

Tesis de Licenciatura

Biología reproductiva de *Psolus patagonicus* Ekman, 1925 (Holothuroidea), asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia de Buenos Aires, en el Mar Argentino

Martinez, Mariano I.

2006

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Martinez, Mariano I.. (2006). Biología reproductiva de *Psolus patagonicus* Ekman, 1925 (Holothuroidea), asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia de Buenos Aires, en el Mar Argentino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001161_Martinez

Cita tipo Chicago:

Martinez, Mariano I.. "Biología reproductiva de *Psolus patagonicus* Ekman, 1925 (Holothuroidea), asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia de Buenos Aires, en el Mar Argentino". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2006. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001161_Martinez



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

BIBLIOTECA CENTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS ERASMO
Y NATURALES / UBA



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad de Buenos Aires

Tesis de Licenciatura

Biología reproductiva de *Psolus patagonicus* Ekman, 1925

(Holothuroidea), asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia
de Buenos Aires, en el Mar Argentino.

Mariano I. Martinez

Buenos Aires, Argentina

Director

Dr. Pablo E. Penchaszadeh

Director Asistente

Dra. Juliana Giménez

79082

Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	6
<i>Generalidades</i>	6
<i>Reproducción</i>	7
<i>Antecedentes de la clase Holoturoidea en el Mar Argentino</i>	9
<i>Incubación</i>	11
<i>Condiciones ambientales en la zona de muestreo</i>	13
Objetivos.....	15
Materiales y métodos.....	16
<i>Muestreo</i>	16
<i>Procesamiento de muestras</i>	17
Resultados.....	19
<i>Anatomía externa</i>	19
<i>Temperatura</i>	21
<i>Estructura poblacional</i>	21
<i>Relación de sexos</i>	23
<i>Anatomía de la gónada</i>	23
<i>Índice gonadosomático</i>	24
<i>Ciclo reproductivo</i>	27
Conclusiones y Discusión.....	32
Bibliografía.....	37
Apéndice.....	43

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Dr. Pablo E. Penchaszadeh por su dirección en la presente tesis y darme la posibilidad de aprender e investigar en su laboratorio. A mi Directora Asistente Dr. Juliana Giménez por todos sus consejos en la tesis.

Al Dr. Gregorio Bigatti y al Lic. Martín Brögger cuyos consejos aumentaron y fortalecieron mi cariño por la investigación. A Florencia Arrighetti, Valeria Teso y Guido Pastorino por su ayuda en la redacción y a mis compañeros de laboratorio que nunca ocultaron sus consejos, Andrés, Carlos, Daniel, Diego, Ezequiel, Gabriela, Javier, José, Juan Pablo, Lorena, Marko, Mauro, Soledad y Sol. A Jorge Calvo, Elba Morriconi por sus fotografías, ayuda y por prestarme su laboratorio.

A mi familia y amigos, especialmente a mis padres que me inculcaron su humanidad y día a día me ayudaron sin dudarlo y a mi hermana cuya compañía siempre me dará fuerzas. A mi abuela, mi abuelo, mis tíos y mis primos de quienes guardo muchos recuerdos de mi niñez y mi adolescencia los cuales forjaron gran parte mi personalidad. A Mónica, Luis, Pedro y Dora para los cuales siempre fui un miembro de su familia.

Al proyecto UBACYT X316 (marco en el cual realice mi Beca de estudiante “Estimulo”) y PADI FOUNDATION cuyos fondos solventaron parte de esta investigación. También al Lic. Mario Lasta quien dio la oportunidad de acompañar en las campañas del INIDEP de octubre de 1999 a febrero de 2001 de monitoreo de la vieira para realizar los muestreos de la presente tesis.

A los jurados de esta tesis Dra. Veronica Ivanov, el Dr. Fernando Meijide y la Dra. Graciela Esnal, cuyos consejos fueron de gran ayuda, tanto en la exposición como en la redacción. A la Universidad de Buenos Aires y particularmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por capacitarme y al Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental que me permitió desarrollar mis investigaciones.

Y por último a mis dos grandes amores, a Yamila y la Ciencia que son la mayor motivación para seguir disfrutando la vida.

A todos GRACIAS!

Resumen

Psolus patagonicus Ekman, 1925 es un holoturio dioico y no presenta dimorfismo sexual. Se distribuye principalmente en la costa oeste del Atlántico Sudoccidental, desde la provincia de Buenos Aires hasta la zona cercanas al Estrecho de Magallanes, en la costa este del Pacífico Sur.

Especímenes de *P. patagonicus* fueron colectados entre 1999-2001 en la pesca de arrastre experimental en la zona de banco "Reclutas" ($39^{\circ}24' S$; $55^{\circ}56' O$). No se observaron diferencias significativas en las proporciones de machos y hembras con respecto a la relación 1:1. Se calculó el índice gonadosomático (IGS) para machos y hembras, durante trece meses entre los años 1999 y 2001. Con los valores de IGS y mediante la observación en los cortes histológicos de espermatozoides en machos y las frecuencias de tallas oocitarias en las hembras se caracterizó el ciclo reproductivo. Los resultados obtenidos indican que *P. patagonicus* posee un ciclo anual de reproducción en el cual ocurren dos eventos de evacuación de gametas: entre noviembre y diciembre, y durante los meses de febrero y marzo.

Primavera y verano registran los valores mas altos de índice gonadosomático para las hembras y las máximas tallas oocitarias, alcanzando $900 \mu m$. En este período están presentes todas las frecuencias de tallas oocitarias (hasta $300 \mu m$, 300 a $600 \mu m$ y 600 a $900 \mu m$). Es en estos meses cuando se desarrollan los dos eventos de evacuación de las gametas, registrándose en las hembras una desaparición de los oocitos de entre 600 y $900 \mu m$ y una disminución en el índice gonadal. En los machos se observan, en ambos eventos, espermatozoides en el testículo.

Luego de la evacuación, en los machos el IGS permanece en valores constantes (variación estadísticamente no significativa) y en las hembras existe un descenso

significativo con presencia de oocitos atrésicos. Hacia los meses de mayo a septiembre no se observa variación estadística en el IGS de las hembras excepto en agosto. Estos meses también presentan los valores de frecuencia de tallas oocitarias de hasta 300 µm.

Los meses de febrero y marzo correspondientes a la evacuación coinciden con el inicio de la incubación de la crías en la zona ventral del cuerpo de la madre o suela y el sustrato, la viera *Zygochlamys patagonica* (King y Broderip, 1832). En este período existe un aumento en la cantidad de alimento en las capas profundas del Océano Atlántico, tanto en la comunidad de banco “Reclutas” como en otras comunidades cercanas en los meses de noviembre y febrero. En contraposición, la temperatura en la comunidad de banco “Reclutas” presenta variaciones hacia los meses de invierno a lo largo de un grado °C, entre 6 °C y 7 °C. De esta manera el aumento en la cantidad de alimento es simultáneo al inicio de la liberación de gametas, no así el cambio en la temperatura, lo cual plantearía la importancia del alimento en el inicio de la evacuación.

Por último se destaca la vulnerabilidad de este holoturio conjuntamente con otras especies epibiontes de un recurso pesquero en explotación como es la vieira *Z. patagonica*.

Introducción

Generalidades

El phylum Echinodermata conforma un linaje antiguo que ha sufrido numerosas modificaciones en cuanto a su taxonomía. Con alrededor de 6000 especies, esta compuesta sólo por representantes marinos. Es común a todas ellas la presencia de un endoesqueleto calcáreo formado por osículos dérmicos que pueden fusionarse formando un caparazón rígido, como sucede en equinoideos (erizos y dólares de mar) y algunos holoturios (Ruppert y Barnes, 1996).

Los equinodermos presentan un sistema de canales celomáticos conocidos como sistema vascular acuífero, el cual puede presentar distintas funciones dependiendo de la clase. La mayoría de los miembros de este phylum son dioicos y no poseen dimorfismo sexual, y la fecundación es externa. El phylum Echinodermata comprende cinco clases: Asteroidea (estrellas de mar), Crinoidea (lirios de mar), Ophiuroidea (ofiuras), Echinoidea (erizos de mar) y Holothuroidea (pepinos de mar). Para esta última se describieron seis ordenes: Apodida, Dactylochirotida, Aspidochirotida, Elasipodida, Molpadiida y Dendrochirotida (Hyman, 1955; Ruppert y Barnes 1996).

Los holoturios comprenden alrededor de 900 especies. Son individuos bentónicos que se distribuyen desde la zona intermareal hasta grandes profundidades. Presentan tamaños que oscilan entre los 2 mm y los 250 mm de largo y la forma de su cuerpo suele ser vermiforme u esférica (Hyman, 1955; Ruppert y Barnes 1996).

Los holoturoideos se caracterizan por la presencia de una superficie ventral y una superficie dorsal. Poseen cinco áreas ambulacrales, que se disponen en la zona dorsal o vibium y tres en la zona ventral conocida como tribium, en esta zona es donde algunas especies incuban a las crías.

El orden Dendrochirotida se caracteriza por presentar tentáculos dendríticos que forman parte de un introverto, el cual puede retraerse con la ayuda de cinco músculos retractores adheridos a las piezas radiales del anillo calcáreo que rodean la faringe (Hyman, 1955). Este orden comprende seis familias una de las cuales es Psolidae Perrier, 1902. Particularmente los miembros de esta familia presentan la zona dorsal modificada con la acumulación de osículos en forma de placas calcáreas, con la boca próxima a la parte anterior del cuerpo, y el ano próximo a la parte posterior (Hyman, 1955; Frankboner, 1978; Lambert, 1995). En la zona ventral presentan podios que rodean una epidermis blanda denominada suela (Hyman, 1955; Frankboner, 1978; Lambert, 1995). Dentro de esta familia se encuentra a *Psolus patagonicus* Ekman, 1925.

Psolus patagonicus

Phylum	ECHINODERMATA
Clase	HOLOTUROIDEA
Orden	DENDROCHIROTIDA Grube, 1840
Familia	PSOLIDAE Perrier, 1902
Género	<i>Psolus</i> Oken, 1815
Especie	<i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925

Reproducción

Los holoturios son dioicos y no tienen dimorfismo sexual aparente, ya que no existe alguna característica que permita determinar el sexo externamente. Puede ocurrir que en algunos casos exista una diferencia en el color de la góndola según el sexo, lo cual permite la determinación del sexo por disección del individuo (McEuen y Chia, 1991; Guzmán, 2003). En caso de no existir diferencia de color en las góndolas, solo con

la histología se puede conocer el sexo (Sewell, 1992; Hamel *et al.*, 1993; Ramofafia *et al.*, 2001). Por otro lado, en algunas especies se puede reconocer a las hembras por la presencia de crías dado que éstas son las responsables de la incubación (Giménez y Penchaszadeh, 2002).

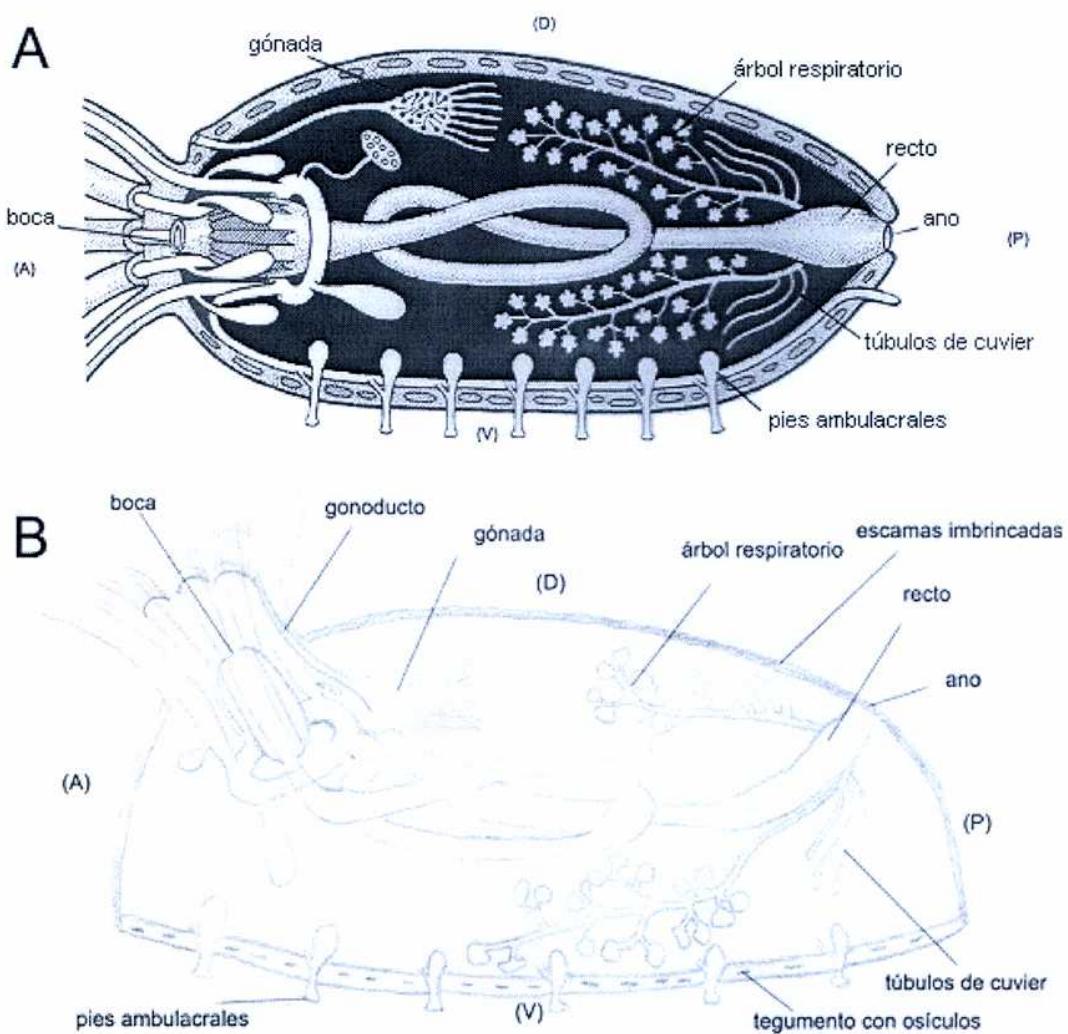


Figura 1: A. Dibujo esquemático de un holoturio. (Reproducido de Pearse *et al.*, 1987).

B. Dibujo esquemático de un miembro generalizado de la familia Psolidae.

Este grupo presenta una góndola digitiforme que se encuentra suspendida en el celoma en la parte anterior del cuerpo (Fig. 1 A y B). La evacuación de las gametas al exterior se produce a través de un gonoporo (Hyman, 1955; McEuen, 1988; McEuen y Chia, 1991). Para ambos sexos, los túbulos que conforman la góndola varían en cantidad dependiendo de la especie y la época del año. Rutherford (1973), Costelloe (1985), Sewell (1992), Ramofafia *et al.* (2001), Guzmán *et al.* (2003), Sewell (1994) describen estas variaciones en el tamaño gonadal.

Entre los holoturios se encuentran algunas especies incubadoras, en las que las crías permanecen asociadas al adulto hasta juveniles. Este comportamiento es observado en especies subantárticas y antárticas en las cuales se han descrito algunas estrategias que varían según la especie: la incubación de las crías en el dorso, en la suela, en los tentáculos e internamente (Bernasconi, 1934; Rutherford, 1973; McEuen, 1988; Gutt, 1991; McEuen y Chia, 1991; Sewell, 1994; Giménez y Penchaszadeh, 2002).

Antecedentes de la clase Holoturoidea en el Mar Argentino

En nuestro país son escasos los trabajos desarrollados en holoturios. La mayoría de las investigaciones describen aspectos morfológicos y ecológicos de individuos colectados en distintas zonas del mar argentino. Bernasconi (1934, 1941), quien realizó los primeros estudios en equinodermos, analizó la morfología de dos miembros de la familia Psolidae, *Psolus charcoti* (Vaney, 1936) y *P. patagonicus*. Hernandez (1981) estudió la anatomía y el hábitat de diversos holoturios de Puerto Deseado: *Cladodactyla crocea* (Lesson, 1830), *Trochodata purpurea* (Lesson, 1830), *Pseudocnus dubiosus leoninus* (Semper, 1868), *Taeniogyrus contortus* (Ludwig, 1874), *Hemioedema spectabilis* (Ludwig, 1882), *Chiridota pisanii* Ludwig, 1886 y *P. patagonicus*.

Pseudocnus dubiosus leoninus y *P. patagonicus* fueron mencionados por Bastida *et al.*, 1992; Bremec *et al.*, (1998, 2000), como fauna acompañante en expediciones que comprendían el estudio de recursos pesqueros. Giménez y Penchaszadeh (2002) describieron a *P. patagonicus* como epibionte de la vieira *Zygochlamys patagonica* (King y Broderip, 1832).

P. patagonicus se distribuye en la costa este de América del Sur y las zonas cercanas al Estrecho de Magallanes (Fig. 2). Trabajos previos indican la presencia de esta especie en la zona del talud frente a la ciudad de Mar del Plata (38° S) y Punta Medanos (39° S), entre los 100 y 110 m de profundidad y en Ushuaia (54° S) hasta los 10 metros de profundidad (Bernasconi, 1941; Hernandez, 1981; Bremec *et al.*, 2000; Muniaín *et al.*, 2003). Lancellotti y Vasquez (1999) indican la presencia de *P. patagonicus* en Chile, desde Archipiélago Los Chonos (44° S) hasta el Cabo de Hornos (56° S), en un estudio realizado sobre la fauna bentónica del litoral del Pacífico Sur.

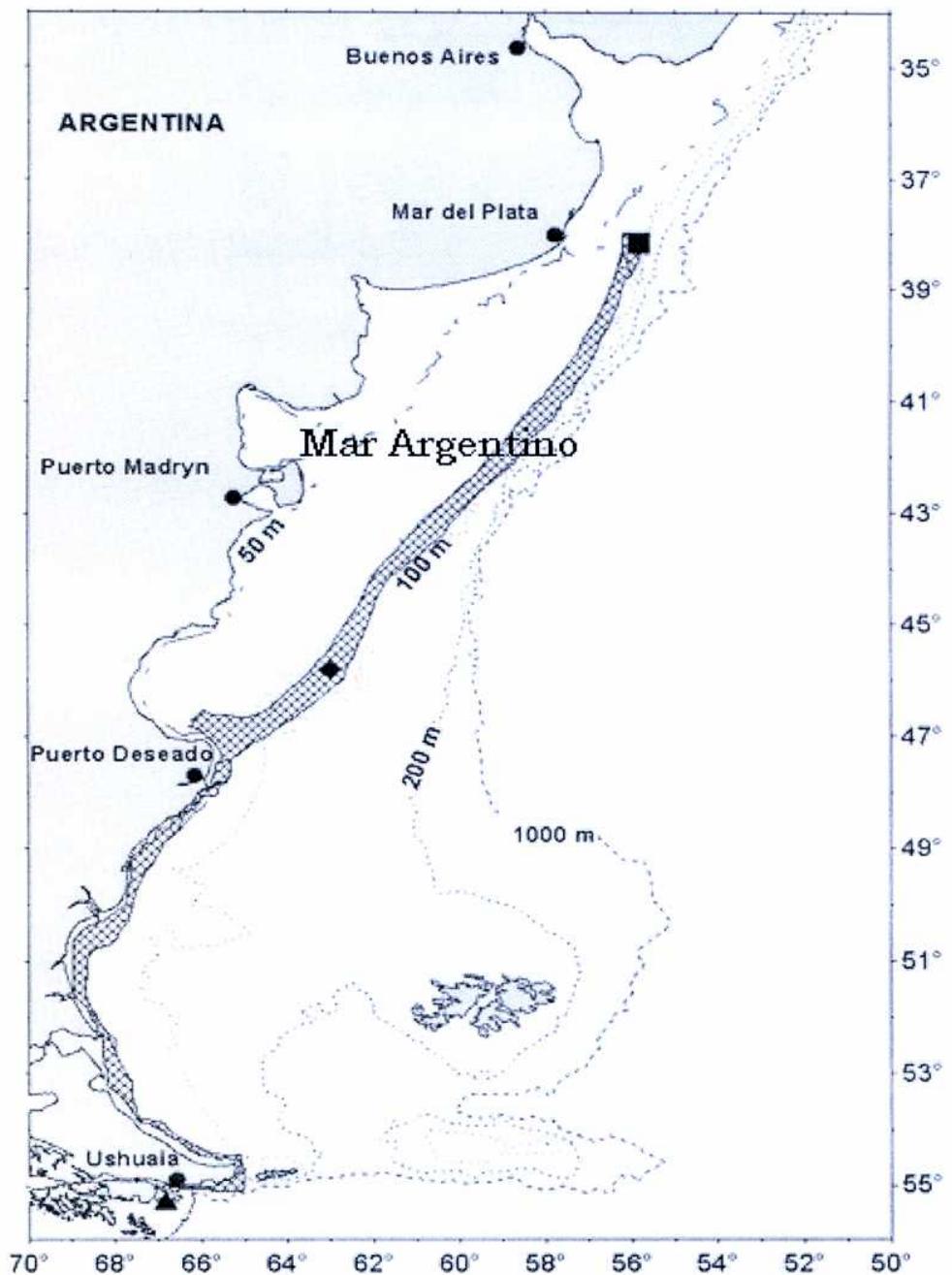


Figura 2: Distribución de *Psolus patagonicus* en el Mar Argentino.

Incubación

P. patagonicus presenta incubación de embriones. Este comportamiento fue observado para la población que habita banco “Reclutas” desde febrero hasta octubre. Este hábito es realizado por la hembra la cual mantiene a las crías por siete meses entre

la suela y la superficie que utiliza como sustrato (Fig. 6) (Giménez y Penchaszadeh, 2002).

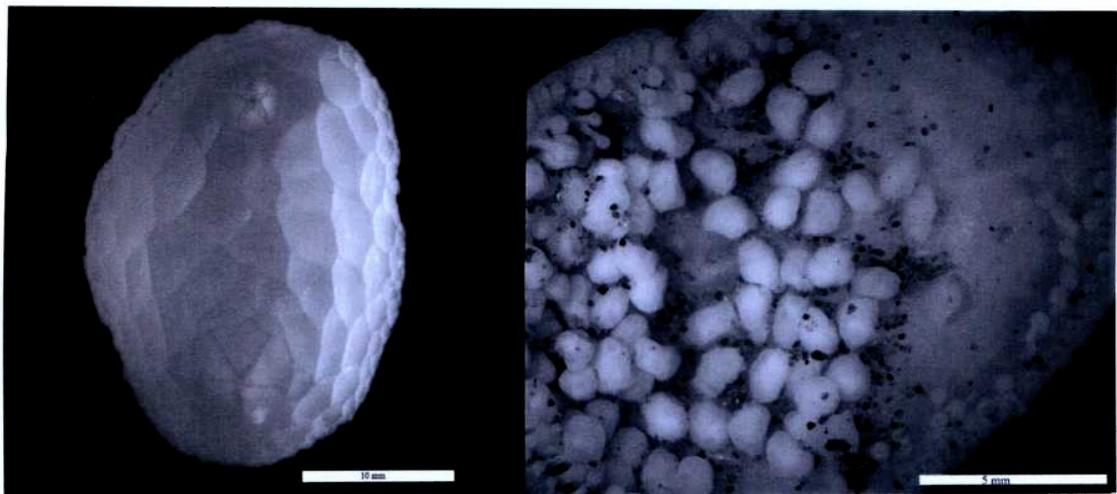


Figura 3: A. Ejemplar de *P. patagonicus* en vista dorsal. B: Vista ventral, note la presencia de embriones incubantes (Giménez y Penchaszadeh, 2002).

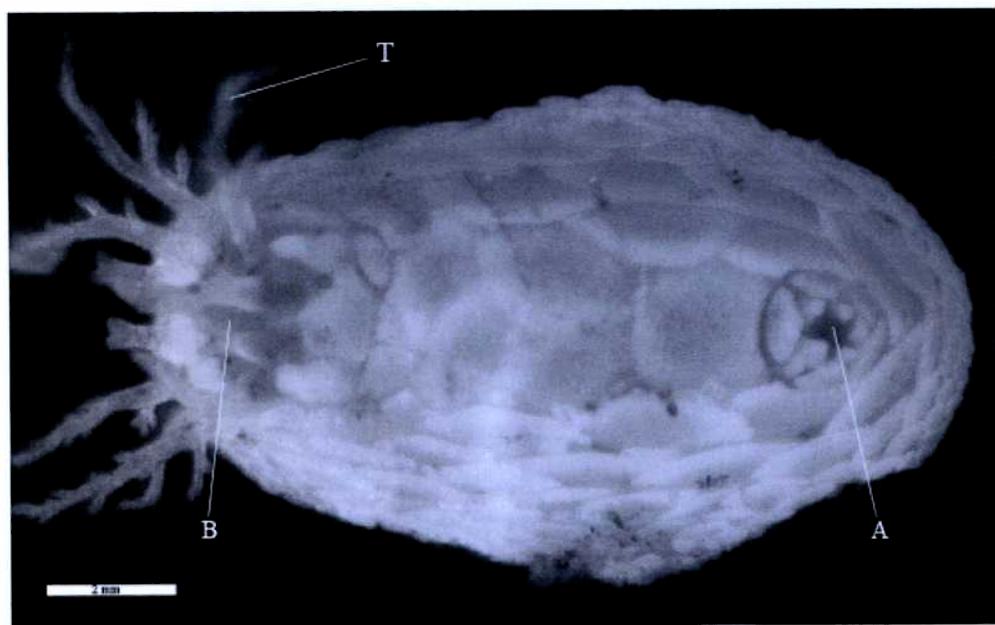


Figura 4: Ejemplar de *P. patagonicus* en vista dorsal exponiendo los tentáculos (T). Nótese la boca (B) y el ano (A).

Condiciones ambientales en la zona de muestreo

Entre los 38° y los 45° S de latitud existe una mezcla de aguas subtropicales y subantárticas que generan variaciones horizontales y verticales de temperatura, salinidad y nutrientes (Brandini *et al.*, 2000). La zona de muestreo conocida como Banco Reclutas (39°24' S; 55°56' O) esta ubicada en el talud, en el Mar Argentino (Fig. 5) entre los 100 y 110 metros de profundidad. Esta comunidad se encuentra dentro de esta área de mezcla de aguas subtropicales y subantárticas y es monitoreada, principalmente, debido al seguimiento de la vieira patagonica, *Zygochlamys patagonica*, la cual constituye un recurso pesquero. Tanto *P. patagonicus* como *Z. patagonica* comparten su hábitat con diversas especies de invertebrados tanto subtropicales como subanárticos, incluyendo poliquetos, moluscos, anthozoarios y equinodermos (Martos y Piccolo, 1988, Lutz y Carreto, 1991; Bastida *et al.*, 1992; Bremec *et al.*, 2000).

Tanto la comunidad de Banco Reclutas como otras ubicadas en el talud coinciden con la zona conocida como frontal, ubicada en el Mar Argentino que corresponde a la región de encuentro de las corrientes de Malvinas y Brasil (Lutz y Carreto, 1991; Carreto *et al.*, 1995; Acha *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2006). Esta zona frontal o frente presenta una variación cíclica que depende de la dinámica de la corriente de Malvinas, dando períodos anuales (Rivas *et al.*, 2006). Además este contacto entre masas de agua en el frente aumenta la estabilidad vertical permitiendo retener el fitoplancton en la zona eufótica (Rivas *et al.*, 2006).

Respecto a la región frontal Malvinas - Brasil, tanto en primavera como durante el comienzo del otoño se registran los valores mas altos de fitoplancton en la superficie del mar (Rivas *et al.*, 2006). Particularmente en otoño los vientos aumentan y la temperatura superficial disminuye, lo cual favorece la mezcla de los estratos y la pérdida de la estratificación (Martos y Picollo, 1988; Carreto *et al.*, 1995; Rivas *et al.*,

2006). Esto último permite el descenso del fitoplancton en la columna de agua y un incremento de esta variable en las capas profundas de agua evidenciado por un aumento en las tasas de alimentación observado por Schejter *et al.* (2002) en *Z. patagonica* en la región de banco Reclutas.

Por esto la zona de banco Reclutas se encontraría en un punto clave del Mar Argentino siendo parte de los puntos afectados por el frente descrito anteriormente, en el cual los valores mas altos de fitoplancton y zooplancton en superficie se encontrarían en primavera y en otoño (Rivas *et al.*, 2006).

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la ecología reproductiva del pepino de mar *Psolus patagonicus* asociado a los bancos de vieiras frente a la Provincia de Buenos Aires.

Objetivos específicos

1. Caracterizar la población de esta especie en función de la distribución de tallas a lo largo del año.
2. Identificación de sexos y determinación de la proporción de sexos en la población.
3. Caracterización del ciclo reproductivo. Determinación de la temporada de reproducción a través del análisis de la frecuencia de tallas oocitarias y el IGS y los estadíos de la gametogénesis observados a nivel histológico.
4. Relacionar el ciclo reproductivo con el hábito incubador.

Materiales y métodos

Muestreo

Especímenes de *Psolus patagonicus* (N= 254) fueron colectados mensualmente entre los años 1999 y 2001 mediante la pesca de arrastre experimental con una red de fondo en la zona de banco "Reclutas" ($39^{\circ}24' S$; $55^{\circ}56' W$), frente a la Ciudad de Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina a bordo del Buque Oceanográfico "Capitán Cánepe" (INIDEP) (Fig. 5). Se tomaron datos de profundidad y temperatura en cada lance de pesca. Los individuos fueron separados del sustrato y fijados en formol al 5 % y preservados en etanol al 70 %.

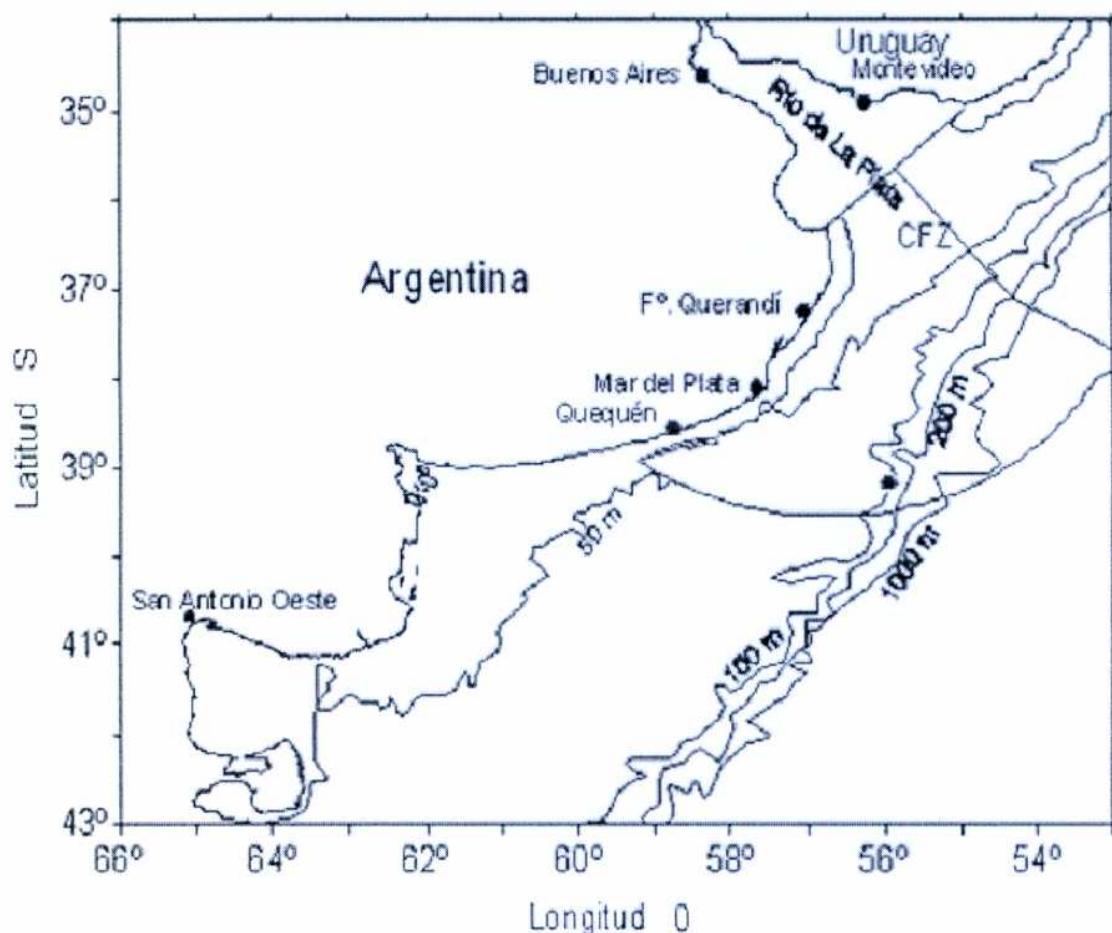


Figura 5: Zona de muestreo de individuos de *P. patagonicus*. El punto en la isobata de 100 m indica la localización del banco "Reclutas" ($39^{\circ}24' S$; $55^{\circ}56' O$).

Procesamiento de muestras

Se registró la talla corporal de todos los individuos y se registraron los organismos acompañantes. Solo los ejemplares con tallas mayores a 14 mm fueron considerados para el cálculo del IGS ($N= 254$). A tal fin, las gónadas de los mismos fueron pesadas al microgramo en una balanza Mettler (precisión = 0,0001 g). Se calculó el índice gonadosomático [IGS = peso húmedo gonadal / peso húmedo del animal x 100].

Con los datos de IGS se calculó la media y el desvío estándar para cada mes y a partir de estudios estadísticos paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Kruskal-Wallis con contraste de Dunn) se compararon los resultados mensuales en machos y hembras. La significancia estadística establecida con $p < 0,05$.

Se tomaron medidas de altura, largo, ancho y distancia ano-boca con un calibre Vernier de 0,1 milímetros de precisión. Todos los individuos fueron disecados bajo lupa estereoscópica y se extrajeron las gónadas que fueron utilizadas para posterior análisis histológico.

Para el análisis histológico, se realizaron técnicas clásicas de deshidratación de los tejidos a través de alcoholes de gradación creciente. Posteriormente se incluyó la muestra en parafina y se seccionó con un espesor de 5 y 10 μm en micrótomo Leitz Westlar.

Adicionalmente, se utilizó un segundo medio de inclusión en resina plástica. Muestras de tejido gonadal previamente deshidratado en alcoholes de gradación creciente (70%, 80%, 90%, 96%, 100%) fueron incluídas en resina plástica Leica Historesin®. Posteriormente se realizaron los cortes de 5 μm de espesor con un micrótomo digital Leica RM2155.

Las técnicas de coloración hematoxilina-eosina fueron realizadas de la misma manera para los dos tipos de inclusión, sin embargo, fue necesario realizar un ajuste en los tiempos de coloración.

Los cortes fueron observados y fotografiados con un microscopio Zeiss Axiolmager Z1. A partir de la observación de los cortes se determinó el sexo de los individuos. En las hembras se midió el diámetro de los oocitos que presentaban nucleolo visible y se analizó la distribución de tallas oocitarias. A tal fin se establecieron 3 grupos de tallas de oocitos: < 300 μm , de 300 a 600 μm y de 600 a 900 μm . En los machos se analizó la estructura del testículo, evaluando la presencia y abundancia de espermatozoides para los machos.

Una vez identificado el sexo de cada ejemplar a nivel histológico, se determinó la proporción de sexos de la población, analizando si existía una diferencia con respecto a la relación 1:1 mediante una prueba de Chi-cuadrado.

Resultados

Anatomía externa

P. patagonicus presenta un cuerpo de contorno elíptico, con una zona dorsal con escamas imbricadas o placas calcáreas. Ventralmente un tegumento fino y transparente con osículos pequeños (Fig. 6 A y B). En la zona dorsal se encuentra la boca, rodeada por parte del sistema ambulacral en forma de tentáculos (Fig. 4). La zona ventral presenta una corona simple, o a veces doble, de pies ambulacrales que bordean la suela y que se encuentran ausentes en el radio medio (Fig. 6B). Este sistema de pies ambulacrales resulta bastante activo, llegando a prolongarse no más de 2 mm.

En *P. patagonicus*, se pueden observar los tentáculos orales expuestos, en individuos vivos, sólo en condiciones controladas y con poca luz (Fig. 4).

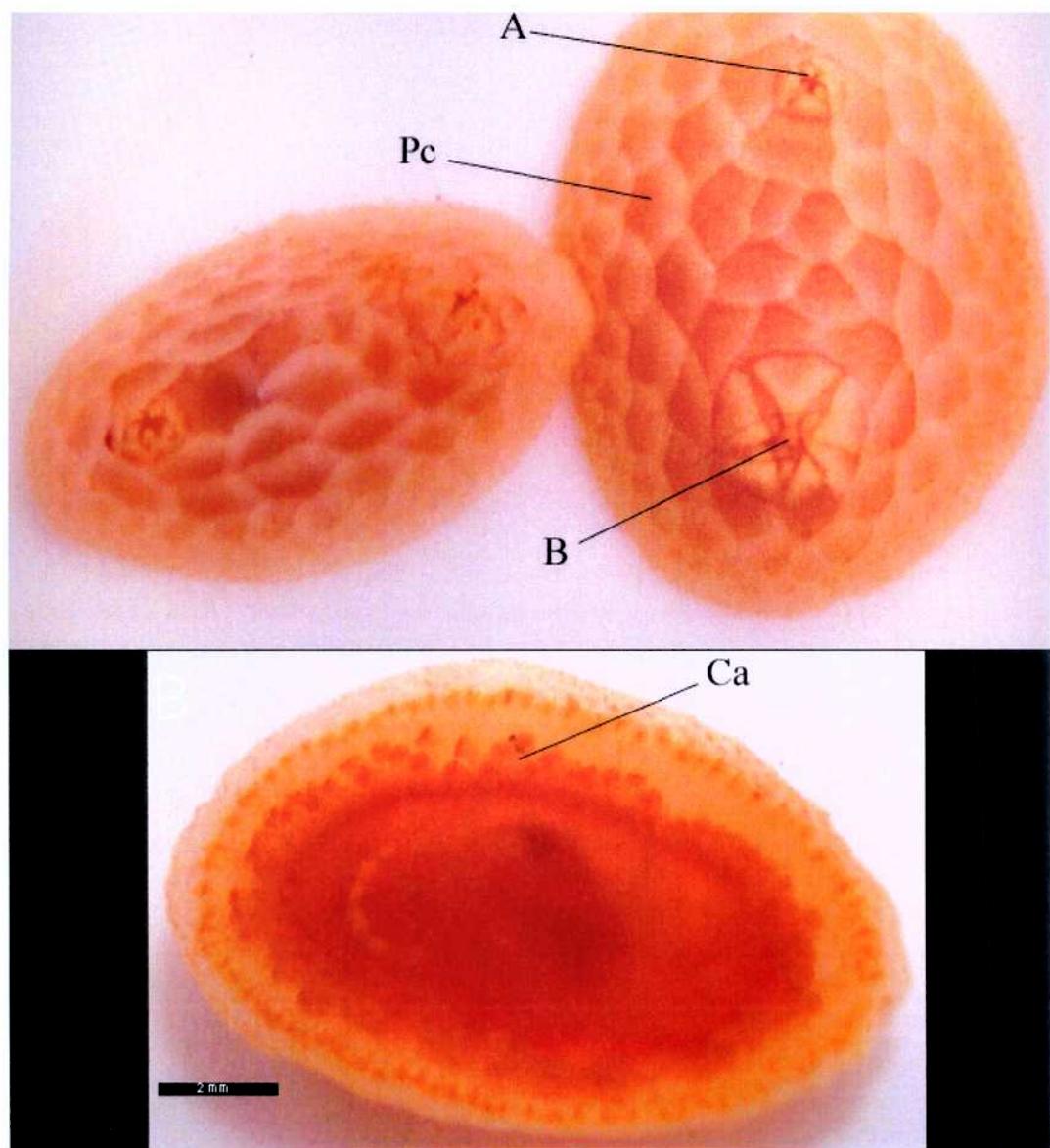


Figura 6: A. Vista dorsal de *Psolus patagonicus*, se observan las placas calcáreas (Pc), la boca (B) y el ano (A). B. Vista ventral en donde se observa la corona de pies ambulacrales (Ca). Ejemplar obtenido en Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. Escala 2 mm (Fotografía tomada por Jorge Calvo).

Temperatura

En la zona de muestreo la temperatura varió a lo largo de un grado °C de diferencia, entre los 6 y los 7 °C. Se observó un aumento de la temperatura desde abril de 2000 hasta junio de 2000 y un descenso desde julio de 2000 a junio de 2000.

Estructura poblacional

Las tallas máximas para la población en estudio son de 21 a 23 mm, encontrándose presentes en la población durante todo el año. Las tallas correspondientes a los individuos más pequeños, entre 2 mm a 3 mm, se encontraron en los meses de noviembre 1999 y 2000, y octubre de 2000 (Fig. 7).

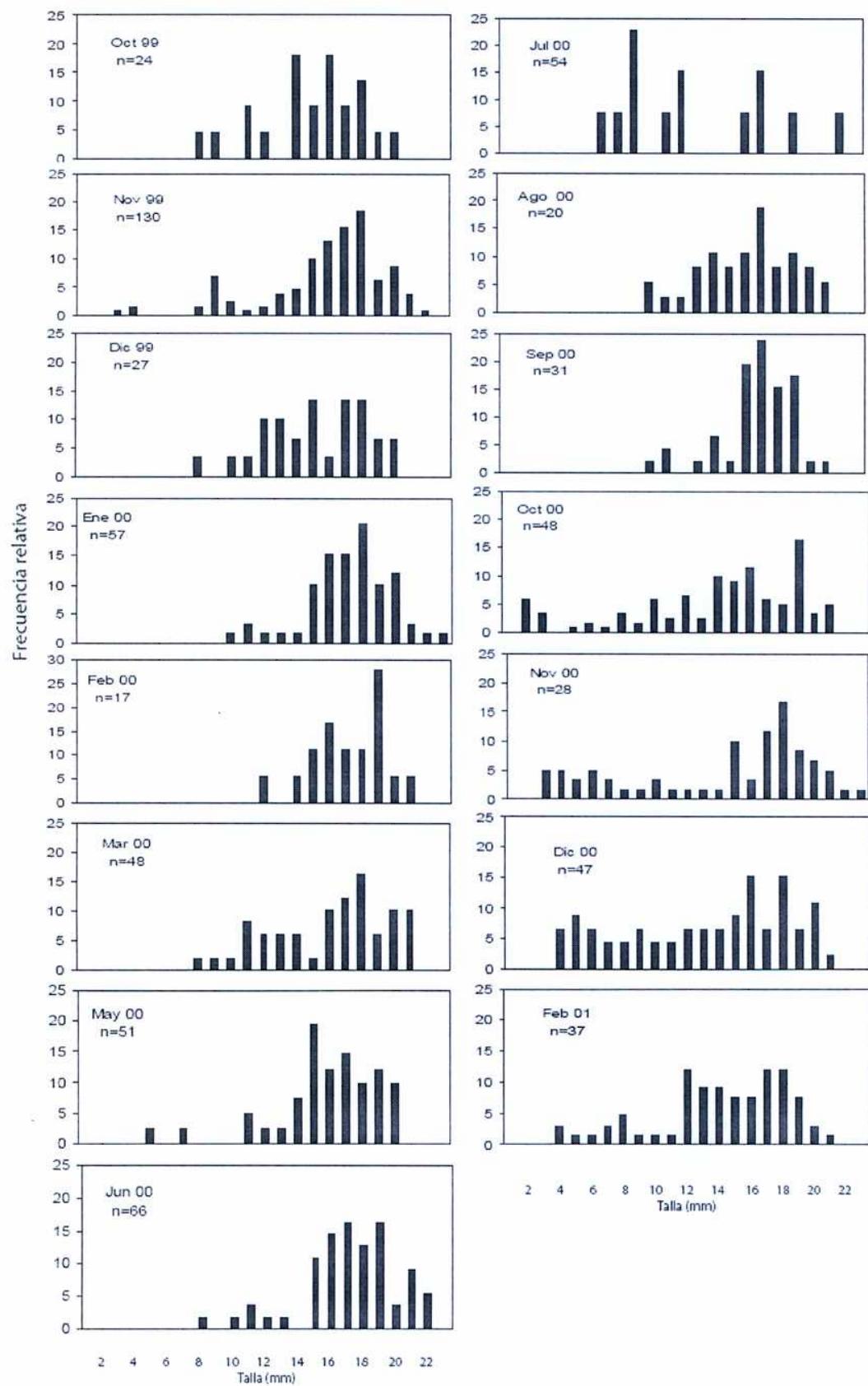


Figura 7: Distribución de tallas de *P. patagonicus* en la zona de muestreo desde octubre de 1999 hasta Febrero de 2001.

Relación de sexos

La proporción de sexos en los individuos de *P. patagonicus* en el área estudiada, fue de 1:1. No encontrándose diferencias significativas (Chi-cuadrado= 0,0597015; gl= 1; p= 0,806969; N= 254).

Anatomía de la gónada

La gónada masculina está dispuesta en forma de túbulos, con un largo de 10 a 17 mm (Fig. 8A, 8B). Los túbulos desembocan en un gonoducto que finaliza en un gonoporo cercano a la corona de tentáculos.

Las hembras presentan una morfología gonadal similar, y los túbulos presentan una longitud de 1 a 6 mm. En la Fig. 9 es posible observar el ovario, con los oocitos distinguibles a simple vista.

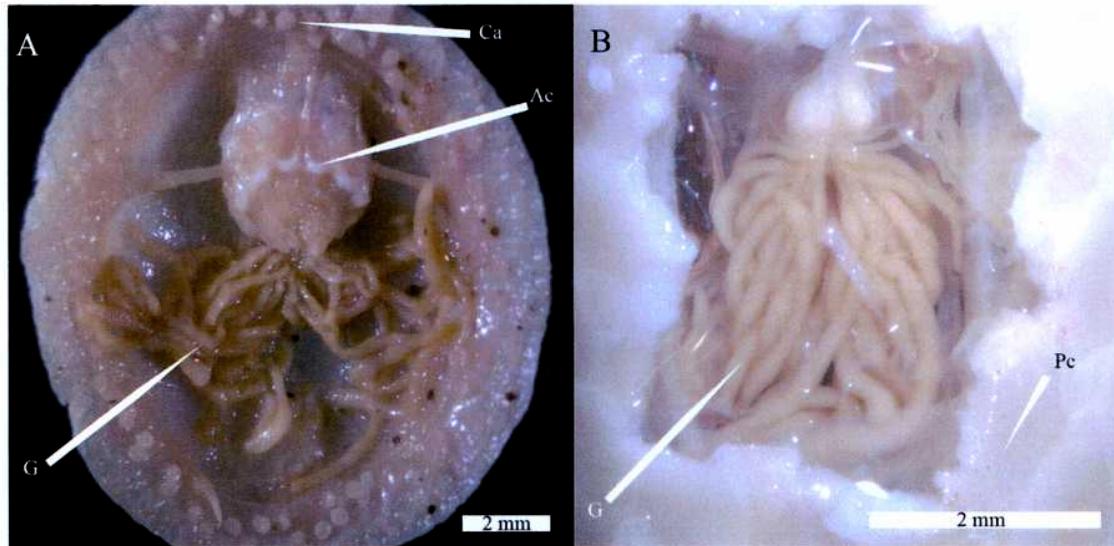


Figura 8: Machos de *P. patagonicus*, con gónada en forma de ramillete. A. Vista ventral donde se observa la gónada (G), el anillo calcáreo (Ac) y corona de pies ambulacrales (Ca). B. Vista dorsal donde se observan la gónada (G) y las placas calcáreas (Pc).

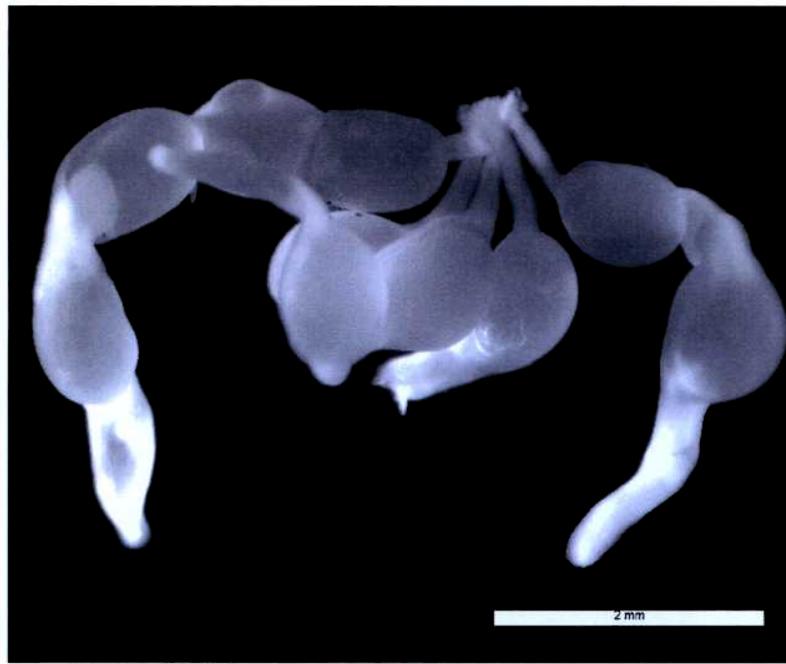


Figura 9: Gónada de un individuo hembra de *P. patagonicus*. Nótese la presencia de oocitos dentro de los túbulos.

Índice gonadosomático

Para los machos, la prueba de homogeneidad para los valores de IGS mostró un valor no significativo ($p= 0,2336$) y los residuos presentaron una distribución normal; por ello se realizó un análisis paramétrico (ANOVA). El análisis estadístico para los machos mostró un ($p= 0,369$; $gl= 12$; $n= 129$); indicando que los valores de IGS no difieren significativamente a lo largo del período de estudio (Fig. 10).

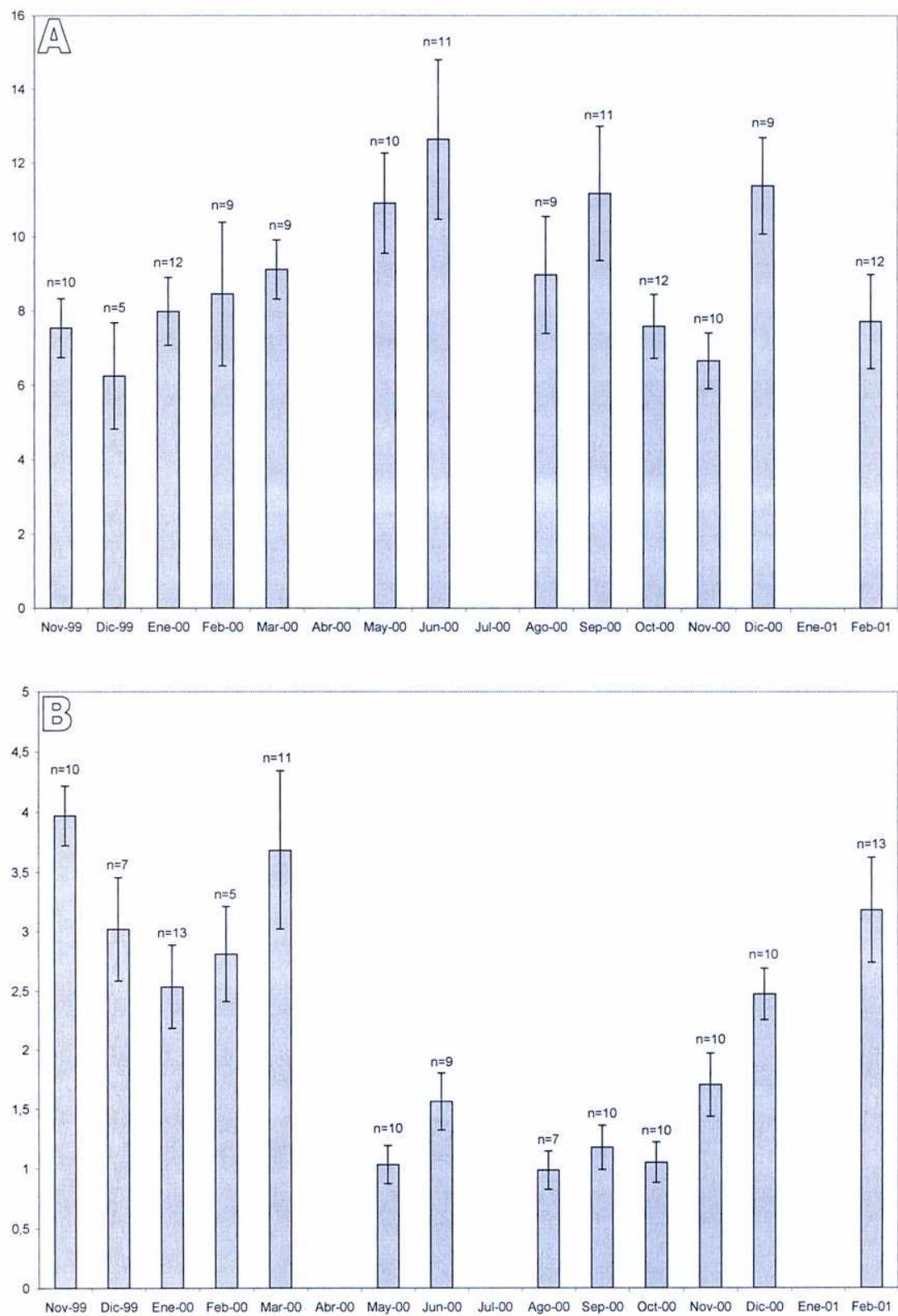


Figura 10: Índice gonadosomático en *P. patagonicus* en cada uno de los meses muestreados. A. machos B. hembras.

Para las hembras, los valores de IGS no cumplieron con homocedacia ni normalidad y por ello se utilizó Kruskal Wallis como método no paramétrico. Dado que el H de Kruskal Wallis presentó un valor significativo ($H= 49,92$; $gl= 11$; $n= 125$); a continuación se emplearon contrastes de Dunn para determinar diferencias para determinar diferencias mensuales.

	N 99	D 99	E 00	F 00	M 00	M 00	J 00	A 00	S 00	O 00	N 00	D 00	F 01
Noviembre 1999		70	555	39	402	148	153	239	106	133	271	221	538
Diciembre	70		418	195	264	306	310	396	264	291	133	82.9	400
Enero 2000	555	418		680	96	793	796	882	751	778	231	274	-36
Febrero	39	195	680		527	10.8	16	102	-31	-4.2	396	346	663
Marzo	402	264	96	527		639	643	729	597	624	77	120	78
Abril													
Mayo	148	306	793	11	639		-58	28	-19	-46	508	458	775
Junio	153	310	796	16	643	-58		13	-16	-43	512	461	779
Julio													
Agosto	239	396	882	102	729	28.4	13		70	43.4	598	547	865
Septiembre	106	264	751	-31	597	-19	-16	70		-34	466	416	733
Octubre	133	291	778	-4	624	-46	-43	43	-34		493	443	760
Noviembre	271	133	231	396	77	508	512	598	466	493		-11	213
Diciembre	221	83	274	346	120	458	461	547	416	443	-11		256
Enero 2001													
Febrero	538	400	-36	663	78	775	779	865	733	760	213	256	

Tabla 1: Diferencia obtenida entre el diferencial de Dunn y el valor crítico. Nótese en negrita diferencias no significativas.

Para la comparación se utilizó la diferencia entre el valor obtenido para cada mes por el test de Dunn y su valor crítico, de esta manera aquellos valores positivos corresponden a una diferencia significativa. Los valores negativos, corresponden a una diferencia no significativa (Tabla 1).

Desde noviembre de 1999 a marzo de 2000 se presentaron diferencias significativas en los valores de IGS en las hembras al compararlos entre si. Además el mes de marzo presenta diferencias significativas con respecto a los meses posteriores

(Tabla 1). En los meses siguientes, desde mayo a octubre de 2000 no se observaron diferencias significativas, excepto en el mes de agosto (Tabla 1).

El mes de octubre presentó diferencias significativas con el mes de noviembre y de diciembre, por otro lado no se observaron diferencias significativas entre los meses de noviembre y diciembre (Tabla 1).

Al comparar los IGS entre sexos se observan valores mayores para machos respecto a las hembras, siendo en el caso de las machos un valor mínimo cercano al 6 % y en el caso de las hembras un valor máximo cercano al 4 %.

Ciclo reproductivo

Mediante la observación de los cortes histológicos, se determinó la frecuencia oocitarias (Figs. 11) y la presencia de espermatozoides (Figs. 12).

Los valores de frecuencias de tallas oocitarias para los distintos meses fueron divididos en 3 grupos, de los cuales el primero (hasta 300 μm) se encuentra presente en todos los meses desde noviembre de 1999 a diciembre de 2000. Sin embargo, no se encontraron oocitos de esta talla en el mes de febrero de 2001. El segundo grupo (entre 300-600 μm) se encuentra representado entre noviembre de 1999 y febrero de 2000 y posteriormente de octubre de 2000 a febrero de 2001. Por último, el grupo de oocitos entre 600-900 μm se encontró presente entre noviembre de 1999 y marzo de 2000, y se presenta nuevamente en febrero de 2001 (Figs. 11). Se observaron oocitos atrésicos, en el mes de mayo, junio de 2000 y en febrero de 2001 (Figs. 11, 13 F).

Para los machos, los cortes histológicos mostraron hacia el mes de enero 2000 solo se observaron diversos estadios de la espermatogénesis previos al espermatozoide (Figs. 13 A). En febrero y marzo de 2000 se observaron espermatozoides y estadios de la espermatogénesis (Figs. 13 B). Entre junio y octubre de 2000 no se observaron

espermatozoides, pero si se observaron distintos estadios de la espermatogénesis (Figs. 13 C y D). Hacia noviembre de 2000 y diciembre de 2000 se observaron nuevamente espermatozoides y diversas etapas de la espermatogénesis (Figs. 13 E, F).

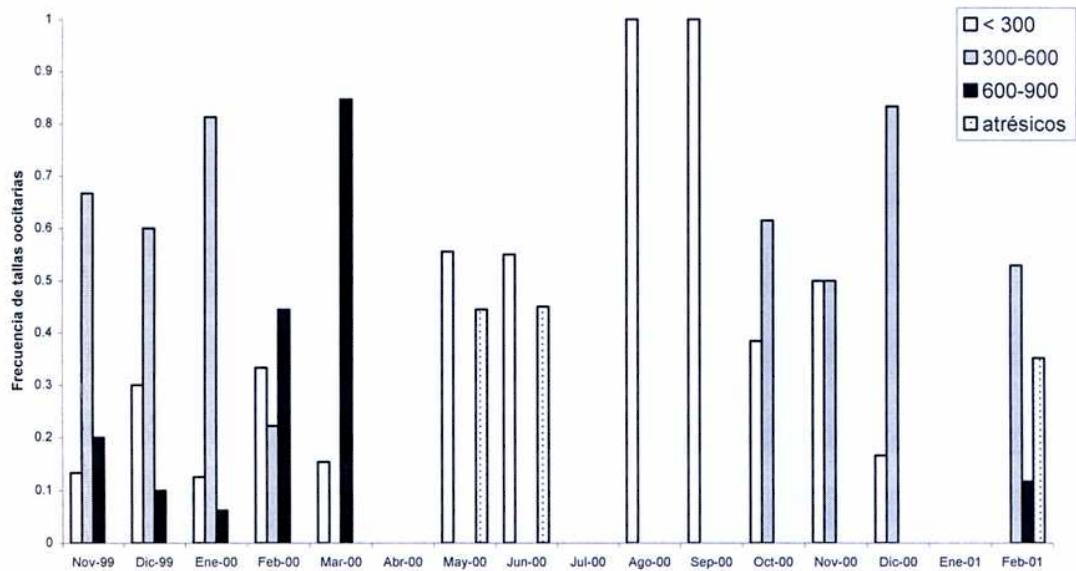


Figura 11: Frecuencia relativa de tallas oocitarias (μm) y oocitos atrésicos en función de los meses muestreados.

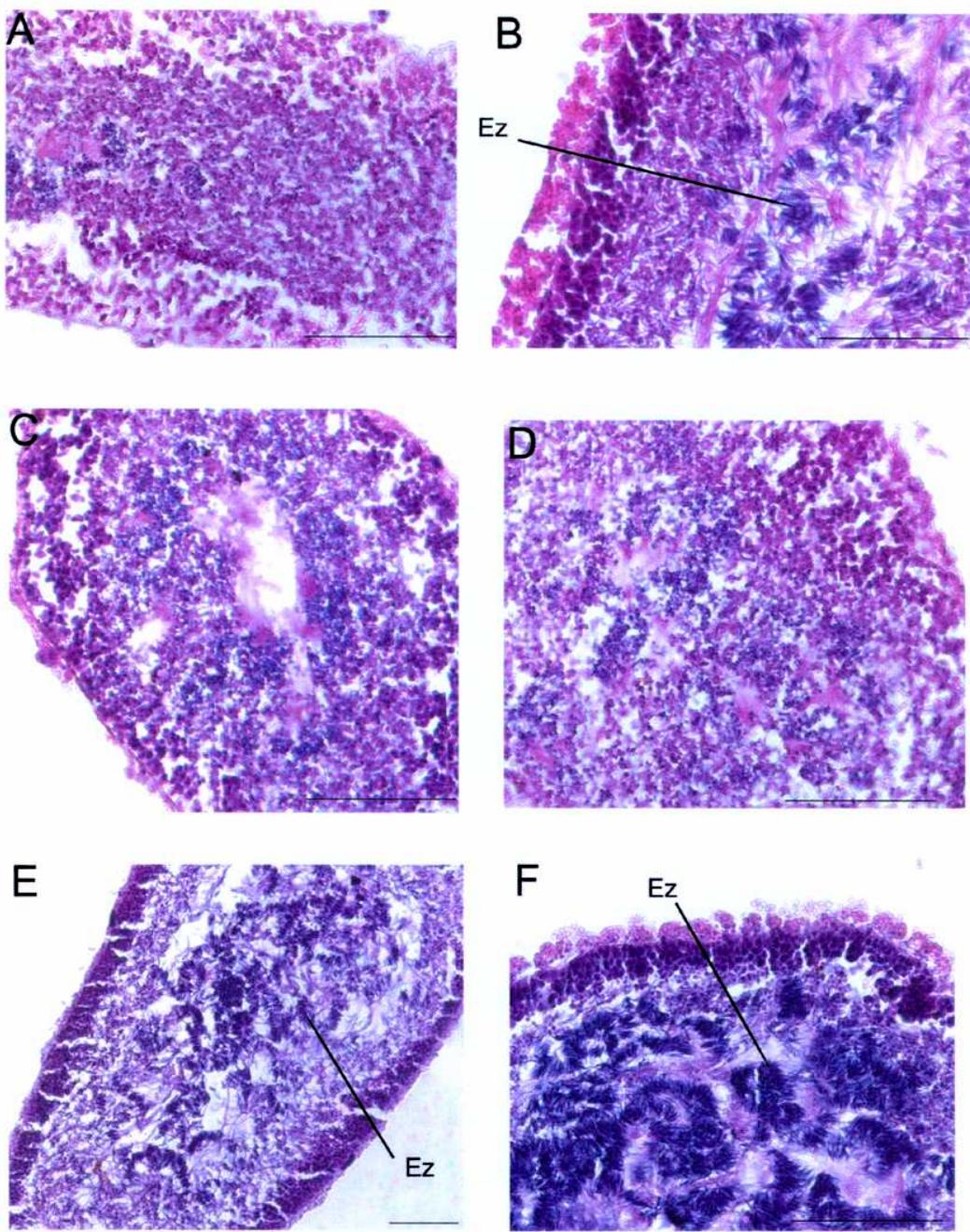


Figura 12: Cortes histológicos de testículos de *P. patagonicus* en diversos períodos de desarrollo gonadal (escala 200 μm). A. Testículo correspondiente al mes de enero de 2000. B. Testículo correspondiente al mes de febrero de 2000. Nótese presencia de espermatozoides (Ez). C y D. Testículos correspondientes a los meses de junio y agosto de 2000. E y F. Testículos para los meses de noviembre y diciembre de 2000, respectivamente. Nótese la presencia de espermatozoides (Ez).

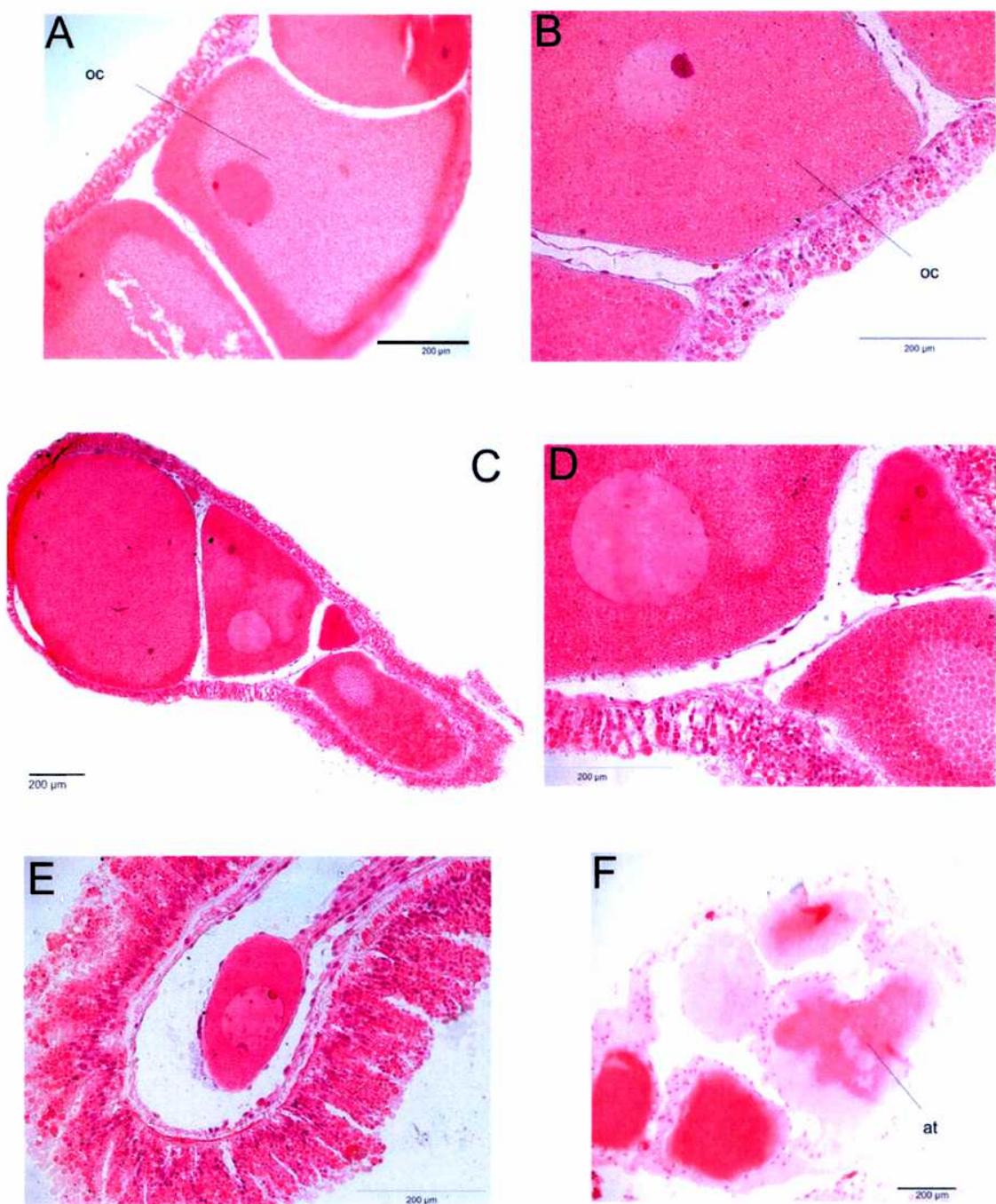


Figura 13: Cortes histológicos de ovarios de *P. patagonicus* en distintas etapas del desarrollo. A, B. Oocitos (oc) observados en el mes de octubre. C. Ovario correspondiente al mes de febrero. D. Detalle del ovario del mes de febrero. E. Ovario en crecimiento del mes de octubre. F. Ovario con oocitos atrésicos (at) observado en el mes de junio.

Para las hembras en los cortes histológicos se observaron las tres tallas de oocitos entre noviembre de 1999 y marzo de 2000 (Fig. 13 A, B, C y D). Hacia mayo y junio de 2000, y posteriormente en febrero de 2001, se observaron oocitos atrésicos (Fig. 13 F). Los oocitos de tallas menores a 300 μm se encontraron en alta frecuencia de marzo a noviembre de 2000 (Fig. 11 y Fig. 13 E). Entre septiembre y diciembre de 2000 se observaron oocitos de tallas pequeñas (menores a 300 μm) y de tallas intermedias (300-600 μm) (Fig. 13 D).

Conclusiones y discusión

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que *Psolus patagonicus* desarrolla un ciclo anual de reproducción al igual que las especies *Cucumaria pseudocurata* Deichmann 1938, *Aslia lefevrei* (Barrois, 1882), *Stichopus mollis* (Hutton 1872), *Actinopyga mauritiana* (Quoy y Gaimard, 1883) (Rutherford, 1973; Costelloe, 1985; Sewell, 1992; Ramofafia *et al.*, 2001). En este ciclo anual se desarrollan dos eventos reproductivos, uno de ellos tienen lugar en los meses de noviembre, diciembre y otro tiene lugar durante los meses de febrero y marzo correspondientes al final del verano y principio del otoño.

Para los individuos de la población en estudio se determinó que los individuos con tallas menores que 14 mm son sexualmente inmaduros. Esto llevó a utilizar para la determinación del IGS solamente los individuos considerados adultos, es decir aquellos con tamaño mayor a 14 mm determinados en la temporada reproductiva.

La gametogénesis se desarrolla durante todo el año tanto en machos como en hembras de *P. patagonicus*. En los machos no se observa una disminución en el valor de IGS luego de la liberación de gametas, resultando durante todo el año estadísticamente invariable. Para las hembras los valores de IGS presentan un descenso significativo durante los dos períodos de evacuación. Comparativamente el IGS para todos los meses muestreados fue mayor en los machos que en las hembras. Respecto a la temperatura, los cambios no coincidieron con los cambios observados para el IGS, entre abril y junio de 2000 hubo un aumento en la temperatura no coincidente con la variación del IGS en las hembras. Para los machos, los cambios en el IGS no son significativos por lo tanto tampoco existe relación con los cambios de temperatura.

Los meses de primavera - verano se observan, a partir de octubre, oocitos de tallas intermedias (300-600 μm) y además oocitos de tallas pequeñas que están siempre presentes a lo largo del año. A fines de la primavera y comienzo del verano se pueden apreciar los oocitos de tallas mayores (600-900 μm) y un marcado aumento en el IGS. En este período también se registraron los oocitos de tallas pequeñas menores a 300 μm y de tallas intermedias. Esto último demuestra que existe un constante crecimiento oocitario. Las tallas oocitarias más grandes cercanas a las 900 μm son similares a las tallas oocitarias vistas en *Psolus fabricii* Duben y Koren 1846, el cual presenta también diámetros oocitarios mayores a 1000 μm (Hamel *et al.*, 1993). En contraste, estas tallas son considerablemente mayores a lo observado en *A. lefevrei* con diámetros oocitarios cercanos a los 600 μm (Costelloe, 1985) y *S. mollis*, con diámetros no mayores a los 180 μm (Sewell, 1992).

En los meses de noviembre y diciembre de 1999, y febrero, marzo, octubre, noviembre y diciembre de 2000 en los cortes histológicos de los machos se observan espermatozoides. La presencia de especie en la gónada es el único parámetro que indica la reproducción debido a que el IGS se mantiene estadísticamente invariable durante todo el año. Por otro lado en los machos no se observan espermatozoides en los meses posteriores a la evacuación, es decir en enero de 2000 para el caso de la primera evacuación y luego en mayo de 2000 para el caso de la segunda evacuación.

En *S. mollis* y *A. lefevrei* existe fagocitosis luego de la reproducción (Costelloe, 1985; Sewell, 1992). En el caso particular de *S. mollis* no hay vestigios de tejido gonadal hasta cinco a seis meses después de la evacuación (Costelloe, 1985). Por el contrario, *P. patagonicus* presenta desarrollo y crecimiento gonadal todo el año. En *P. fabricii* tampoco se evidencia un período de reposo, dado que existen oocitos de tallas menores a 200 μm en los túbulos después de la reproducción (Hamel *et al.*, 1993).

El trabajo de Giménez y Penchaszadeh (2002) reporta la incubación de las crías en *P. patagonicus*, desde el mes de febrero al mes de octubre de 2000. El inicio de este comportamiento coincidió con el evento de evacuación de gametas del mes de febrero y marzo de 2000. Este hábito incubador también lo presentan otros miembros de la familia Psolidae como, *Psolus antarticus* (Philippi, 1857), *Psolus charcoti* y *Psolus granulosus* Vaney, 1906 (McEuen y Chia, 1991). Los juveniles, tallas de 2 y 3 mm, se observaron al medir las tallas de la población en los meses posteriores a la liberación de la crías, noviembre 1999, octubre y noviembre de 2000, estos corresponderían al ciclo reproductivo anterior.

El aumento en el fotoperíodo es sumamente importante para iniciar el proceso de gametogenesis en *P. fabricii* (Hamel *et al.*, 1993) y en *Actinopyga mauritiana*, para el cual el cambio de temperatura sería determinante para el inicio de la evacuación (Ramofafia *et al.*, 2001). Para *A. lefevrei*, los bajos niveles de luz y el aumento en la temperatura tienen influencia en el comportamiento de evacuación según estudios con individuos en acuario y observaciones realizadas en el campo (Costelloe, 1985). Por otro lado, la reproducción en *P. fabricii* se encuentra asociada a la cantidad relativa de fitoplancton (Hamel *et al.*, 1993). Esto último es similar a lo observado en *P. patagonicus* dado que los eventos reproductivos no coinciden con los cambios de la temperatura sino que, por el contrario, coinciden con un aumento en las tasas de alimentación para las capas profundas, observado por Schejter *et al.* (2002) en *Zygochlamys patagonica* para la comunidad de banco “Reclutas” y otras comunidades cercanas.

Para los adultos de *P. patagonicus*, no se observa una sincronía en el crecimiento entre machos y hembras, a diferencia de *Actinopyga mauritana* y *P. fabricii*, especie en la que sí existe tal sincronía (Hamel *et al.*, 1993; Ramofafia *et al.*, 2001). Además, en

esta última especie se observa una gran diferencia del IGS entre los sexos, siendo en machos mayor que en hembras (Hamel *et al.*, 1993). Esto es similar a lo observado al comparar los IGS de ambos sexos en *P. patagonicus*, siendo el IGS de los machos mayor que el de las hembras. Distinto es lo que ocurre en *C. pseudocurata*, en el cual no se evidencian diferencias en lo que respecta al índice gonadal para ambos sexos (Rutherford, 1973).

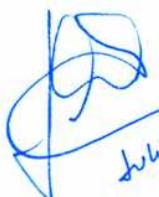
La presencia de *P. patagonicus* como epibionte fue del 95 % en la vieira *Z. patagonica* mientras que el 5 % restante se hallaba sobre caracoles de la especie *?Fusitriton magellanicus* (Roding, 1798) en el muestreo mediante la red de arrastre, por lo que contempla solo los individuos que permanecen adosados al sustrato (Giménez y Penchaszadeh, 2002).

Por último es importante destacar que la población de *P. patagonicus* tanto de la zona de banco “Reclutas” como de bancos cercanos, se encuentra en constante explotación en forma indirecta, ya que *Z. patagonica* es un recurso pesquero de gran importancia a nivel nacional e internacional. Esta importante presión pesquera ejercida sobre esta vieira involucra directamente a *P. patagonicus*, haciendo a esta especie de holoturio vulnerable a la pesca, a pesar de no ser un recurso de importancia pesquera. De esta manera *P. patagonicus* adquiere un riesgo pesquero por ser un organismo epibionte de *Z. patagonica*. Sin embargo, dado que la reproducción de la vieira coincide con la reproducción de *P. patagonicus*, con dos eventos de evacuación, uno en primavera y otro en verano otoño (Waloszek y Waloszek, 1986), futuros estudios de manejo pesquero para la vieira conllevarían a un manejo indirecto sobre la pesca de *P. patagonicus*. Aún así, la característica de esta especie al ser incubadora, estaría en desventaja durante los meses de incubación, dado que durante estos meses las crías estarían asociadas al adulto y no separadas de estos como ocurre en otras especies.

Resulta por tanto importante continuar con futuras investigaciones en este grupo de holoturios y en particular en esta especie que se ve indirectamente afectada por la pesca de un organismo perteneciente a su comunidad.



Mariano I. Martínez



Juliana Giménez



Raúl Penchaszadeh

Bibliografía

Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerrero, R. A., Favero, M. y Bava, J., 2004. Marine fronts at the continental shelves of the austral south america physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems* 44: 83-105.

Bastida, R., Roux, A. y Martinez, D. E., 1992. Benthic communities of the Argentine continental shelf. *Oceanologica Acta* 15 (6): 687-698.

Brandini, F. P., Boltovskoy, D., Piola, A., Kocmur, S., Rottgers, R., Abreu, P. C. y Lopes, R. M., 2000. Multiannual trends in fronts and distribution of nutrient and chlorophyll in the southwestern Atlantic (30°-62°S). *Deep Sea Research I* 47: 1015-1033.

Bernasconi, I., 1934. Los equinodermos de los mares argentinos. *Boletín del centro Naval* 506 (53): 1-21.

Bernasconi, I., 1941. Los equinodermos de la expedición del Buque oceanográfico "Comodoro Rivadavia" A. R. A. Physis, 19:37-49.

Bremec, C. S., Lasta, M. L., Lucifora, L.y Valero, J., 1998. Análisis de la captura incidental asociada a la pesquería de vieira patagonica *Zygochlamys patagonica* (King y Broderip, 1832). INIDEP Informe técnico Vol. 22. pp: 1-21.

Bremec, C., Brey, T., Lasta, M., Valero, J.y Lucifora, L., 2000. *Zygochlamys patagonica* beds on the Argentinian shelf. Part I: Energy flow through the scallop bed community. Archive of Fishery and Marine Research 48(3), 295-303.

Carreto, J. I., Lutz, V., Carignan, M. O., Cucchi Colleoni, A. D., DeMarco, S. G.y Benavides, H. R., 1995. Hydrography and chlorophyll a in a transect from the coast to the shelf-break in the Argentina Sea. Continental Shelf Research 15: 315-336.

Costelloe, J., 1985. The annual reproductive cycle of the holothurian *Aslia lefevrei* (Dendrochiota: Echinodermata). Marine Biology 88: 155-165.

Ekman, S., 1925. Holothurien. Further zool. Results Swedish Antarctic Expedition. 1 (6): 1-194.

Fankboner, P. V., 1978. Suspension-Feeding mechanisms of the armoured sea cucumber *Psolus chitinoides* Clark. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 31: 11-25.

Giménez, J. y Penchaszadeh, P.E., 2002. Reproduction and protected development in *Psolus patagonicus* (Holothuroidea) from Argentina. SPC Beche-de-mer Information Bulletin Vol. 16. pp: 22.

Gutt, J., 1991. Investigations on brood protection in *Psolus dubiosus* (Echinodermata: Holothuroidea) from Antarctica in spring and autumn. Marine Biology 11: 281-286.

Guzmán, H. M., Guevara, C. A.y Hernández, I. C., 2003. Reproductive cycle of two commercial species of sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from Caribbean Panama. Marine Biology 142: 271-279.

Hamel, J., Himmelman, J. H. y Dufresne, L., 1993. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). Biological Bulletin 184: 125-143.

Hernández, D. A., 1981. Holothuroidea de Puerto Deseado (Santa Cruz, Argentina). Revista de Museo Argentino de Ciencias Naturales (Hidrobiología) 4:151-168.

Hyman, L. H., 1955. Echinodermata. En: *The Invertebrates*, Vol. IV. McGraw Hill Book Co. Inc., New York. 763 pp.

Lambert, P., 1995. *Psolidium bidiscum*, a new shallow-water psolid sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea) from the northeastern Pacific, previously misidentified as *Psolidium bullatum* Ohshima. Canadian Journal of Zoology 74: 20 -31.

Lancellotti, D. A. y Vasquez, J. A., 1999. Biogeographical patterns of benthic macro invertebrates in the Southeastern Pacific littoral. Journal of Biogeography 26: 1001-1006.

Lutz, V. A. y Carreto, J. I., 1991. A new spectrofluorometric method for the determination of chlorophylls and degradation products and its application in two frontal areas of the Argentine Sea. *Continental Shelf Research*, 11. (5): 433-451.

Martos, P. y Piccolo, C., 1988. Hydrography of the Argentine continental shelf between 38° and 42°S. *Continental Shelf Research* 8 o. 9: 1043-1056.

McEuen, F. S., 1988. Spawning behaviors of northeast Pacific sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata). *Marine Biology* 98: 565-585.

McEuen, F.S. y Chia, F. S., 1991. Development and metamorphosis of two psolid sea cucumbers, *Psolus chitonoides* and *Psolidium bullatum*, with a review of reproductive patterns in the family Psolidae (Holothuroidea: Echinodermata). *Marine Biology* 109: 267-279.

Muniaín, C., Giménez, J., Murray, P., Chludil, H. y Maier, M., 2003. An interdisciplinary study on *Psolus patagonicus* Ekman 1925 (Psolidae, Dendrochirotida) from the Magellan Province and its northern Atlantic distribution. Evolution of antartic fauna extended abstracts of the IBMANT/ANDEEP international symposium and workshop in 2003 507/2005. Vol. 5 pp:165-166.

Pearse, V., Pearse, J., Buchsbaum, M. y Buchsbaum, R., 1987. Echinoderms. En: Living Invertebrates. Cap. 27, Boxwood Press, Pacific Grove, 683-730.

Ramofafia, C., Byrne, M. y Battaglene, S., 2001. Reproductive biology of the intertidal sea cucumber *Actinopyga mauritana* in the Solomon Islands. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 81: 523-531.

Rivas, A. L., Dogliotti, A. I. y Gagliardini, D. A., 2006. Seasonal variability in satellite-measured surface chlorophyll in the Patagonian Shelf. Continental Shelf Research 26: 703-720.

Ruppert, E. E. y Barnes, R. D., 1996. Zoología de los invertebrados, Ed. VI. McGraw Hill Book Co. Inc., New York. 987 pp.

Rutherford, J. C., 1973. Reproduction, growth and mortality of the holothurian *Cucumaria pseudocurata*. Marine Biology 22: 167-176.

Sewell, M. A., 1992. Reproduction of the temperate aspidochirote *Stichopus mollis* (Echinodermata: Holothuroidea) in New Zealand. Ophelia 35 (2): 103-121.

Sewell, M. A., 1994. Small size, brooding, and protandry in the apodid sea cucumber *Leptosynapta clarki*. Biological Bulletin 187: 112-123.

Schejter, L., Bremec, C., Akselman, R., Hernández, D. y Spivak, E. D., 2002. Annual feeding Cycle of the patagonian scallop *Zygochlamys patagonica* (King and

Broderip, 1832) in Reclutas bed (39°S-55°W), Argentine Sea. Journal of Shellfish Research 21 (2): 549-555.

Waloszek, D. y Waloszek, G., 1986. Ergebnisse der Forschungsreisen des FFS 'Walther Herwig' nach Südamerika, LXV. Vorkommen, Reproduktion, Wachstum und mögliche Nutzbarkeit von *Chlamys patagonica* (King and Broderip, 1832) (Bivalvia, Pectinidae) auf dem Schelf von Argentinien. Arch. Fish. Wiss., 37: 69- 99.

Apéndice

Fijadores:

Solución de Bouin:

- 70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico.
- 25 ml de formol puro (40%)
- 5 ml de ácido acético glacial 1,5 M

Coloraciones aplicadas a material incluido en paraplast

Topográficas

Hematoxilina Eosina

- 1) Desparafinar e hidratar
 - a) Xilol 2 cambios de 3 minutos cada uno
 - b) Etanol 96 % lavado por 1 minuto
 - c) Colodionar
 - d) Etanol 70 %, 50 %, 1 min cada uno.
 - e) Agua destilada por 1 min
 - f) Coloración
 - g) Hematoxilina de Carazzi por 10 min
 - h) Viraje en agua común hasta que tome color violeta
 - i) Eosina alcohólica 0,25 % (en etanol 70 %) por 2 min
- 2) Deshidratar y montar
 - a) Pasaje rápido por etanol 70 %
 - b) Etanol 96 % pasaje rápido

c) Secar en estufa a 55º C

d) Xilol

e) DPX

Coloraciones aplicadas a material incluido en resina

Topográficas

Hematoxilina Eosina

1) Coloración

a) Secar en estufa a 55º C por 24 hr

b) Pasaje rápido por agua destilada

c) Hematoxilina de Carazzi por 15 min

d) Viraje en agua común hasta que la misma se torne violeta

e) Etanol 90 % por 30 seg

f) Eosina alcohólica 0,25 % (en etanol 70 %) por 15 min

g) Lavar con agua destilada

2) Deshidratar y montar

a) Etanol 90 % por 30 seg

b) Etanol 100 % por 30 seg dos veces

c) Xilol por 30 seg dos veces

d) DPX