nagamasu, H. (1989) Pollen morphology of Japanese Symplocos (Symplocaceae). Botanical Magazine, Vol. 102, p. 149-164. Tokyo.
- Naryshkina, N. & Evstigneeva, T. (2012). Holocene vegetation changes on the north-eastern coast of the Korean Peninsula based on the palynological data. Acta Paleobotánica Vol. 52(1), p. 147-155. Rusia.
- Nixon, K.C. (1993). Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. Annales des sciences forestières, INRA/EDP Sciences, Vol. 50(11), p. 25-34.
- Nunes G., Oliveira, R., Guimaraes, J., Giulietti, A., et al. (2018). Quillworts from the Amazon. A multidisciplinary populational study on *Isoetes serracarajensis* and *Isoetes cangae*. PLOS ONE, Vol. 13(8).

- Olney, M. (2002). MIRACLE: Microfossil image recovery and circulation for learning and education. University College London, Micropaleontology Unit. U.K. Recuperado de <https://www.ucl.ac.uk/GeolSci/micropal/welcome.html>
- PalDat (2000) A palynological database. Recuperado de www.palдат.org
- Panahi, P., Pourmajidian M., Fallah, A. & Pourhashemi, M. (2012). Pollen morphology of *Quercus* (subgenus *Quercus*, section *Quercus*) in Iran and its systematic implication. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, Vol. 81(1), p. 33-41.
- Pereira, J., Guimaraes, J. & Watanabe, M. (2019). *Isoetes dubsii* and *Isoetes santacruzensis*, two new species from lowland areas in South America. *PhytoKeys*, Vol. 131, p. 57-67.
- Premathilake, R. & Nilsson S. (2001) Pollen morphology of endemic species of the Horton Plains National Park, Sri Lanka, *Grana*, Vol. 40(6), p. 256-279.
- Pulido, M., Cavelier, J. & Cortés, S. (2006) Structure and composition of Colombian Montane Oak Forest. *Ecological Studies*, Kappelle Ed., Vol. 185.
- Punt, W., Clarke, G. & Van Benthem, F. (1984). The Northwest European Pollen Flora, *Fagaceae*. *Review of Paleobotany and Palynology*, Vol. 42, p. 87-110. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Punt, W., Hoen, P., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, Vol. 143, p. 1–81.
- Radaeski, J. N., Bauermann, S. G., & Pereira, A. B. (2016). Poaceae Pollen from Southern Brazil: Distinguishing Grasslands (Campos) from Forests by Analyzing a Diverse Range of Poaceae Species. *Frontiers in plant science*, Vol. 7.
- Rahn, K. (1996). A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Botanical Journ. Linn. Soc.* Vol. 120, p. 145-198.
- Rangel, J.O. (2000). Colombia diversidad biótica III La región de Vida Paramuna. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, Colombia.

- Real Academia Española. (2001). Diccionario de la Lengua Española. Edición XXIII. Recuperado de <https://dle.rae.es/>
- Rincón, E., Rolleri, C., Passarelli, L., Espinosa, S. et al. (2014). Esporogénesis, esporoderma y ornamentación de esporas maduras en Lycopodiaceae. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 62 (3), p. 1161-1195.
- Rodriguez, M. A. (2009). Desarrollo de una metodología para la recuperación de polenes de filtros de fibra de vidrio, captados por muestreo de alto volumen. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua, Chihuahua.
- Roytchev, V., Terziisky, D., Dimova, D. & Karageorgiev, S. (1994). Scanning electron microscopy study of pollen morphology in seedless grape (*Vitisvinifera L.*) cultivars. *Vitis*, Vol. 33, p. 105-108, Agricultural University, Plovdiv, Bulgaria.
- Rull V., Lara, A. y Montoya, E. (2015). Manual de procedimientos del laboratorio de paleoecología: Análisis polínico. Instituto de Ciencias de la Tierra Jaime Almera, p. 17-22.
- Sáenz, C. (1976). Sobre la nomenclatura palinológica: La esporoderma. *Anal. Instituto Botánico A. J. Cavanilles*, Tomo 33, p. 159-177.
- Sáenz-Lain, C. (2004). Glosario de términos palinológicos. *Lazaroa*, Vol. 25, p. 93-112.
- Sagun V., Levin, G. & Van der Ham, R. (2006). Pollen morphology and ultrastructure of Acalypha (Euphorbiaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology* Vol. 140, p. 123–143.
- Skvarla, J., Rowley, J., & Chisoe, W. (1988). Adaptability of Scanning Electron Microscopy to Studies of Pollen Morphology. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, Vol. 12 (1), Article 13.
- Sosa, S. (2019). Curso Intensivo Intersemestral: (Paleo) Bio Indicadores Neotropicales. Recuperado de http://www.geofisica.unam.mx/iframes/laboratorios/institucionales/paleolimnologia/sitio_web/assets/tema-14-palinomorfos.pdf

- Stanski, C., Luz, C., Nogueira, A. & Nogueira, M. (2013). Palynology of species in the Astereae and Heliantheae tribes occurring in the region of Campos Gerais, Paraná State, Brazil. *Iheringia Serie Botanica*, Vol. 68, p. 203-214.
- Stelleman, P. (1978). Applications of scanning electron microscopy in anthecology. *Acta Bot. Neerl.* Vol. 27 (5/6), p. 333-340. Hugo de Vries-Laboratorium, Amsterdam.
- Tekleva M., Naryshkina N. & Evstigneeva T. (2014). Fine structure of *Quercus* pollen from the Holocene sediments of the Sea of Japan. *Plant Syst. Evol.* Vol. 300, p. 1877–1893. Rusia.
- Thornhill, A., Hope, G., Craven, L. & Crisp, M. (2012). Pollen morphology of the Myrtaceae. Part4: tribes Kanieae, Myrteae and Tristanieae. *Australian Journal of Botany*, Vol. 60, p. 260-289.
- Thornhill, A., Hope, G., Craven, L. and Crisp, M (2012). Pollen morphology of the Myrtaceae. Part1: tribes Eucalypteae, Lophostemoneae, Syncarpieae, Xanthostemoneae and subfamily Psiloxylloideae. *Australian Journal of Botany*, Vol. 60, p. 165-199.
- Torres, E. (2016). Desarrollo de una herramienta para caracterización palinológica por medio de microscopía holográfica digital. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Uribe, F. y Fonnegra, R. (1979). Importancia de la forma, estructura y tamaño del polen en la determinación de la familia Melastomataceae. *Actualidades Biológicas*, Vol. 8 (27 y 28).
- Van der Hammen & González (1960). Upper Pleistocene and Holocene climatic and vegetation of the “Sabana de Bogotá” (Colombia, South America). *Leidse Geol. Meded.* Vol. 25, p. 261-315.
- Vargas, O., y Pedraza, P. (2003). Parque Nacional Natural Chingaza. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia.
- Vega, C. (1964) Estudio Preliminar de los Bosques de roble *Quercus Humboldtii* Bonpl. De la Sierra de Boyacá Colombia. Universidad Distrital F.J. de Caldas. Bogotá.

- Velásquez, C. (1999). Atlas palinológico de la flora vascular paramuna de Colombia: Angiospermae. Universidad Nacional de Medellín. Medellín, Colombia.
- Velásquez, C. y Rangel, O. (1995). Atlas palinológico de la flora vascular del páramo I. Las familias más ricas en especies. Caldasia Vol. 17, p. 509-567. Colombia.
- Verhoeven, R. & Venter, H. (1992). Pollen morphology of *Geranium* (Geraniaceae) in southern Africa. S. Africa Journal of Bot. Vol. 58(6), p. 440-447.
- Wrońska, D., Danielewicz, W., Bocianowski, J., Maliński, T. & Janyszek, M. (2016). Comparative Pollen Morphological Analysis and Its Systematic Implications on Three European Oak (*Quercus* L., Fagaceae) Species and Their Spontaneous Hybrids. PLOS ONE Vol. 11(8).
- Wyk, A.E. & Dedekind, I. (1985). The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in southern Africa. Morphology and taxonomic value of pollen. South Africa Tydskr. Plantk. Vol. 51(5).
- Xiao, Z., Kang-You, H., Zhuo, Z., Ya-Ze, Z., et al. (2018). Pollen morphology of *Quercus* sect. *Ilex* and its relevance for fossil pollen identification in southwest China. Grana.
- Zetter, R., Hesse, M. & Huber, K.H. (2002). Combined LM, SEM, TEM studies of Late Cretaceous Pollen and Spores from Gmünd, Lower Austria. Stapfia, Vol. 80, p. 201-230.