

Calidad y tecnología de miel y de la producción apícola

Análisis Polínico de la Miel

Introducción

Los granos de polen existentes en la miel proceden fundamentalmente de los caídos de las anteras en el néctar libado por las abejas. También existen otras vías indirectas como son los adheridos al cuerpo de los insectos o los recolectados por ellos para alimentación.

Para poder determinar el origen botánico de una miel es necesario observar en forma detallada la estructura externa del grano de polen (exina), para lo cual se debe realizar el proceso de acetólisis (Erdtman, 1943; Gadbin 1979). Mediante dicho proceso se elimina el contenido del grano de polen y se limpia la exina pudiéndose apreciar la ornamentación y las aberturas (tipo, número y disposición). El conjunto de varias características (tamaño, forma, ornamentación, aberturas) permiten determinar la identidad de las plantas que los producen.

Es importante tener una buena colección de preparaciones de referencia o en su defecto publicaciones especializadas sobre la morfología de los granos de polen de las plantas apícolas de las zonas de donde procede el material analizado.

Existen dos tipos de análisis polínico que pueden realizarse en una miel:

CUALITATIVO: indica en que proporción se encuentran los granos de polen de distintas especies, es decir el espectro polínico.

CUANTITATIVO: proporciona la cantidad total de polen por unidad de peso.

ANÁLISIS CUALITATIVO: El resultado del análisis polínico cualitativo se expresa mediante el espectro polínico, que indica la frecuencia con que se presentan los granos de polen de cada especie. Las mieles pueden clasificarse en:

Miel monofloral: cuando el producto proceda primordialmente de flores de una misma familia género o especie. Una miel se considera monofloral cuando la especie en cuestión se encuentra representada en una fracción mayor o igual al 45 % del espectro polínico.

Hay especies, que están representadas en exceso en el espectro polínico, lo que supone que para considerar una miel monofloral de una estas plantas la frecuencia debe ser mucho mayor que el 45 %. Por ejemplo en el caso de *Eucaliptus* sp. la frecuencia debe ser de 70 % para que la miel sea monoflora.

Otras especies como la alfalfa producen buen néctar y escaso polen, y basta un 20 % de presencia en el espectro polínico para considerar que es monoflora.

Los criterios de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca para mieles monofloras son los siguientes:

- ✓ En general: la especie en cuestión debe estar representada en el espectro polínico en un 45% como mínimo.
- ✓ *Eucalyptus*: 70%
- ✓ *Alfalfa*: 20 %
- ✓ *Citrus* 25%
- ✓ *Miel de tréboles*: la proporción de granos de polen de *Melilotus*, *Medicago*, *Lotus*, *Trifolium*, en conjunto alcanzan un valor mínimo de 45 %.
- ✓ *Lotus*: 20 %.
- ✓ *Melilotus*: 20 %.

Miel Poliflora o Multiflora: en su composición se encuentra el néctar de varias especies vegetales, sin que ninguna de ellas pueda considerarse predominante.

Miel de mielada o mielato: es la miel obtenida a partir de secreciones de las partes vivas de las plantas o de insectos succionadores presentes en ellas como áfidos, pulgones, etc Mientras se alimentan de las plantas, estos insectos excretan de su tubo digestivo un líquido dulce que a veces recolectan las abejas.

Las mieles de bosque, procedentes de mielatos y no del néctar floral, se caracterizan por la presencia de esporas y fragmentos de micelios de hongos, algas verdes y azules, y por la prácticamente ausencia de granos de polen.

ANÁLISIS CUANTITATIVO: se efectúa midiendo el volumen del sedimento de la miel centrifugada y el número de granos de polen por unidad de peso.

El análisis puede ser de orientación o completo. En el primer caso queda limitado a las partículas identificables más frecuentes y a la búsqueda de elementos característicos significativos en el sedimento.

El análisis completo involucra la identificación de todos los granos de polen y otros componentes microscópicos si los hubiera.

De acuerdo a los granos de polen que posee una miel se clasifican en (Maurizio 1939):

GRUPO	g de polen/ mm ³
I	0-20.000
II	20.001- 100000
III	100.000-500.000
IV	500.001-1.000.000
V	más de 1.000.000

CARACTERISTICAS DE LOS GRANOS DE POLEN: GENERALIDADES

ESTRUCTURA Y ESCULTURA.

Un grano de polen posee una envoltura compleja que comprende dos capas:

-INTINA: es la capa interna de composición celulósica y desaparece cuando muere el contenido celular, o cuando el polen ha sido acetolizado. Es una capa homogénea y continúa.

-EXINA: es la capa externa compuesta por esporopolenina. Esta capa se divide en dos subcapas Nexina y sexina ésta última es la más externa y posee escultura variada presentando distintos elementos como

espínulas, espinas, verrugas, gemas, báculos capitados, báculos clavulados, gránulos

Estos elementos pueden estar

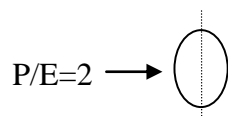
- unidos en su base constituyendo una nueva envoltura denominada tectum, el cual está sostenido por columelas.
- aislados, en este caso los granos no tienen tectum y se denominan INTECTADOS

FORMA

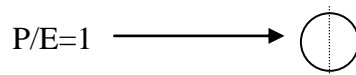
Al definir la forma del grano de polen es necesario considerar la vista ecuatorial (contorno) y la vista polar o ámbito. Si el grano es heteropolar tendrá dos vistas polares diferentes.

Existe una clasificación de formas propuesta por Erdtman. La forma está definida por la relación entre el eje polar P y el eje ecuatorial. Así por ejemplo un grano puede ser:

Perprolato

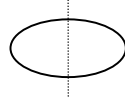
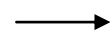


esferoidal



peroblatos

$P/E = 0,50$



Entre estas tres formas existen formas intermedias.

ABERTURAS

Las aberturas de los granos son áreas adelgazadas de la exina. Tienen dos funciones:

- permitir la salida del tubo polínico
- permitir el acomodamiento del contenido polínico debido a cambios de volumen (mayor o menor hidratación), esta función se denomina "harmomérgata".

Existen dos tipos de aberturas: circular o PORO

alargadas o COLPOS

Las aberturas compuestas están formadas por un colpo externo y un poro interno.

Si el poro interno es alargado en el sentido en sentido de los polos, se denomina LOLONGADO, si es alargado en el sentido ecuatorial se denomina LALONGADO (Melilotus)

Granos con tres aberturas compuestas, se denominan, TRICOLPORADOS y son característicos de la familia Leguminosae, Compositae, entre otras.

Granos con tres colpos, se denominan TRICOLPADOS y son característicos de las especies de la familia Cruciferae.

GRUPOS DE INTERES

COMPUESTAS: todas tricolporadas, con tectum, intrincado sistema de columelas

COMPUESTAS

Cynarias

Carduus acanthoides (cardo)

Equinados / equinulados

Cynara cardunculus (cardo asnal)

Centaurea solcisticialis (abrepuño amarillo)

1. equinados

Heliantheas: *Helianthus annuus* (girasol)

Helianthus laetiflorus (girasol silvestre)

2. equinolofados

Cichoireas *Cichorium intybus* (achicoria)

Taraxacum officinalis (diente de león)

Modelo de descripción

- ◆ Forma (vista ecuatorial)
- ◆ Amb (vista polar)
- ◆ Aberturas: tipo, número y disposición
- ◆ Ornamentación

Ejemplo: Cardo

Ornamentacion: equinada, espinas cortas, mameliformes

CRUCIFERAS: todas tricolpadas

Brassica rapa (mostacilla)

Diplotaxis tenuifolia (flor amarilla)

UMBELIFERAS todas tricolporadas, todas ruguladas, prolotos o perprolotos

Foeniculum vulgare (hinojo)

LEGUMINOSAS todos tricolporados

Mimosoideas Acacias (los granos de polen se liberan en políades)

Papilionoideas

Trifolium repens (trébol blanco)

Trifolium pratense (trébol rojo)

Melilotus sp. (melilotus)

Medicago sativa (alfalfa)

Lotus corniculatus

I. EXINA PUNTEADA *Medicago sativa* (alfalfa)

II. EXINA RETICULADA

1. Reticulo con lumenes amplios *Trifolium pratense* (trebol rojo)

2. Reticulo con lumenes pequenos (microreticulo)

- ◆ Grano subromboidal(esferoidales a prolatos,subprolatos)

Trifolium repens (trebol blanco)

- ◆ Grano subrectangular (prolatos) *Melilotus sp.*

BORAGINACEAS

Echium plantagineum (flor morada)

Semitectado, microreticulo,subisopolar*

*Subisopolar (Walker and Doyle,1975): polen en el cual la cara distal y proximal son diferentes, por ej. Una cara es mas convexa que la otra.

MYRTACEAS

Eucaliptus sp. Tres colporos unidos en los polos
Sincolpio, exina escabrada

RUTACEAS

Citrus sp.

Forma: esferoidal

Amb: circular

Aberturas: tetracolporados, ecuatorial, lalongada

Ornamentacion: reticulada

PROTOCOLOS

TOMA DE MUESTRAS DE MIEL:

(Según el Boletín oficial N 28.084 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.)

1. Se deben extraer 100 gr. de cada parte superior, media e inferior del tambor
2. Las muestras así obtenidas deben ser homogeneizadas.
3. Se colocará en tres frascos de contenido no inferior a 50 gr sellándolos y etiquetándolos en lugar así como el tambor muestreado. Un frasco quedará en manos del productor, otro se usará para el análisis y el tercero lo conservará el Laboratorio por un período de 18 meses como muestra de referencia.

MUESTRAS

Si la muestra de miel está cristalizada, debe ser licuificada por calentamiento (no más de 40 °C)

Para acetolizar muestras de miel se debe disolver 10 gr. de miel en 20 ml. de agua destilada. Homogeneizar bien. Luego seguir los pasos del protocolo: Acetólisis

Si la miel es pobre en polen, se puede duplicar la cantidad de miel (Vergeron, 1964).

EXAMINACION A MICROSCOPIO

El análisis completo involucra la identificación para determinar los tipos polínicos presentes en la muestra.

1.-Determinación de las clases de frecuencia: se realiza contando 200-300 granos de polen. Si el espectro contenido en la muestra es de pocas especies, es suficiente con contar 200 granos, pero si el espectro es rico en especies, se deberán contar 300 granos en total (Louveaux,et. al. 1970).

2.-Conteos expresados en porcentajes: la presentación de frecuencias en porcentajes es permitida sólo si se cuentan 1200 granos de polen. Los conteos pueden ser realizados de dos montajes (preparados separadamente) provenientes de la misma miel (Louveaux,et.al. 1970).

Expresión de los resultados:

1.-Presentación de las clases de frecuencias:

Si se estima la frecuencia de los granos de polen, se usa la siguiente terminología:

- Polen predominante: constituye más del 45 % del total de granos de polen contados
- Polen secundario: 16-45%
- Polen de menor importancia: entre el 14 y el 3%.
- Polen traza: inferior al 3 %

2.- Conteos expresados en porcentajes

Se expresan los porcentajes de cada especie, si existe polen cuya frecuencia es del 1% o menor, debe ser mencionado como “presente”.

PREPARACION DE LA MEZCLA ACETOLITICA (Realizarla bajo campana)

Colocar en una probeta 9 partes de anhídrido acético, agregar muy suavemente gota a gota una parte de ácido sulfúrico. Mezclar con varilla de vidrio. La mezcla es incolora y desprende calor. NUNCA DEBE PONERSE EN CONTACTO CON AGUA ya que produce una reacción exotérmica pudiendo ocasionar quemaduras. Al cabo de un tiempo la mezcla puede tomar un color caramelo. Es conveniente preparar solo las cantidades a utilizar pues envejece con el tiempo.

PREPARACION DE GLICERINA-GELATINA

Materiales:

- 50 g de gelatina sin sabor
- 170 ml. de agua destilada pasada por filtro.
- 150 ml. de glicerina libre de impurezas.
- Unas gotas de fenol.

Se prepara como una gelatina común, se le agrega el fenol para evitar el ataque de los hongos. Se conserva bien tapado y en lugar fresco.

ACETÓLISIS (Erdtman, 1960)

Se puede realizar de material fresco o herbario, consiste en destruir el contenido citoplasmático y la intina de los granos mediante la mezcla acetolítica.

1. - Separar las anteras y colocarlas en un tubo de centrifuga.
2. - *Agregar 5ml de ácido acético a fin de deshidratar el material.
3. - Centrifugar a 3000 r.p.m. 5 minutos.
4. - Descartar el sobrenadante
5. - Colocar 5 ml de mezcla acetolítica en cada tubo, agitar con varilla de vidrio.
6. - Colocar en baño maría a 70 °C durante 3 minutos.(o baño térmico :cuando el agua empieza a hervir esperar 2.5 minutos y retirar del fuego)
7. - Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos.
8. - Descartar el sobrenadante en un frasco.
9. - Realizar uno o dos lavados con agua destilada o ácido acético (3 ml), centrifugando y desechando el sobrenadante. Si fuera necesario dejar escurrir el tubo boca abajo sobre papel de filtro.
10. - Agregar a cada tubo 5 ml de agua-glicerina y dejar reposar al menos 15 minutos.
11. -Centrifugar, eliminar el sobrenadante. Escurrir sobre papel de filtro.
12. -Cortar un pequeño trozo de gelatina-glicerina y pincharlo con una aguja de disección. Introducir la aguja en el tubo para extraer una muestra.
13. -Colocar el trozo de gelatina-glicerina (con el polen) sobre un porta objeto y colocarlo a la llama. Una vez que ha disuelto la gelatina mezclar con una aguja.
14. -Colocar parafina fundida, en los ángulos que serán ocupados por el cubreobjeto.
15. - Colocar a llama hasta que la parafina funda. NO recalentar la preparación. Observar a microscopio.

Si se desea conservar el residuo, puede transferirse a tubos viales, agregando agua-glicerina al 50 % y unas gotas de fenol para prevenir el ataque de hongos.

*Para el caso de mieles se sigue el mismo protocolo que para el material fresco o herbario, comenzando con la miel (10 gr) disueltos en agua destilada (20ml) se pasa a un tubo de centrifuga y se inicia. Centrifugando (3000rpm durante 20 minutos) y luego se descarta el sobrenadante y se continua con el paso 2.

Para acetolizar muestras de polen extraídas de trampas se debe disolver cada gramo de polen en 20 ml de agua en ebullición, homogeneizar bien. Tomar 5 ml de esta solución y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Descartar el sobrenadante.

TECNICA DE WODEHOUSE (1935)

Se utiliza para material fresco o de herbario. Mediante esta técnica los granos de polen conservan el contenido citoplasmático.

Procedimiento:

- 1- Separar las anteras y colocarlas sobre un porta-objetos.
 - 2- Utilizando una aguja de disección separar, bajo lupa, los granos de polen, eliminando fragmento de tejido.
 - 3.-Agregar una gota de alcohol y dejar evaporar
 - 4.-Agregar una gota de colorante (fucsina en solución alcohólica)y un pequeño trozo de glicerina-gelatina.
 - 5.-Colocar a la llama del mechero, sin acercarlo demasiado, y retirar. Repetir la operación hasta que la glicerina-gelatina funda.
 - 6.-Homogeneizar la preparación con aguja de disección,cuidando que no se formen burbujas.
 - 7.-Colocar el cubre-objetos, sellar con bálsamo de Canadá o con esmalte de uñas.
- *Desventajas de la técnica: los preparados tienen poca durabilidad, son vulnerables al ataque de hongos.

ANALISIS CUANTITATIVO

- Tomar 10 ml. de miel y disolverla en 20 ml. de agua destilada, homogeneizar.
- Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm., descartar el sobrenadante.
- Recoger el ppdo con una pipeta de glóbulos blancos.
- Colocar dos gotas del sedimento en cada uno de los retículos de Thomas.
- Contar los granos dentro de cada retículo, multiplicar ese valor por el coeficiente de la Cámara de Neubauer.

FUENTES

Carretero J. L. (1989). Análisis polínico de la Miel. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 124 pp.

Crane E. (1979). Honey a Comprehensive Survey. Eva Crane ed. Heinemann. London, 607 pp.

Louveaux, J. Maurizio, A y Vorwohl G. (1970). Methods of Melissopalynology. Bee World 51(3): 125-138.

Tellería M.C. (1994). Curso básico de Palinología Aplicado a la Tipificación de Mieles. Universidad Nacional de La Plata. 21 pp.

Punt W.; Blackmore, S.; Nilsson S.; Le Thomas A. Glossary of pollen and spore terminology. LPP Foundation, utrecht, 1994. 71pp.